# PHỤ LỤC 9

## 9.1 ỐNG NGHIỆM DÙNG TRONG CÁC PHÉP THỬ SO SÁNH

### Ống Nessler

Khi các phép thử yêu cầu sử dụng ống Nessler thì các ống Nessler được sử dụng phải đạt các yêu cầu sau:

Ống Nessler phải đạt các yêu cầu về tiêu chuẩn của ống Nessler do nhà sản xuất đưa ra. Ống được làm từ thủy tinh trung tính trong suốt và có thể tích danh định 50 ml. Chiều cao của ống khoảng 15 cm, chiều cao đo bên ngoài ống từ đáy đến vạch 50 ml là 11,0 cm đến 12,4 cm, độ dày của thành ống từ 1,0 mm đến 1,5 mm, độ dày của đáy ống từ 1,0 mm đến 3,0 mm. Chiều cao đo bên ngoài ống từ đáy đến vạch 50 ml đối với các ống dùng trong một phép thử không được sai khác quá 1 mm.

### Ống nghiệm dùng cho các phép thử so sánh

Nếu không có chỉ dẫn gì khác, các ống nghiệm dùng trong các phép thử so sánh là những ống thích hợp được làm bằng thủy tinh không màu, có đường kính trong đồng nhất. Đáy trong suốt và phẳng. Khi quan sát, nhìn cột chất lỏng theo trục thẳng đứng từ trên xuống trên nền trắng hoặc nền đen (nếu cần thiết) dưới ánh sáng khuyếch tán ban ngày. Thường dùng những ống có đường kính trong 16 mm. Có thể dùng những ống đường kính lớn hơn nhưng thể tích chất lỏng đem thử phải tăng lên sao cho chiều cao của lớp chất lỏng không thấp hơn chiều cao của lớp chất lỏng khi thử bằng những ống có đường kính trong bằng 16 mm.

## 9.2 XÁC ĐỊNH ĐỘ TRONG CỦA DUNG DỊCH

Độ trong của các dung dịch được xác định bằng cách so sánh các dung dịch đó với các hỗn dịch đối chiếu.

**Dung dịch hydrazin sulfat:** Hòa tan 1,0 g *hydrazin sulfat (TT)* trong *nước*, pha loãng với *nước* thành 100,0 ml và để yên trong thời gian 4 h đến 6 h.

**Dung dịch hexamethylentetramin:** Trong một bình nón thủy tinh nút mài dung tích 100 ml, hòa tan 2,5 g hexamethylentetramin trong 25,0 ml *nước*.

### Hỗn dịch đục gốc

Thêm 25,0 ml dung dịch hydrazin sulfat vào 25,0 ml dung dịch hexamethylentetramin, lắc kỹ và để yên trong 24 h. Nếu được bảo quản trong lọ thủy tinh tốt (không có khuyết tật ở bề mặt) thì hỗn dịch đục gốc bền vững trong vòng 2 tháng. Hỗn dịch này phải không được bám dính vào thủy tinh và phải được lắc kỹ trước khi dùng.

**Chuẩn đục:** Pha loãng 15,0 ml hỗn dịch đục gốc thành 1000,0 ml với *nước*.

Chuẩn đục được chuẩn bị ngay trước khi dùng và có thể bảo quản tối đa trong vòng 24 h.

### Hỗn dịch đối chiếu

Các hỗn dịch đối chiếu từ I tới IV được chuẩn bị như chỉ dẫn trong Bảng 9.2.

Mỗi hỗn dịch phải được trộn kỹ và lắc trước khi sử dụng.

*Bảng 9.2* - Các hỗn dịch đối chiếu

| | I | II | III | IV |
|---|---|---|---|---|
| Chuẩn đục (ml) | 5,0 | 10,0 | 30,0 | 50,0 |
| Nước | 95,0 | 90,0 | 70,0 | 50,0 |

### Cách thử

Việc so sánh được tiến hành trong các ống nghiệm giống nhau, bằng thủy tinh trung tính, trong, không màu, đáy bằng, có đường kính trong khoảng từ 15 mm đến 25 mm. Chiều dày của lớp dung dịch thử và của hỗn dịch đối chiếu là 40 mm. Hỗn dịch đối chiếu sau khi pha 5 min phải được so sánh ngay với dung dịch cần thử bằng cách quan sát chất lỏng từ trên xuống trong các ống nghiệm trên nền đen dưới ánh sáng khuếch tán ban ngày. Ánh sáng khuếch tán phải phù hợp để có thể phân biệt được hỗn dịch đối chiếu I với nước cất và với hỗn dịch đối chiếu II.

### Cách đánh giá kết quả

Một chất lỏng được coi như trong nếu nó tương đương với độ trong của *nước cất* hay của dung môi đã dùng khi thử nghiệm trong những điều kiện như đã mô tả, hoặc nếu chất lỏng đó hơi đục nhẹ thì cũng không được đục quá hỗn dịch đối chiếu I.

Các yêu cầu khác nhau về độ đục được biểu thị theo hỗn dịch đối chiếu I, II, III, và IV.

## 9.3 XÁC ĐỊNH MÀU SẮC CỦA DUNG DỊCH

Việc xác định màu sắc của dung dịch trong phạm vi nâu - vàng - đỏ được tiến hành theo một trong hai phương pháp dưới đây, tùy theo chỉ dẫn trong chuyên luận. Một dung dịch được coi là không màu nếu nó giống như *nước cất* hay dung môi dùng để pha dung dịch đó, hoặc có màu không thẫm hơn dung dịch màu đối chiếu $N_9$.

### Phương pháp 1

Dùng những ống thủy tinh trung tính, không màu, trong suốt và giống hệt nhau, có đường kính ngoài 12 mm để so sánh 2,0 ml dung dịch thử với 2,0 ml *nước cất*, hoặc dung môi, hoặc dung dịch màu đối chiếu (Bảng 9.3.2a tới 9.3.2e) theo chỉ dẫn trong chuyên luận. Quan sát màu của dung dịch theo chiều ngang ống nghiệm, dưới ánh sáng khuếch tán, trên nền trắng.

### Phương pháp 2

Dùng những ống thủy tinh trung tính, đáy bằng, không màu, trong suốt, giống hệt nhau và có đường kính trong từ 15 mm đến 25 mm để so sánh lớp dung dịch thử với *nước cất*, hoặc

dung môi, hoặc dung dịch màu đối chiếu (Bảng 9.3.2 a tới Bảng 9.3.2 e) theo chỉ dẫn trong chuyên luận, bề dày của lớp chất lỏng là 40 mm. Quan sát màu của dung dịch dọc theo trục ống, dưới ánh sáng khuếch tán trên nền trắng.

### Pha chế các dung dịch gốc

***Dung môi A:*** 25 ml *acid hydrocloric (TT)* hòa tan trong 975 ml *nước cất*.

***Dung dịch gốc màu vàng:*** Hòa tan 46 g *sắt (III) clorid (TT)* trong 900 ml dung môi A, cho vừa đủ dung môi A thành 1000 ml. Chuẩn độ rồi điều chỉnh bằng dung môi A để có dung dịch chứa 45 mg $FeCl_3.6H_2O$ trong 1 ml. Bảo quản tránh ánh sáng.

Chuẩn độ: Cho vào một bình nón dung tích 250 ml có nút mài 10 ml dung dịch gốc màu vàng, 15 ml *nước*, 5 ml *acid hydrocloric (TT)* và 4 g *kali iodid (TT)*. Đậy nút, lắc đều rồi để yên 15 min ở chỗ tối. Thêm vào bình 100 ml *nước* và chuẩn độ iod giải phóng bằng *dung dịch natri thiosulfat 0,1 N (CĐ)*, chỉ thị là 0,5 ml *dung dịch hồ tinh bột (TT)* cho vào lúc gần cuối chuẩn độ.

1 ml *dung dịch natri thiosulfat 0,1 N (CĐ)* tương đương với 27,03 mg $FeCl_3.6H_2O$.

***Dung dịch gốc màu đỏ:*** Hòa tan 60 g *cobalt (II) clorid (TT)* trong 900 ml dung môi A, cho vừa đủ dung môi A thành 1000 ml. Chuẩn độ, rồi điều chỉnh bằng dung môi A để có dung dịch chứa 59,5 mg $CoCl_2.6H_2O$ trong 1 ml.

Chuẩn độ: Cho vào một bình nón dung tích 250 ml có nút mài 5 ml dung dịch gốc màu đỏ, 5 ml *dung dịch hydrogen peroxyd 10 tt (TT)* và 10 ml *dung dịch natri hydroxyd 30 % (TT)*. Đun sôi nhẹ trong 10 min, để nguội rồi thêm 60 ml *dung dịch acid sulfuric 1 M (TT)* và 2 g *kali iodid (TT)*. Đậy bình và lắc nhẹ cho tan tủa, chuẩn độ iod giải phóng bằng *dung dịch natri thiosulfat 0,1 N (CĐ)* với chỉ thị là 0,5 ml *dung dịch hồ tinh bột (TT)* cho vào lúc gần cuối chuẩn độ. Dung dịch chuyển thành màu hồng khi chuẩn độ đến điểm tương đương.

1 ml *dung dịch natri thiosulfat 0,1 N (CĐ)* tương đương với 23,79 mg $CoCl_2.6H_2O$.

***Dung dịch gốc màu xanh:*** Hòa tan 63 g *đồng (II) sulfat (TT)* trong 900 ml dung môi A, cho vừa đủ dung môi A thành 1000 ml. Chuẩn độ, rồi điều chỉnh bằng dung môi A để có dung dịch chứa 62,4 mg $CuSO_4.5H_2O$ trong 1 ml.

Chuẩn độ: Cho vào một bình nón dung tích 250 ml có nút mài 10 ml dung dịch gốc màu xanh, 50 ml *nước*, 12 ml *dung dịch acid acetic 2 M (TT)* và 3 g *kali iodid (TT)*. Chuẩn độ iod giải phóng bằng *dung dịch natri thiosulfat 0,1 N (CĐ)* đến khi có màu nâu nhạt, chỉ thị là 0,5 ml *dung dịch hồ tinh bột (TT)* cho vào lúc gần cuối chuẩn độ.

1 ml *dung dịch natri thiosulfat 0,1 N (CĐ)* tương tương với 24,97 mg $CuSO_4.5H_2O$.

### Pha chế các dung dịch màu chuẩn

Dùng 3 dung dịch gốc để pha 5 dung dịch màu chuẩn theo Bảng 9.3.1

*Bảng 9.3.1* - Các dung dịch màu chuẩn

| Dung dịch màu chuẩn | Dung dịch gốc (ml) | | | Dung dịch acid hydrocloric 1 % (ml) |
|---|---|---|---|---|
| | Màu vàng | Màu đỏ | Màu xanh | |
| N (nâu) | 30 | 30 | 24 | 16 |
| VN (vàng nâu) | 24 | 10 | 4 | 62 |
| V (vàng) | 24 | 6 | 0 | 70 |
| VL (vàng lục) | 96 | 2 | 2 | 0 |
| Đ (đỏ) | 10 | 20 | 0 | 70 |

Pha chế các dung dịch màu đối chiếu (dung dịch màu mẫu) Dùng 5 dung dịch màu chuẩn pha các dung dịch màu đối chiếu theo các Bảng 9.3.2 a đến 9.3.2 e sau đây:

*Bảng 9.3.2 a* - Dung dịch màu đối chiếu N

| Dung dịch màu đối chiếu | Dung dịch màu chuẩn N (ml) | Dung dịch acid hydrocloric 1 % (ml) |
|---|---|---|
| $N_1$ | 75,0 | 25,0 |
| $N_2$ | 50,0 | 50,0 |
| $N_3$ | 37,5 | 62,5 |
| $N_4$ | 25,0 | 75,0 |
| $N_5$ | 12,5 | 87,5 |
| $N_6$ | 5,0 | 95,0 |
| $N_7$ | 2,5 | 97,5 |
| $N_8$ | 1,5 | 98,5 |
| $N_9$ | 1,0 | 99,0 |

*Bảng 9.3.2 b* - Dung dịch màu đối chiếu VN

| Dung dịch màu đối chiếu | Dung dịch màu chuẩn VN (ml) | Dung dịch acid hydrocloric 1 % (ml) |
|---|---|---|
| $VN_1$ | 100,0 | 0,0 |
| $VN_2$ | 75,0 | 25,0 |
| $VN_3$ | 50,0 | 50,0 |
| $VN_4$ | 25,0 | 75,0 |
| $VN_5$ | 12,5 | 87,5 |
| $VN_6$ | 5,0 | 95,0 |
| $VN_7$ | 2,5 | 97,5 |

*Bảng 9.3.2 c* - Dung dịch màu đối chiếu V

| Dung dịch màu đối chiếu | Dung dịch màu chuẩn V (ml) | Dung dịch acid hydrocloric 1 % (ml) |
|---|---|---|
| $V_1$ | 100,0 | 0,0 |
| $V_2$ | 75,0 | 25,0 |
| $V_3$ | 50,0 | 50,0 |
| $V_4$ | 25,0 | 75,0 |
| $V_5$ | 12,5 | 87,5 |
| $V_6$ | 5,0 | 95,0 |
| $V_7$ | 2,5 | 97,5 |

*Bảng 9.3.2 d* - Dung dịch màu đối chiếu VL

| Dung dịch màu đối chiếu | Dung dịch màu chuẩn VL (ml) | Dung dịch acid hydrocloric 1 % (ml) |
|---|---|---|
| $VL_1$ | 25,0 | 75,0 |
| $VL_2$ | 15,0 | 85,0 |
| $VL_3$ | 8,5 | 91,5 |
| $VL_4$ | 5,0 | 95,0 |
| $VL_5$ | 3,0 | 97,0 |
| $VL_6$ | 1,5 | 98,5 |
| $VL_7$ | 0,75 | 99,25 |

*Bảng 9.3.2 e* - Dung dịch màu đối chiếu Đ

| Dung dịch màu đối chiếu | Dung dịch màu chuẩn Đ (ml) | Dung dịch acid hydrocloric 1 % (ml) |
|---|---|---|
| $Đ_1$ | 100,0 | 0,0 |
| $Đ_2$ | 75,0 | 25,0 |
| $Đ_3$ | 50,0 | 50,0 |
| $Đ_4$ | 37,5 | 62,5 |
| $Đ_5$ | 25,0 | 75,0 |
| $Đ_6$ | 12,5 | 87,5 |
| $Đ_7$ | 5,0 | 95,0 |

**Bảo quản**

Với phương pháp 1, các dung dịch màu đối chiếu cần được bảo quản trong những ống thủy tinh trung tính, không màu, trong suốt có đường kính ngoài 12 mm, được hàn kín và tránh ánh sáng.

Với phương pháp 2, các dung dịch màu đối chiếu phải được chuẩn bị ngay trước khi dùng từ dung dịch màu chuẩn.

## 9.4 XÁC ĐỊNH GIỚI HẠN CÁC TẠP CHẤT

### 9.4.1 Amoni

Dùng phương pháp A, trừ khi có chỉ dẫn khác trong chuyên luận.

***Phương pháp A***

Hòa tan một lượng chế phẩm thử như chỉ dẫn trong chuyên luận với 14 ml *nước* trong một ống nghiệm có nút mài, kiềm hoá nếu cần bằng *dung dịch natri hydroxyd 2 M (TT)*, thêm *nước* vừa đủ 15 ml. Thêm 0,3 ml *dung dịch kali tetraiodomercurat kiềm (TT)*, lắc đều rồi để yên 5 min. So sánh màu tạo thành trong ống thử với màu mẫu được chuẩn bị đồng thời trong cùng điều kiện như dung dịch thử. Màu mẫu: Lấy chính xác 10 ml *dung dịch amoni mẫu 1 phần triệu $NH_4$ (TT)* cho vào một ống nghiệm, pha loãng với *nước* thành 15 ml. Thêm 0,3 ml *dung dịch kali tetraiodomercurat kiềm (TT)*, lắc đều rồi để yên 5 min.

Khi so màu, quan sát dọc theo trục ống nghiệm, dưới ánh sáng khuếch tán trên nền trắng. Màu vàng xuất hiện trong ống thử không được đậm hơn màu trong ống mẫu.

***Phương pháp B***

Cho một lượng chế phẩm (theo chỉ dẫn trong chuyên luận riêng) đã nghiền mịn vào một bình 25 ml có nút đậy bằng polyethylen và hòa tan hoặc phân tán trong 1 ml *nước*. Thêm 0,3 g *magnesi oxyd nặng (TT)*. Đậy bình ngay sau khi đã đặt xuống dưới nắp polyethylen một mẩu *giấy tẩm mangan bạc (TT)* hình vuông có cạnh 5 mm đã được làm ẩm bằng vài giọt *nước*. Lắc xoay tròn bình, tránh chất lỏng bắn lên và để yên ở 40 °C trong 30 min.

Màu xám nếu xuất hiện trên mẩu giấy tẩm mangan bạc ở bình thử không được đậm hơn ở bình mẫu được chuẩn bị đồng thời trong cùng điều kiện với lượng *dung dịch amoni mẫu 1 phần triệu $NH_4$ (TT)* đã được chỉ dẫn trong chuyên luận, 1 ml *nước* và 0,3 g *magnesi oxyd nặng (TT)*.

### 9.4.2 Arsen

Dùng phương pháp A, trừ khi có chỉ dẫn khác trong chuyên luận.

***Phương pháp A***

Dụng cụ: Bộ dụng cụ thử arsen (Hình 9.4.2) gồm một bình nón nút mài cỡ 100 ml được đậy bằng nút thủy tinh mài, xuyên qua nút có một ống thủy tinh dài khoảng 200 mm, đường kính trong là 5 mm. Phần dưới của ống thủy tinh được kéo nhỏ lại để có đường kính trong là 1,0 mm và cách đầu ống 15 mm có một lỗ trên thành ống với đường kính 2 mm đến 3 mm. Khi gắn ống thủy tinh vào nút thì lỗ này phải ở cách mặt dưới của nút ít nhất là 3 mm. Đầu trên của ống thủy tinh có một đĩa tròn phẳng, mặt phẳng của đĩa vuông góc với trục ống.

Một ống thủy tinh thứ hai dài 30 mm, có cùng đường kính và cũng có đĩa tròn phẳng tương tự như ống thứ nhất, đặt tiếp xúc mặt đĩa tròn với ống thứ nhất và được giữ chặt với ống thứ nhất bằng 2 dây lò xo.

Tiến hành: Cho xuống đầu thấp của ống thủy tinh dài khoảng 50 mg đến 60 mg *bông tẩm chì acetat (TT)* hoặc một miếng gạc cotton bọc một mẩu *giấy tẩm chì acetat (TT)* có khối lượng 50 mg đến 60 mg. Đặt một miếng *giấy tẩm thủy ngân (II) bromid (TT)*, hình tròn hay hình vuông, có kích thước đủ để phủ kín lỗ tròn giữa 2 ống thủy tinh (15 mm × 15 mm), giữ chặt 2 ống thủy tinh bằng 2 dây lò xo. Cho vào bình nón một lượng chế phẩm thử theo chỉ dẫn trong chuyên luận. Hòa tan hoặc pha loãng (nếu chế phẩm thử là dung dịch) với *nước* thành 25 ml. Thêm 15 ml *acid hydrocloric (TT)*, 0,1 ml *dung dịch thiếc (II) clorid AsT (TT)* và 5 ml *dung dịch kali iodid 16,6 % (TT)*. Để yên 15 min rồi thêm 5 g *kẽm không có arsen (TT)*. Đậy ngay bình nón bằng nút đã lắp sẵn giấy thử ở trên và ngâm bình trong nước ở nhiệt độ sao cho khí được giải phóng đều đặn. Song song tiến hành một mẫu so sánh trong cùng điều kiện, dùng 1 ml *dung dịch arsen mẫu 1 phần triệu As (TT)* hòa loãng với *nước* thành 25 ml thay cho chế phẩm thử.

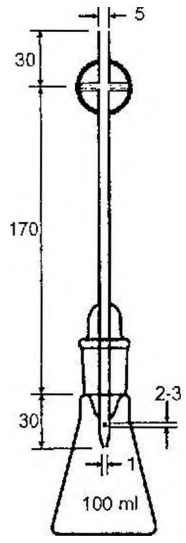
Sau ít nhất 2 h lấy các miếng *giấy tẩm thủy ngân (II) bromid (TT)* ra so sánh các vết màu. Vết màu nếu có trên miếng giấy của bình thử phải không được đậm hơn vết màu trên miếng giấy của bình mẫu.

***Phương pháp B***

Lấy một lượng chế phẩm thử theo chỉ dẫn trong chuyên luận cho vào một ống nghiệm chứa 4 ml *acid hydrocloric (TT)* và khoảng 5 mg *kali iodid (TT)*, thêm 3 ml *dung dịch hypophosphit (TT)*. Đun cách thủy hỗn hợp trong 15 min, thỉnh thoảng lắc.

Tiến hành song song một mẫu so sánh trong cùng điều kiện, thay chế phẩm thử bằng 0,5 ml *dung dịch arsen mẫu 10 phần triệu As (TT)*.

So sánh màu trong hai ống. Màu trong ống thử không được đậm hơn màu trong ống so sánh.




*Hình 9.4.2* - Dụng cụ thử arsen
*(Kích thước tính bằng milimét)*

### 9.4.3 Calci

Các dung dịch dùng trong phép thử này phải được chuẩn bị với *nước cất*.

Thêm 1 ml *dung dịch amoni oxalat 4 % (TT)* vào 0,2 ml *dung dịch calci mẫu 100 phần triệu Ca trong ethanol 96 % (TT)*. Sau 1 min, thêm hỗn hợp gồm 1 ml *dung dịch acid acetic 2 M (TT)* và 15 ml dung dịch chế phẩm thử như chỉ dẫn trong chuyên luận và lắc.

Sau 15 min, so sánh độ đục tạo thành trong ống thử với độ đục mẫu được chuẩn bị đồng thời trong cùng điều kiện nhưng thay dung dịch chế phẩm thử bằng hỗn hợp gồm 10 ml *dung dịch calci mẫu 10 phần triệu Ca (TT)* và 5 ml *nước*.

Ống thử phải không được đục hơn ống mẫu.

### 9.4.4 Chì trong đường

Tiến hành theo phương pháp quang phổ hấp thụ nguyên tử (Phụ lục 4.4, phương pháp 2), dùng ngọn lửa acetylen - không khí, đèn cathod rỗng chì và các dung dịch sau:

*Dung dịch thử:* Hòa tan 20,0 g chế phẩm thử trong *dung dịch acid acetic 1 M (TT)* để được 100,0 ml. Thêm 2,0 ml dung dịch bão hòa *amoni pyrolidin dithiocarbamat (TT)* và 10,0 ml *4-methylpentan-2-on (TT)*, lắc trong 30 s, tránh ánh sáng. Để yên cho tách lớp và lấy lớp 4-methylpentan-2-on.

*Các dung dịch đối chiếu:* Chuẩn bị 3 dung dịch đối chiếu trong cùng điều kiện như dung dịch thử, bằng cách thêm riêng biệt 0,5 ml; 1,0 ml; 1,5 ml *dung dịch chì mẫu 10 phần triệu Pb (TT)* vào mỗi bình đã có 20,0 g chế phẩm thử.

Chuẩn bị một mẫu trắng trong cùng điều kiện giống như dung dịch thử nhưng không có chế phẩm thử.

Đo độ hấp thụ của dung dịch thử, 3 dung dịch đối chiếu và mẫu trắng ở cực đại 283,3 nm, dùng dung dịch trắng để hiệu chỉnh điểm 0 của máy. Vẽ đường biểu diễn sự phụ thuộc giữa độ hấp thụ với nồng độ chì trong các dung dịch và xác định hàm lượng của chì trong chế phẩm thử.

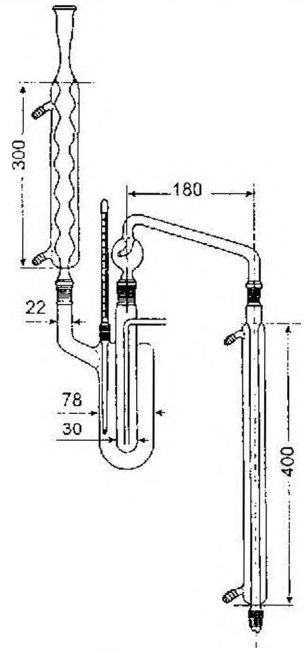
Hàm lượng chì không được lớn hơn 0,5 phần triệu trừ khi có chỉ dẫn khác.

### 9.4.5 Clorid

Chuẩn bị dung dịch thử như chỉ dẫn trong chuyên luận, cho vào một ống nghiệm, pha loãng với *nước* đến 15 ml. Thêm 1 ml *dung dịch acid nitric 2 M (TT)* và 1 ml *dung dịch bạc nitrat 2 % (TT)*. Để yên 5 min, tránh ánh sáng. So sánh độ đục tạo thành trong ống thử với độ đục trong ống mẫu được chuẩn bị đồng thời trong cùng điều kiện nhưng thay dung dịch thử bằng hỗn hợp gồm 10 ml *dung dịch clorid mẫu 5 phần triệu Cl (TT)* và 5 ml *nước*. Quan sát dọc theo trục ống nghiệm, dưới ánh sáng khuếch tán trên nền đen. Ống thử không được đục hơn ống mẫu.

### 9.4.6 Fluorid

Dùng thiết bị cất như mô tả trong Hình 9.4.6 bao gồm một ống nghiệm nút mài nối với một ống ngưng ruột thẳng. Ống nghiệm được đặt trong một bộ phận đun bằng thủy tinh chịu nhiệt kín có nối với một ống sinh hàn và nhiệt kế.




*Hình 9.4.6* - Dụng cụ thử giới hạn fluorid
*(Kích thước tính bằng milimét)*

Cân và chuyển một lượng chế phẩm như chỉ dẫn trong chuyên luận vào ống nghiệm, thêm 0,1 g cát đã được rửa bằng acid và 20 ml *dung dịch acid sulfuric* 50 % (tt/tt). Rót *tetracloroethan (TT)* vào bình đun, đun nóng và giữ ở nhiệt độ sôi của tetracloroethan (146 °C). Chưng cất và hứng dịch cất vào bình định mức 100 ml có chứa sẵn 0,3 ml *dung dịch natri hydroxyd 0,1 N (CĐ)* và 0,1 ml *dung dịch phenolphtalein (TT)*. Duy trì thể tích ở trong ống nghiệm là 20 ml trong suốt quá trình cất, và giữ cho dịch trong bình cất luôn luôn kiềm bằng cách thêm *dung dịch natri hydroxyd 0,1 N (CĐ)* nếu cần. Thêm nước vào bình hứng dịch cất vừa đủ 100 ml, được dung dịch thử. Chuẩn bị mẫu chuẩn với cùng điều kiện như mẫu thử nhưng thay chế phẩm bằng 5 ml *dung dịch fluorid chuẩn 10 phần triệu F (TT)*. Lấy 2 ống nghiệm nút mài, thêm riêng rẽ 20 ml dung dịch thử và dung dịch chuẩn và thêm 5 ml *thuốc thử acid aminomethylalizarindiacetic (TT)* vào mỗi dung dịch, sau 20 min nếu dung dịch thử có màu xanh (ban đầu là màu đỏ) thì không được đậm hơn màu của dung dịch đối chiếu.

### 9.4.7 Kali

Thêm 2 ml *dung dịch natri tetraphenylborat 1 % (TT)* mới pha vào 10 ml dung dịch chế phẩm thử đã chỉ dẫn trong chuyên luận, để yên 5 min. So sánh độ đục tạo thành trong ống thử với độ đục trong ống mẫu được chuẩn bị đồng thời trong cùng điều kiện một hỗn hợp của 5 ml *dung dịch kali mẫu 20 phần triệu K (TT)* và 5 ml *nước*.

Độ đục trong ống thử không được đậm hơn độ đục trong ống mẫu.

### 9.4.8 Kim loại nặng

Các phương pháp sau đây yêu cầu dùng *dung dịch thioacetamid (TT)*. Có thể dùng *dung dịch natri sulfid (TT)* (0,1 ml) để thay thế. Vì các phương pháp dưới đây được xây dựng dựa trên sử dụng *dung dịch thioacetamid (TT)* nên nếu sử dụng *dung dịch natri sulfid (TT)* thay thế thì phải chuẩn bị thêm dung dịch kiểm tra khi thử theo phương pháp 1, 2 và 8. Dung dịch kiểm tra được chuẩn bị từ lượng chế phẩm giống như lượng chế phẩm dùng để chuẩn bị dung dịch thử và thêm thể tích dung dịch chì mẫu giống như thể tích dung dịch chì mẫu dùng để chuẩn bị dung dịch đối chiếu. Phép thử chỉ có giá trị khi dung dịch kiểm tra có màu đậm ít nhất là bằng màu của dung dịch đối chiếu.

#### *Phương pháp 1*

*Dung dịch thử:* 12 ml dung dịch chế phẩm được chuẩn bị như chỉ dẫn trong chuyên luận.

*Dung dịch đối chiếu:* Hỗn hợp gồm 10 ml *dung dịch chì mẫu 1 phần triệu Pb (TT)* hoặc *dung dịch chì mẫu 2 phần triệu Pb (TT)* tùy theo chỉ dẫn trong chuyên luận và 2 ml dung dịch thử.

*Dung dịch mẫu trắng:* Hỗn hợp gồm 10 ml *nước* và 2 ml dung dịch thử.

Thêm 2 ml *dung dịch đệm acetat pH 3,5 (TT)* vào mỗi dung dịch trên. Lắc đều và thêm dung dịch thu được vào 1,2 ml *dung dịch thioacetamid (TT)*, lắc ngay. Quan sát các dung dịch sau 2 min.

*Tính thích hợp của phép thử:* Dung dịch đối chiếu phải có nâu nâu nhạt khi so sánh với dung dịch mẫu trắng.

*Đánh giá kết quả:* Màu nâu của dung dịch thử, nếu có, không được đậm hơn màu của dung dịch đối chiếu.

Nếu như khó đánh giá kết quả, lọc các dung dịch qua màng lọc 0,45 µm nếu không có chỉ dẫn khác. Tiến hành lọc chậm và đều với áp lực lên piston nhẹ nhàng và liên tục. So sánh màu sắc của các vết trên màng lọc thu được từ các dung dịch.

#### *Phương pháp 2*

*Dung dịch thử:* 12 ml dung dịch chế phẩm được chuẩn bị như chỉ dẫn trong chuyên luận, dùng dung môi hữu cơ có chứa một tỷ lệ nước tối thiểu [Ví dụ như *1,4-dioxan (TT)* hoặc *aceton (TT)* có chứa 15 % *nước* (tt/tt)].

*Dung dịch đối chiếu:* Hỗn hợp gồm 10 ml *dung dịch chì mẫu (1 hay 2 phần triệu Pb* tùy theo chỉ dẫn trong chuyên luận) và 2 ml dung dịch thử.

Dung dịch ion chì mẫu 1 hoặc 2 phần triệu Pb được pha chế bằng cách pha loãng *dung dịch chì mẫu 100 phần triệu Pb (TT)* với dung môi được dùng để pha dung dịch thử.

*Dung dịch mẫu trắng:* Hỗn hợp gồm 10 ml dung môi được dùng để pha dung dịch thử và 2 ml dung dịch thử.

Thêm 2 ml *dung dịch đệm acetat pH 3,5 (TT)* vào mỗi dung dịch trên. Lắc đều và thêm dung dịch thu được vào 1,2 ml *dung dịch thioacetamid (TT)*, lắc đều ngay. Quan sát các dung dịch sau 2 min.

*Tính thích hợp của phép thử:* Dung dịch đối chiếu phải có nâu nâu nhạt khi so sánh với dung dịch mẫu trắng.

*Đánh giá kết quả:* Màu nâu của dung dịch thử, nếu có, không được đậm hơn màu của dung dịch đối chiếu.

Nếu như khó đánh giá kết quả, lọc các dung dịch qua màng lọc 0,45 µm nếu không có chỉ dẫn khác. Tiến hành lọc chậm và đều với áp lực lên piston nhẹ nhàng và liên tục. So sánh màu sắc của các vết trên màng lọc thu được từ các dung dịch.

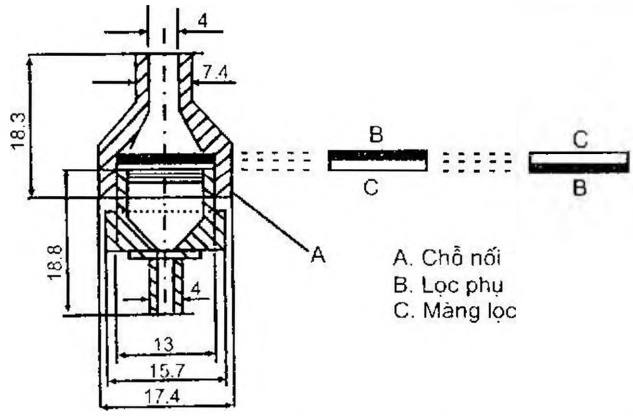
#### *Phương pháp 3*

*Dung dịch thử:* Lấy một lượng chế phẩm như chỉ dẫn trong chuyên luận (không quá 2 g) cho vào một chén nung sứ. Thêm 4 ml *dung dịch magnesi sulfat 25 % trong acid sulfuric 1 M (TT)*. Trộn đều bằng một đũa thủy tinh nhỏ rồi đun nóng cẩn thận. Nếu hỗn hợp là một chất lỏng thì làm bay hơi từ từ trên cách thủy đến khô. Đốt dần dần để chế phẩm cháy hết và tiếp tục đốt cho đến khi thu được cắn có màu gần trắng hay ít nhất là xám nhạt. Tiến hành nung ở nhiệt độ không quá 800 °C. Để nguội. Làm ẩm cắn bằng vài giọt *dung dịch acid sulfuric 1 M (TT)*. Bốc hơi, nung lại và để nguội. Toàn bộ thời gian nung không được quá 2 h. Hòa tan cắn trong *dung dịch acid hydrocloric 2 M (TT)* 2 lần, mỗi lần dùng 5 ml. Thêm 0,1 ml *dung dịch phenolphtalein (TT)*, cho từng giọt *amoniac (TT)* đến khi có màu hồng. Để nguội, thêm *acid acetic băng (TT)* đến khi dung dịch mất màu và thêm thừa 0,5 ml nữa. Lọc nếu cần và pha loãng dung dịch với *nước* thành 20 ml.

*Dung dịch đối chiếu:* Tiến hành theo chỉ dẫn ở phần dung dịch thử, dùng một thể tích *dung dịch chì mẫu 10 phần triệu Pb (TT)* như đã ghi trong chuyên luận thay cho chế phẩm. Thêm 2 ml dung dịch thử vào 10 ml dung dịch thu được.
*Dung dịch kiểm tra:* Tiến hành theo chỉ dẫn ở phần dung dịch thử, dùng lượng chế phẩm như lượng dùng để chuẩn bị dung dịch thử và thể tích *dung dịch chì mẫu 10 phần triệu Pb (TT)* như thể tích dùng để chuẩn bị dung dịch đối chiếu. Thêm 2 ml dung dịch thử vào 10 ml dung dịch thu được.
*Dung dịch mẫu trắng:* Hỗn hợp gồm 10 ml *nước* và 2 ml dung dịch thử.
Lấy 12 ml của mỗi dung dịch trên, thêm 2 ml *dung dịch đệm acetat pH 3,5 (TT)*. Lắc đều và thêm dung dịch thu được vào 1,2 ml *dung dịch thioacetamid (TT)*, lắc đều ngay. Quan sát các dung dịch sau 2 min.
*Tính thích hợp của phép thử:* Dung dịch đối chiếu phải có nâu nâu nhạt khi so sánh với dung dịch mẫu trắng và dung dịch kiểm tra phải có màu ít nhất là đậm bằng màu của dung dịch đối chiếu.
*Đánh giá kết quả:* Màu nâu của dung dịch thử, nếu có, không được đậm hơn màu của dung dịch đối chiếu.
Nếu như khó đánh giá kết quả, lọc các dung dịch qua màng lọc 0,45 µm nếu không có chỉ dẫn khác. Tiến hành lọc chậm và đều với áp lực lên piston nhẹ nhàng và liên tục. So sánh màu sắc của các vết trên màng lọc thu được từ các dung dịch.

***Phương pháp 4***
*Dung dịch thử:* Trộn đều một lượng chế phẩm như chỉ dẫn trong chuyên luận với 0,5 g *magnesi oxyd (TT)* trong một chén sứ. Nung đỏ hỗn hợp cho đến khi thu được một khối đồng nhất màu trắng hay trắng xám. Nếu sau khi nung 30 min mà hỗn hợp vẫn có màu thì để nguội, dùng đũa thủy tinh trộn đều rồi nung lại. Nếu cần, lặp lại thao tác đó. Cuối cùng nung ở 800 °C trong 1 h. Hòa tan cắn trong hỗn hợp đồng thể tích của *dung dịch acid hydrocloric 2 M (TT)* và *nước*, 2 lần, mỗi lần dùng 5 ml. Thêm 0,1 ml *dung dịch phenolphtalein (TT)*, cho từng giọt *amoniac (TT)* đến khi có màu hồng. Để nguội, thêm *acid acetic băng (TT)* đến khi dung dịch mất màu và thêm thừa 0,5 ml nữa. Lọc nếu cần và pha loãng dung dịch với *nước* thành 20 ml.
*Dung dịch đối chiếu:* Lấy thể tích *dung dịch chì mẫu 10 phần triệu Pb (TT)* như đã ghi trong chuyên luận, làm khô ở 100 °C đến 105 °C, thay cho chế phẩm và tiến hành theo chỉ dẫn ở phần dung dịch thử. Thêm 2 ml dung dịch thử vào 10 ml dung dịch thu được.
*Dung dịch kiểm tra:* Lấy lượng chế phẩm như lượng dùng để chuẩn bị dung dịch thử và thể tích *dung dịch chì mẫu 10 phần triệu Pb (TT)* như thể tích dùng để chuẩn bị dung dịch đối chiếu, làm khô ở 100 °C đến 105 °C và tiến hành theo chỉ dẫn ở phần dung dịch thử. Thêm 2 ml dung dịch thử vào 10 ml dung dịch thu được.
*Dung dịch mẫu trắng:* Hỗn hợp gồm 10 ml *nước* và 2 ml dung dịch thử.
Lấy 12 ml của mỗi dung dịch trên, thêm 2 ml *dung dịch đệm acetat pH 3,5 (TT)*. Lắc đều và thêm dung dịch thu được vào 1,2 ml *dung dịch thioacetamid (TT)*, lắc đều ngay. Quan sát các dung dịch sau 2 min.
*Tính thích hợp của phép thử:* Dung dịch đối chiếu phải có nâu nâu nhạt khi so sánh với dung dịch mẫu trắng và dung dịch kiểm tra phải có màu ít nhất là đậm bằng màu của dung dịch đối chiếu.
*Đánh giá kết quả:* Màu nâu của dung dịch thử, nếu có, không được đậm hơn màu của dung dịch đối chiếu.
Nếu như khó đánh giá kết quả, lọc các dung dịch qua màng lọc 0,45 µm nếu không có chỉ dẫn khác. Tiến hành lọc chậm và đều với áp lực lên piston nhẹ nhàng và liên tục. So sánh màu sắc của các vết trên màng lọc thu được từ các dung dịch.

***Phương pháp 5***
*Dung dịch thử:* Hòa tan một lượng chế phẩm như chỉ dẫn trong chuyên luận trong 30 ml *nước* hay trong thể tích như chỉ dẫn.
*Dung dịch đối chiếu:* Nếu không có chỉ dẫn khác, pha loãng thể tích *dung dịch chì mẫu 1 phần triệu Pb (TT)* như chỉ dẫn trong chuyên luận thành thể tích bằng thể tích của dung dịch thử.
Chuẩn bị một thiết bị lọc bằng cách lắp thân một bơm tiêm, không có piston, dung tích 50 ml với một giá đỡ có chứa, trên mặt đĩa, một màng lọc (Kích thước lỗ 3 µm) và phía trên có màng lọc phụ (Hình 9.4.8).
Chuyển dung dịch thử vào bơm tiêm, lắp piston, ấn nhẹ và đều đến khi dung dịch được lọc hết. Tháo giá đỡ và lấy màng lọc phụ ra, kiểm tra xem màng lọc có bị nhiễm bẩn không, nếu cần thì thay màng lọc và lọc lại trong cùng điều kiện.
Thêm 2 ml *dung dịch đệm acetat pH 3,5 (TT)* vào toàn bộ hay một phần dịch lọc như chỉ dẫn ở chuyên luận, lắc đều và thêm dung dịch thu được vào 1,2 ml *dung dịch thioacetamid (TT)*, lắc đều ngay và để yên 10 min. Lọc lại như chỉ dẫn ở trên nhưng đảo trật tự màng lọc, dung dịch qua màng lọc rồi mới qua màng lọc phụ. Quá trình lọc phải được thực hiện từ từ và đều bằng cách ấn piston nhẹ nhàng và liên tục. Sau khi lọc xong lấy màng lọc ra, làm khô bằng cách ép trên giấy lọc.
Song song tiến hành như chỉ dẫn ở trên với dung dịch đối chiếu.




*Hình 9.4.8* - Dụng cụ thử giới hạn kim loại nặng
*(Kích thước tính bằng milimét)*

*Đánh giá kết quả:* Màu của vết thu được từ dung dịch thử không được đậm màu hơn màu của vết thu được từ dung dịch đối chiếu.

***Phương pháp 6***

*Dung dịch thử:* Lấy một lượng chế phẩm như chỉ dẫn trong chuyên luận vào một bình Kjeldahl khô và sạch dung tích 100 ml (có thể dùng bình dung tích 300 ml nếu phản ứng tạo bọt nhiều). Giữ bình nghiêng một góc 45°. Nếu chế phẩm là chất rắn, thêm vừa đủ một thể tích *hỗn hợp acid* gồm 8 ml *acid sulfuric (TT)* và 10 ml *acid nitric (TT)* để làm ẩm toàn bộ mẫu. Nếu chế phẩm là chất lỏng, thêm vài ml *hỗn hợp acid*. Đun nóng nhẹ đến khi phản ứng bắt đầu, đợi phản ứng giảm bớt và tiếp tục thêm từng phần *hỗn hợp acid*, đun nóng sau mỗi lần thêm, đến khi hết 18 ml *hỗn hợp acid*. Tăng nhiệt độ và đun sôi nhẹ đến khi dung dịch thẫm màu. Để nguội, thêm 2 ml *acid nitric (TT)* và đun nóng đến khi dung dịch thẫm màu. Tiếp tục đun và thêm *acid nitric (TT)* đến khi dung dịch không còn thẫm màu thêm nữa. Đun nóng mạnh đến khi có khói trắng, dày đặc tạo thành. Để nguội, thêm cẩn thận 5 ml *nước*, đun sôi nhẹ đến khi có khói trắng, dày đặc tạo thành và tiếp tục đun đến khi còn 2 ml đến 3 ml. Để nguội, thêm cẩn thận 5 ml *nước* và quan sát màu của dung dịch. Nếu dung dịch có màu vàng, thêm cẩn thận 1 ml *dung dịch hydrogen peroxyd đậm đặc (TT)* và tiếp tục đun đến khi có khói trắng, dày đặc tạo thành và dung dịch còn khoảng 2 ml đến 3 ml. Nếu dung dịch vẫn có màu vàng, lặp lại bước thêm 5 ml *nước* và 1 ml *dung dịch hydrogen peroxyd đậm đặc (TT)* đến khi dung dịch không màu. Để nguội, pha loãng cẩn thận với *nước* và tráng vào ống Nessler dung tích 50 ml sao cho thể tích dung dịch thu được không vượt quá 25 ml. Điều chỉnh pH dung dịch đến 3,0 - 4,0 bằng *amoniac (TT)* [có thể dùng *dung dịch amoniac 6 M (TT)* để điều chỉnh khi đến gần khoảng pH yêu cầu], dùng chỉ thị ngoại là giấy chỉ thị có khoảng chỉ thị pH hẹp. Thêm *nước* để được 40 ml và trộn đều. Thêm 2 ml *dung dịch đệm acetat pH 3,5 (TT)*. Lắc đều và thêm dung dịch thu được vào 1,2 ml *dung dịch thioacetamid (TT)*. Lắc đều ngay. Pha loãng với *nước* thành 50 ml, lắc đều.

*Dung dịch mẫu (đối chiếu)*: Tiến hành đồng thời như dung dịch thử, thay chế phẩm bằng thể tích *dung dịch chì mẫu 10 phần triệu Pb (TT)* như chỉ dẫn trong chuyên luận.

*Dung dịch kiểm tra*: Tiến hành như dung dịch thử, dùng lượng chế phẩm như lượng dùng để chuẩn bị dung dịch thử và thể tích *dung dịch chì mẫu 10 phần triệu Pb (TT)* như thể tích dùng để chuẩn bị dung dịch đối chiếu.

*Dung dịch mẫu trắng*: Tiến hành như dung dịch thử nhưng không có chế phẩm.

Sau 2 min quan sát các dung dịch dọc theo chiều dài ống nghiệm trên nền trắng.

*Tính thích hợp của phép thử:* Dung dịch đối chiếu phải có nâu nâu nhạt khi so sánh với dung dịch mẫu trắng và dung dịch kiểm tra phải có màu ít nhất là đậm bằng màu của dung dịch đối chiếu.

*Đánh giá kết quả:* Màu nâu của dung dịch thử, nếu có, không được đậm hơn màu của dung dịch đối chiếu.

Nếu như khó đánh giá kết quả, lọc các dung dịch qua màng lọc 0,45 µm nếu không có chỉ dẫn khác. Tiến hành lọc chậm và đều với áp lực lên piston nhẹ nhàng và liên tục. So sánh màu sắc của các vết trên màng lọc thu được từ các dung dịch.

***Phương pháp 7***

*Chú ý: Khi dùng thiết bị phá mẫu áp suất cao phải theo đúng hướng dẫn vận hành và chú ý về an toàn do nhà sản xuất đưa ra. Thiết lập chu kỳ phá mẫu tùy thuộc kiểu lò vi sóng (Ví dụ kiểu lò kiểm soát năng lượng, kiểu lò kiểm soát nhiệt độ hoặc lò áp suất cao). Chu kỳ này phải theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Chu kỳ phá mẫu là phù hợp nếu thu được dung dịch trong.*

*Dung dịch thử:* Lấy một lượng chế phẩm như chỉ dẫn trong chuyên luận (không quá 0,5 g) vào một cốc phù hợp, sạch. Thêm lần lượt 2,7 ml *acid sulfuric (TT)*, 3,3 ml *acid nitric (TT)* và 2,0 ml *dung dịch hydrogen peroxyd đậm đặc (TT)* vừa thêm vừa khuấy đều bằng máy khuấy từ, để từng thuốc thử phản ứng với chế phẩm trước khi thêm thuốc thử tiếp theo. Chuyển hỗn hợp vào bình phá mẫu chịu áp suất cao (bằng fluoropolyme hoặc thạch anh), bình phải được làm khô trước khi cho mẫu vào.

*Dung dịch đối chiếu:* Tiến hành như dung dịch thử, thay chế phẩm bằng thể tích *dung dịch chì mẫu 10 phần triệu Pb (TT)* như chỉ dẫn trong chuyên luận.

*Dung dịch kiểm tra*: Tiến hành như dung dịch thử, dùng lượng chế phẩm như lượng dùng để chuẩn bị dung dịch thử và thể tích *dung dịch chì mẫu 10 phần triệu Pb (TT)* như thể tích dùng để chuẩn bị dung dịch đối chiếu.

*Dung dịch mẫu trắng*: Tiến hành như dung dịch thử nhưng không có chế phẩm.

Đậy bình phá mẫu và đặt vào trong lò vi sóng. Tiến hành phá mẫu bằng cách sử dụng nối tiếp 2 chương trình tách biệt thích hợp. Thiết lập các chương trình theo một số bước để có thể kiểm soát phản ứng, theo dõi áp suất, nhiệt độ hoặc năng lượng tùy theo kiểu lò vi sóng sử dụng. Sau khi áp dụng chương trình đầu tiên, để nguội các bình phá mẫu trước khi mở. Thêm vào mỗi bình 2 ml *dung dịch hydrogen peroxyd đậm đặc (TT)* và áp dụng chương trình thứ hai. Sau khi áp dụng chương trình thứ hai, để nguội các bình phá mẫu trước khi mở. Nếu cần thiết để có được dung dịch trong, lặp lại bước thêm *dung dịch hydrogen peroxyd đậm đặc (TT)* và chương trình phá mẫu thứ hai.

Để nguội, pha loãng cẩn thận với *nước* và tráng vào một bình nón sao cho thể tích dung dịch thu được không vượt quá 25 ml. Điều chỉnh pH dung dịch đến 3,0 - 4,0 bằng *amoniac (TT)* (có thể dùng *dung dịch amoniac 6 M (TT)* để điều chỉnh khi đến gần khoảng pH yêu cầu), dùng chỉ thị ngoại là giấy chỉ thị có khoảng chỉ thị pH hẹp. Để tránh làm nóng dung dịch, ngâm dung dịch trong nước đá và dùng máy khuấy từ. Pha loãng thành 40 ml với *nước* và trộn đều. Thêm 2 ml *dung dịch đệm acetat pH 3,5 (TT)*. Lắc đều và thêm dung dịch thu được vào 1,2 ml *dung dịch thioacetamid (TT)*. Lắc đều ngay. Pha loãng với *nước* thành 50 ml, lắc đều và để yên 2 min.

Lọc các dung dịch qua màng lọc thích hợp 0,45 µm nếu không có chỉ dẫn khác. Tiến hành lọc chậm và đều với áp lực lên piston nhẹ nhàng và liên tục. So sánh màu sắc của các vết trên màng lọc thu được từ các dung dịch trên.

*Tính thích hợp của phép thử:* Vết thu được từ dung dịch đối chiếu phải có màu nâu khi so sánh với vết thu được từ dung dịch mẫu trắng và vết thu được từ dung dịch kiểm tra phải có màu ít nhất là đậm bằng màu của vết thu được từ dung dịch đối chiếu.

*Đánh giá kết quả:* Màu nâu của vết thu được từ dung dịch thử không được đậm hơn màu của vết thu được từ dung dịch đối chiếu.

***Phương pháp 8***

*Dung dịch thử:* Hòa tan một lượng chế phẩm theo chỉ dẫn trong chuyên luận trong 20 ml dung môi hay hỗn hợp dung môi được chỉ dẫn trong chuyên luận.

*Dung dịch đối chiếu:* Pha loãng thể tích *dung dịch chì mẫu 10 phần triệu Pb (TT)* theo chỉ dẫn trong chuyên luận thành 20 ml với dung môi để pha dung dịch thử.

*Dung dịch mẫu trắng:* 20 ml dung môi để pha dung dịch thử.

Thêm 2 ml *dung dịch đệm acetat pH 3,5 (TT)* vào mỗi dung dịch trên. Lắc đều (Trong một vài trường hợp có tủa tạo thành, khi đó chuyên luận riêng có hướng dẫn hòa tan lại trong thể tích xác định của dung môi cho sẵn). Thêm dung dịch thu được vào 1,2 ml *dung dịch thioacetamid (TT)*. Lắc ngay và để yên 2 min. Lọc các dung dịch qua màng lọc 0,45 µm nếu không có chỉ dẫn khác. So sánh các vết trên màng lọc thu được từ các dung dịch trên.

*Tính thích hợp của phép thử:* Vết thu được từ dung dịch đối chiếu phải có màu đen nâu so với vết thu được từ dung dịch mẫu trắng.

*Đánh giá kết quả:* Màu đen nâu của vết thu được từ dung dịch thử không được đậm hơn màu của vết thu được từ dung dịch đối chiếu.

### 9.4.9 Nhôm

Chuyển dung dịch chế phẩm thử đã chỉ dẫn trong chuyên luận vào một bình gạn và chiết lần lượt với 20 ml, 20 ml và 10 ml dung dịch *8-hydroxyquinolin 0,5 % trong cloroform (TT)*. Gộp các dịch chiết cloroform và pha loãng tới 50,0 ml bằng *cloroform (TT)* (dung dịch thử).

Trừ khi có chỉ dẫn khác, chuẩn bị dung dịch trắng và dung dịch chuẩn trong cùng điều kiện như dung dịch thử.

Dung dịch trắng là hỗn hợp 10 ml *dung dịch đệm acetat pH 6,0* và 100 ml *nước*.

Dung dịch chuẩn là hỗn hợp 2 ml *dung dịch nhôm mẫu 2 phần triệu Al (TT)*, 10 ml *dung dịch đệm acetat pH 6,0* và 98 ml *nước*.

Đo huỳnh quang của dung dịch thử ($I_1$), dung dịch chuẩn ($I_2$) và dung dịch trắng ($I_3$) (Phụ lục 4.3) với bước sóng kích thích là 392 nm và một kính lọc phụ có dải truyền quang tập trung ở 518 nm, hoặc đặt một thiết bị làm đơn sắc ánh sáng để truyền quang ở chính bước sóng đó.

Cường độ huỳnh quang của dung dịch thử ($I_1$ - $I_3$) không được lớn hơn của dung dịch chuẩn ($I_2$ - $I_3$).

### 9.4.10 Nickel trong polyol

Tiến hành theo phương pháp II của quang phổ hấp thụ nguyên tử (Phụ lục 4.4), dùng ngọn lửa acetylen - không khí, đèn cathod rỗng nickel và các dung dịch sau:

*Dung dịch thử:* Hòa tan 20,0 g chế phẩm thử trong *dung dịch acid acetic 1 M (TT)* và pha loãng thành 100,0 ml với cùng dung môi. Thêm 2,0 ml dung dịch bão hòa *amoni pyrolidin dithiocarbamat (TT)* (khoảng 1 %) và 10,0 ml *4-methylpentan-2-on (TT)* lắc trong 30 s, tránh ánh sáng. Để yên cho tách lớp và lấy lớp methylpentanon.

*Dung dịch đối chiếu:* Chuẩn bị 3 dung dịch đối chiếu trong cùng điều kiện như dung dịch thử bằng cách thêm riêng biệt 0,5 ml; 1,0 ml; 1,5 ml *dung dịch nickel mẫu 10 phần triệu Ni (TT)* vào mỗi bình đã có 20,0 g chế phẩm thử.

Chuẩn bị một mẫu trắng trong cùng điều kiện giống như dung dịch thử, nhưng không có chế phẩm thử và dùng dung dịch này để hiệu chỉnh điểm "0" của máy.

Đo độ hấp thụ của dung dịch thử, 3 dung dịch đối chiếu và mẫu trắng ở cực đại 232,0 nm. Vẽ đường cong biểu diễn sự phụ thuộc giữa độ hấp thụ với nồng độ nickel trong các dung dịch và xác định hàm lượng của nickel trong chế phẩm thử.

Hàm lượng nickel không lớn hơn 1 phần triệu, trừ khi có chỉ dẫn khác.

### 9.4.11 Kim loại nặng trong dược liệu và trong dầu béo

Tiến hành bằng phương pháp quang phổ hấp thụ nguyên tử (Phụ lục 4.4).

*Chú ý: Khi dùng thiết bị phá mẫu áp suất cao và lò vi sóng dùng trong phòng thí nghiệm, phải thành thạo các thao tác an toàn và vận hành thiết bị mà nhà sản xuất đưa ra.*

#### Thiết bị

Bao gồm các bộ phận sau:

Bình phá mẫu bằng polytetrafluoroethylen thể tích 120 ml có nắp đậy kín, có van điều chỉnh áp suất bên trong và một ống bằng polytetrafluoroethylen để xả khí.

Một hệ thống giữ các bình phá mẫu kín với cùng một lực xoắn.

Lò vi sóng với tần số 2450 MHz có công suất điều chỉnh được từ 0 đến (630 ± 70) W, nối với một máy tính có phần mềm điều khiển chương trình. Vách lò phủ một lớp polytetrafluoroethylen. Lò có quạt hút thay đổi được tốc độ, có hệ thống đĩa quay và ống hút để xả khói.

Máy quang phổ hấp thụ nguyên tử dùng đèn cathod rỗng là nguồn phát xạ và đèn deuterium hiệu chỉnh đường nền. Máy được nối với:

a) Bộ hóa hơi nguyên tử không ngọn lửa lò graphit đối với cadimi, đồng, chì, sắt, nickel và kẽm.

b) Bộ hoá hơi hydrid đối với arsen và bộ phận hóa hơi lạnh cho thủy ngân, hoặc một bộ hoá hơi khác có tính năng phù hợp cho 2 nguyên tố này.

#### Tiến hành

Nếu dùng trang thiết bị khác với mô tả ở trên thì cần điều chỉnh các thông số thiết bị cho phù hợp.

Rửa sạch các đồ đựng bằng thủy tinh và dụng cụ thí nghiệm bằng *dung dịch acid nitric (TT)* 10 g/l trước khi dùng.

*Bảng 9.4.11.1* - Các thông số kỹ thuật để tiến hành phép thử

| | | Cd | Cu | Fe | Ni | Pb | Zn |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Bước sóng | nm | 228,8 | 324,8 | 248,3 | 232 | 283,5 | 213,9 |
| Độ rộng khe | nm | 0,5 | 0,5 | 0,2 | 0,2 | 0,5 | 0,5 |
| Cường độ đèn | mA | 6 | 7 | 5 | 10 | 5 | 7 |
| Nhiệt độ tro hóa | °C | 800 | 800 | 800 | 800 | 800 | 800 |
| Nhiệt độ nguyên tử hóa | °C | 1800 | 2300 | 2300 | 2500 | 2200 | 2000 |
| Hiệu chỉnh đường nền | | có | không | không | không | không | không |
| Tốc độ khí nitrogen | L/min | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 |

*Dung dịch thử:* Cân và chuyển vào bình phá mẫu một lượng chế phẩm theo chỉ dẫn trong chuyên luận (khoảng 0,5 g bột dược liệu hoặc dầu béo). Thêm 6 ml *acid nitric không có kim loại nặng (TT)* và 4 ml *acid hydrocloric không có kim loại nặng (TT)*. Đậy kín bình.

Đặt bình phá mẫu vào lò vi sóng. Tiến hành phá mẫu theo 3 bước như sau (dùng cho 7 bình chứa mẫu thử): 80 % công suất ở 15 min đầu, 100 % công suất ở 5 min tiếp theo và 80 % ở 20 min cuối.

Để nguội các bình ngoài không khí, thêm vào mỗi bình 4 ml *acid sulfuric không có kim loại nặng (TT)*. Lặp lại các bước phá mẫu như trên một lần nữa. Sau khi để nguội, mở bình phá mẫu ra, thu được dung dịch trong và không màu. Chuyển toàn bộ dung dịch vào bình định mức 50 ml, tráng bình phá mẫu 2 lần, mỗi lần với 15 ml *nước* và tập trung dịch tráng vào bình định mức trên. Thêm 1,0 ml dung dịch *magnesi nitrat (TT)* 1 % và 1,0 ml dung dịch *amoni dihydrophosphat (TT)* 10 %, thêm *nước* vừa đủ 50 ml.

*Dung dịch mẫu trắng:* Trộn 6 ml *acid nitric không có kim loại nặng (TT)* và 4 ml *acid hydrocloric không có kim loại nặng (TT)* vào bình phá mẫu và tiến hành phá mẫu như đối với dung dịch thử.

***Định lượng cadimi, đồng, sắt, chì, nickel và kẽm***

Xác định hàm lượng cadimi, đồng, sắt, chì, nickel, kẽm bằng phương pháp thêm chuẩn (Phụ lục 4.4), dùng các dung dịch đối chiếu của mỗi kim loại nặng và áp dụng các thông số kỹ thuật như Bảng 9.4.11.1. Độ hấp thụ của dung dịch mẫu trắng được tự động trừ vào độ hấp thụ của dung dịch thử.

***Định lượng arsen và thủy ngân***

Xác định hàm lượng arsen và thủy ngân trong mẫu dựa vào các dung dịch chuẩn arsen hoặc thủy ngân đã biết nồng độ bằng phương pháp xác định trực tiếp (Phụ lục 4.4) với hệ thống hoá hơi hydrid đối với arsen và hóa hơi lạnh đối với thủy ngân, hoặc với một thiết bị hóa hơi khác phù hợp.

***Arsen***

*Dung dịch mẫu:* Lấy 19,0 ml dung dịch thử hoặc trắng chuẩn bị như trên, thêm 1 ml dung dịch *kali iodid (TT)* 20 %. Để yên dung dịch ở nhiệt độ phòng trong 50 min hoặc ở 70 °C trong 4 min.

*Acid: Acid hydrocloric không có kim loại nặng (TT).*

*Dung dịch khử:* Dung dịch *natri borohydrid (TT)* 0,6 % trong dung dịch *natri hydroxyd (TT)* 0,5 %.

Áp dụng các thông số kỹ thuật trong Bảng 9.4.11.2.

***Thủy ngân***

*Dung dịch mẫu:* Dung dịch thử hoặc dung dịch trắng chuẩn bị như trên.

*Acid: Dung dịch chứa 515 g/l acid hydrocloric không có kim loại nặng (TT).*

*Dung dịch khử: Dung dịch thiếc (II) clorid* 1 % trong *dung dịch acid hydrocloric loãng không có kim loại nặng (TT).*

Áp dụng các thông số kỹ thuật trong Bảng 9.4.11.2.

*Bảng 9.4.11.2* - Các thông số kỹ thuật để tiến hành phép thử

| | | As | Hg |
|---|---|---|---|
| Bước sóng | nm | 193,7 | 253,7 |
| Độ rộng khe | nm | 0,2 | 0.5 |
| Cường độ đèn | mA | 10 | 4 |
| Tốc độ acid | ml/min | 1,0 | 1,0 |
| Tốc độ dung dịch khử | ml/min | 1,0 | 1,0 |
| Tốc độ dung dịch mẫu | ml/min | 7,0 | 7,0 |
| Buồng đo | | Thạch anh (làm nóng) | Thạch anh (không làm nóng) |
| Hiệu chỉnh đường nền | | Không | Không |
| Tốc độ khí nitrogen | L/min | 0.1 | 0.1 |

**9.4.12 Phosphat**

Thêm 4 ml *dung dịch sufomolybdic (TT)* vào 100 ml dung dịch đã được chuẩn bị, nếu cần thì trung hòa như chỉ dẫn. Lắc và thêm 0,1 ml *dung dịch thiếc (II) clorid ($TT_1$)*. Chuẩn bị dung dịch chuẩn trong cùng điều kiện, dùng 2 ml *dung dịch phosphat mẫu 5 phần triệu $PO_4$ (TT)* và 98 ml *nước*. Sau 10 min, lấy mỗi dung dịch 20 ml và so sánh màu. Màu trong ống thử phải không được đậm hơn màu trong ống chuẩn.

### 9.4.13 Sắt

Hòa tan một lượng chế phẩm thử quy định trong *nước* rồi pha loãng với *nước* thành 10 ml, hoặc lấy 10 ml dung dịch chế phẩm thử như chỉ dẫn trong chuyên luận cho vào một ống Nessler. Thêm 2 ml *dung dịch acid citric 20 %* và 0,1 ml *acid mercaptoacetic (TT)*. Lắc đều, kiềm hóa bằng *dung dịch amoniac 10 M (TT)* và pha với *nước* thành 20 ml. Để yên 5 min.

Chuẩn bị một dung dịch chuẩn trong cùng điều kiện, dùng 10 ml *dung dịch sắt mẫu 1 phần triệu Fe (TT)* thay cho dung dịch chế phẩm thử.

Màu hồng tạo thành trong dung dịch thử không được đậm hơn màu trong dung dịch chuẩn.

### 9.4.14 Sulfat

Các dung dịch dùng trong phép thử này phải được chuẩn bị trong *nước cất*.

Thêm 1 ml *dung dịch bari clorid 25 % (TT)* vào 1,5 ml *dung dịch sulfat mẫu 10 phần triệu $SO_4$ (TT)*, lắc và để yên 1 min. Thêm 15 ml dung dịch chế phẩm thử đã được chỉ dẫn trong chuyên luận hoặc thêm một lượng chế phẩm thử quy định đã hòa tan trong 15 ml *nước*, và 0,5 ml *dung dịch acid acetic 5 M (TT)*. Để yên 5 min.

Độ đục tạo thành trong ống thử không được đậm hơn trong ống chuẩn được chuẩn bị đồng thời trong cùng điều kiện, nhưng dùng 15 ml *dung dịch sulfat mẫu 10 phần triệu $SO_4$ (TT)* thay cho dung dịch chế phẩm thử.

### 9.4.15 Magnesi

Lấy 10 ml dung dịch thử được pha như chỉ dẫn của chuyên luận, thêm 0,1 g *natri tetraborat (TT)*. Nếu cần thì điều chỉnh pH của dung dịch tới khoảng từ 8,8 đến 9,2 bằng *dung dịch acid hydrocloric 2 M (TT)* hoặc *dung dịch natri hydroxyd 2 M (TT)*. Lắc 2 lần, mỗi lần với 5 ml *dung dịch 8-hydroxyquinolin 0,1 % trong cloroform (TT)*, mỗi lần lắc 1 min, để yên cho tách lớp rồi gạn bỏ lớp cloroform phía dưới. Thêm vào lớp nước 0,4 ml *n-butylamin (TT)* và 0,1 ml *triethanolamin (TT)*. Nếu cần thì điều chỉnh pH tới khoảng từ 10,5 đến 11,5. Thêm 4 ml *dung dịch 8-hydroxyquinolin 0,1 % trong cloroform (TT)*, lắc 1 min rồi để yên cho tách lớp. Nếu lớp cloroform có màu thì không được đậm hơn màu mẫu thu được khi tiến hành như trên với 1 ml *dung dịch magnesi mẫu 10 phần triệu Mg (TT)* và 9 ml *nước*.

### 9.4.16 Magnesi và kim loại kiềm thổ

Lấy 200 ml *nước*, thêm 0,1 g *hydroxylamin hydroclorid (TT)*; 10 ml *dung dịch đệm amoniac pH 10,0 (TT)*; 1 ml *dung dịch kẽm sulfat 0,1 M (CĐ)* và khoảng 15 mg *hỗn hợp đen eriocrom T (TT)*. Đun nóng tới 40 °C và chuẩn độ với *dung dịch trilon B 0,01 M (CĐ)* đến khi màu tím chuyển hẳn sang xanh. Thêm vào dung dịch một lượng chế phẩm đã được hòa tan trong 100 ml *nước*, hoặc một thể tích dung dịch chế phẩm, như chỉ dẫn trong chuyên luận. Nếu màu dung dịch chuyển sang tím, thì chuẩn độ tiếp với *dung dịch trilon B 0,01 M (CĐ)* đến khi màu hoàn toàn trở lại xanh. Thể tích *dung dịch trilon B 0,01 M (CĐ)* dùng trong lần chuẩn độ thứ hai không được quá lượng quy định.

## 9.5 XÁC ĐỊNH GIỚI HẠN CARBON MONOXYD TRONG KHÍ Y TẾ

### Thiết bị

Thiết bị (Hình 9.5) gồm các phần sau được mắc nối tiếp với nhau:

U1: Ống hình chữ U chứa silica gel khan được tẩm *crom (VI) oxyd (TT)*.

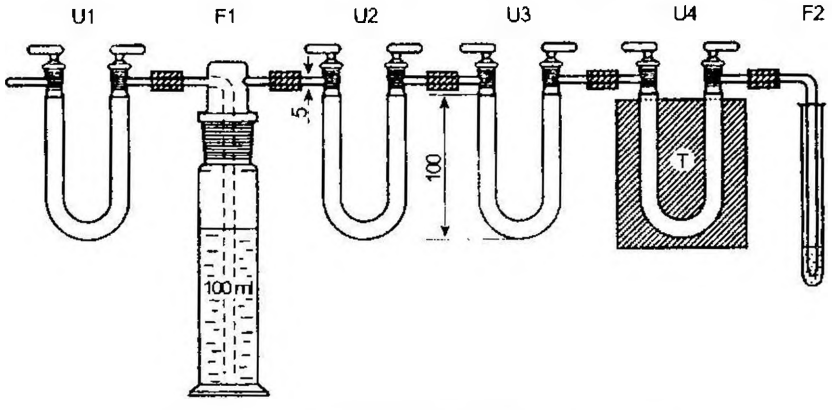
F1: Bình rửa chứa 100 ml *dung dịch kali hydroxyd 40 % (TT)*.

U2: Ống hình chữ U chứa các hạt *kali hydroxyd (TT)* (ống này không cần khi thử carbon dioxyd).

U3: Ống hình chữ U chứa phosphor pentoxyd được phân tán trên đá bọt.

U4: Ống hình chữ U chứa 30 g các hạt iod pentoxyd kết tinh lại đã được sấy trước ở 200 °C và duy trì ở 120 °C trong suốt quá trình thử. Iod pentoxyd được nhồi trong một ống thành các cột 1 cm được phân cách bằng các cột bông thủy tinh 1 cm để được một đoạn hữu hiệu dài 5 cm.

F2: Ống phản ứng chứa 2,0 ml *dung dịch kali iodid 16,6 % (TT)* và 0,15 ml *dung dịch hồ tinh bột (TT)*.




*Hình 9.5* - Thiết bị thử giới hạn carbon monoxyd
*(Kích thước tính bằng milimét)*

**Tiến hành**

Rửa thiết bị bằng 5,0 L khí argon và nếu cần, làm mất màu của dung dịch iodid bằng cách thêm lượng ít nhất *dung dịch natri thiosulfat 0,002 N (CĐ)* mới pha. Tiếp tục rửa đến khi lượng *dung dịch natri thiosulfat 0,002 N (CĐ)* cần dùng không quá 0,045 ml sau khi cho 5,0 L khí argon chạy qua.

Cho khí cần kiểm tra chạy qua thiết bị, dùng thể tích và tốc độ dòng theo qui định trong chuyên luận riêng. Rửa vết iod giải phóng vào bình phản ứng bằng cách cho 1,0 L khí argon chạy qua. Chuẩn độ iod giải phóng bằng *dung dịch natri thiosulfat 0,002 N (CĐ)*.

Tiến hành mẫu trắng trong cùng điều kiện, dùng thể tích argon theo qui định trong chuyên luận riêng. Thể tích *dung dịch natri thiosulfat 0,002 N (CĐ)* chênh lệch giữa hai lần chuẩn độ không được quá giới hạn qui định trong chuyên luận riêng.

## 9.6 XÁC ĐỊNH MẤT KHỐI LƯỢNG DO LÀM KHÔ

Mất khối lượng do làm khô là sự giảm khối lượng của mẫu thử biểu thị bằng phần trăm (khối lượng/khối lượng) khi được làm khô trong điều kiện xác định ở mỗi chuyên luận. Phương pháp này dùng để xác định hàm lượng nước, một phần hoặc toàn bộ lượng nước kết tinh và lượng chất dễ bay hơi khác trong mẫu thử.

Việc xác định mất khối lượng do làm khô không được làm thay đổi tính chất lý hóa cơ bản của mẫu thử, vì vậy mỗi chuyên luận riêng sẽ có quy định cách làm khô theo một trong các phương pháp sau đây:

*a) Trong bình hút ẩm.* Tiến hành làm khô trong bình hút ẩm với những chất hút nước như phosphor pentoxyd, silica gel v.v...

*b) Trong chân không.* Tiến hành làm khô ở điều kiện áp suất từ 1,5 kPa đến 2,5 kPa có mặt chất hút ẩm phosphor pentoxyd và ở nhiệt độ phòng.

*c) Trong chân không ở điều kiện nhiệt độ xác định.* Tiến hành làm khô ở điều kiện áp suất từ 1,5 kPa đến 2,5 kPa có mặt chất hút ẩm phosphor pentoxyd và trong điều kiện nhiệt độ quy định trong chuyên luận riêng.

*d) Trong tủ sấy ở điều kiện nhiệt độ xác định.* Tiến hành làm khô trong tủ sấy ở điều kiện nhiệt độ quy định trong chuyên luận riêng.

*e) Trong chân không hoàn toàn.* Tiến hành làm khô trong điều kiện áp suất không quá 0,1 kPa có mặt chất hút ẩm phosphor pentoxyd và ở điều kiện nhiệt độ qui định trong chuyên luận riêng.

**Cách tiến hành**

Dùng dụng cụ dùng để sấy bằng thủy tinh rộng miệng đáy bằng có nắp mài làm bì đựng mẫu thử; làm khô bì trong thời gian 30 min theo phương pháp và điều kiện quy định trong chuyên luận rồi cân để xác định khối lượng bì. Cân ngay vào bì này một lượng chính xác mẫu thử bằng khối lượng quy định trong chuyên luận với sai số ± 10 %. Nếu không có chỉ dẫn gì đặc biệt thì lượng mẫu thử được dàn mỏng thành lớp có độ dày không quá 5 mm. Nếu mẫu thử có kích thước lớn thì phải nghiền nhanh tới kích thước dưới 2 mm trước khi cân. Tiến hành làm khô trong điều kiện quy định của chuyên luận. Nếu dùng phương pháp sấy thì nhiệt độ thực cho phép chênh lệch ± 2 °C so với nhiệt độ quy định. Sau khi sấy phải làm nguội tới nhiệt độ phòng cân trong bình hút ẩm có silica gel rồi cân ngay. Nếu chuyên luận không quy định thời gian làm khô có nghĩa là phải làm khô đến khối lượng không đổi, tức là sự chênh lệch khối lượng sau khi sấy thêm 1 h trong tủ sấy hoặc 6 h trong bình hút ẩm so với lần sấy trước đó không quá 0,5 mg.

Nếu mẫu thử bị chảy ở nhiệt độ thấp hơn nhiệt độ sấy quy định thì trước khi đưa lên nhiệt độ đó, cần duy trì từ 1 h đến 2 h ở nhiệt độ thấp hơn nhiệt độ nóng chảy của mẫu thử từ 5 °C đến 10 °C.

Nếu mẫu thử ở dạng nang hoặc viên bao thì phải bỏ vỏ (lấy không ít hơn 4 viên) và nghiền nhanh tới kích thước dưới 2 mm rồi lấy lượng bột viên như chỉ dẫn trong chuyên luận riêng.

Nếu mẫu thử là dược liệu, khi chuyên luận riêng không có chỉ dẫn gì đặc biệt thì tiến hành sấy trong tủ sấy ở áp suất thường. Dược liệu phải được làm thành mảnh nhỏ đường kính không quá 3 mm; lượng đem thử từ 2 g đến 5 g; chiều dày lớp mẫu thử đem sấy là 5 mm và không quá 10 mm đối với dược liệu có cấu tạo xốp. Nhiệt độ và thời gian sấy theo yêu cầu của chuyên luận riêng. Nếu chuyên luận không qui định thời gian sấy có nghĩa là sấy đến khối lượng không đổi, tức là sự chênh lệch khối lượng sau khi sấy thêm 1 h so với lần sấy trước đó không quá 5 mg.

## 9.7 XÁC ĐỊNH TRO KHÔNG TAN TRONG ACID

Nếu không có hướng dẫn khác trong chuyên luận thì dùng phương pháp 1.

**Phương pháp 1**

Cho 25 ml *dung dịch acid hydrocloric 2 M (TT)* vào tro toàn phần, đun sôi 5 min, lọc để tập trung những chất không tan vào một phễu thủy tinh xốp đã cân bì, hoặc vào một giấy lọc không tro, rửa bằng nước nóng rồi đem nung ở 500 °C đến khối lượng không đổi. Tính tỷ lệ phần trăm của tro không tan trong acid so với dược liệu đã làm khô trong không khí.

**Phương pháp 2**

Cho vào chén nung chứa tro toàn phần hay tro sulfat (nếu trong chuyên luận riêng không có chỉ dẫn khác) 15 ml *nước* và 10 ml *acid hydrocloric (TT)*. Đậy chén bằng một mặt kính đồng hồ, đun sôi cẩn thận 10 min rồi để nguội. Rửa mặt kính đồng hồ với 5 ml nước nóng rồi cho vào chén nung. Tập trung chất không tan vào một phễu lọc thủy tinh xốp đã cân bì hoặc vào một giấy lọc không tro, rửa bằng nước nóng tới khi dịch lọc cho phản ứng trung tính. Làm khô rồi nung tới đỏ tối, để nguội trong bình hút ẩm rồi cân. Nung tiếp tới khi giữa 2 lần cân khối lượng

chênh lệch nhau không vượt quá 1 mg. Tính tỷ lệ phần trăm của tro không tan trong acid so với dược liệu đã được làm khô trong không khí.

## 9.8 XÁC ĐỊNH TRO TOÀN PHẦN

Nếu không có hướng dẫn khác trong chuyên luận thì áp dụng phương pháp 1.

**Phương pháp 1**

Với mẫu thử là dược liệu, thuốc từ dược liệu: Cho 2 g đến 3 g bột mẫu thử vào một chén sứ hoặc chén platin đã nung và cân bì. Nung ở nhiệt độ không quá 450 °C tới khi không còn carbon, làm nguội rồi cân. Bằng cách này mà tro chưa loại được hết carbon thì dùng một ít nước nóng cho vào khối chất đã than hóa, dùng đũa thủy tinh khuấy đều, lọc qua giấy lọc không tro. Rửa đũa thủy tinh và giấy lọc, tập trung nước rửa vào dịch lọc. Cho giấy lọc và cắn vào chén nung rồi nung đến khi thu được tro màu trắng hoặc gần như trắng. Tập trung dịch lọc vào cắn trong chén nung, đem bốc hơi đến khô rồi nung ở nhiệt độ không quá 450 °C đến khi khối lượng không đổi. Tính tỷ lệ phần trăm của tro toàn phần theo dược liệu đã làm khô trong không khí.

Với các mẫu thử khác: Cũng thực hiện như trên nhưng chỉ dùng 1 g mẫu thử nếu không có chỉ dẫn gì khác trong chuyên luận.

**Phương pháp 2**

Lấy một chén sứ hoặc chén platin nung tới đỏ trong 30 min. Để nguội trong bình hút ẩm rồi cân. Nếu trong chuyên luận riêng không có hướng dẫn gì khác thì lấy 1 g mẫu thử rải đều vào chén nung, sấy 1 h ở 100 °C đến 105 °C rồi đem nung trong lò nung ở 600 °C ± 25 °C. Sau mỗi lần nung, lấy chén nung cùng cắn tro đem làm nguội trong bình hút ẩm rồi cân. Trong quá trình thao tác không được để tạo thành ngọn lửa. Nếu sau khi đã nung lâu mà vẫn chưa loại hết carbon của tro thì dùng nước nóng để lấy cắn ra, lọc qua giấy lọc không tro rồi lại nung cắn và giấy lọc trong chén nung. Tập trung dịch lọc vào tro ở trong chén, làm bốc hơi cẩn thận tới khô rồi nung đến khối lượng không đổi.

## 9.9 XÁC ĐỊNH TRO SULFAT

Áp dụng một trong các phương pháp sau đây nếu trong chuyên luận riêng không có hướng dẫn khác.

**Phương pháp 1**

Nung một chén sứ hoặc chén platin tới đỏ trong 10 min, để nguội trong bình hút ẩm rồi cân. Nếu không có chỉ dẫn gì đặc biệt trong chuyên luận riêng thì cho 1 g mẫu thử vào chén nung, làm ẩm với *acid sulfuric (TT)*, đốt cẩn thận rồi lại làm ẩm với *acid sulfuric (TT)* và nung ở khoảng 800 °C. Làm nguội rồi cân. Nung lại 15 min, làm nguội rồi cân nhắc lại. Lặp lại quá trình này cho đến khi hai lần cân liên tiếp, khối lượng không chênh lệch nhau quá 0,5 mg.

**Phương pháp 2**

Nung một chén nung sứ hoặc platin ở 600 °C ± 50 °C trong 30 min, để nguội trong bình hút ẩm rồi cân. Cho vào chén nung một lượng mẫu thử như chỉ dẫn trong chuyên luận và cân. Làm ẩm mẫu bằng một lượng nhỏ *acid sufuric (TT)* (khoảng 1 ml), đốt nóng ở mức độ nhẹ nhất có thể đến khi mẫu hóa tro hoàn toàn. Để nguội, làm ẩm cắn bằng một lượng nhỏ *acid sufuric (TT)*, đốt nóng nhẹ đến khi bay hết khói trắng và nung ở 600 °C ± 50 °C đến khi cắn thành tro hoàn toàn. Trong khi đốt và nung không được để tạo thành ngọn lửa. Để nguội trong bình hút ẩm, cân và tính khối lượng của cắn. Nếu khối lượng cắn vượt ngoài giới hạn cho phép thì lại làm ẩm cắn bằng *acid sufuric (TT)* và nung như trên đến khối lượng không đổi nếu không có chỉ dẫn gì khác.

Lượng mẫu thử thường dùng (từ 1 g đến 2 g) được tính từ giới hạn tro sulfat đã qui định sao cho khối lượng tro sulfat (khoảng 1 mg) có thể cân được để đảm bảo độ chính xác.

## 9.10 XÁC ĐỊNH TRO TAN TRONG NƯỚC

Đun sôi tro toàn phần (Phụ lục 9.8) với 25 ml *nước* trong 5 min. Tập trung những chất không tan vào một phễu thủy tinh xốp, hoặc vào trong một chén lọc thủy tinh xốp, hoặc trên một giấy lọc không tro đã cân bì trước, rửa bằng *nước* nóng rồi nung 15 min ở nhiệt độ không quá 450 °C. Để nguội rồi cân để xác định khối lượng cắn không tan trong nước. Lấy khối lượng tro toàn phần trừ đi khối lượng cắn không tan trong nước, được khối lượng tro tan trong nước. Tính tỷ lệ phần trăm tro tan trong nước so với dược liệu đã làm khô trong không khí.

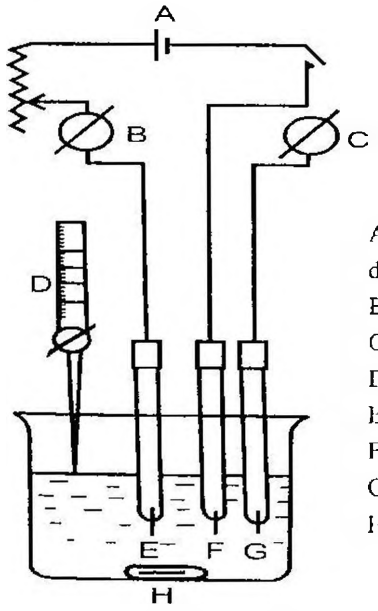
# PHỤ LỤC 10

## 10.1 PHƯƠNG PHÁP CHUẨN ĐỘ ĐO AMPE

Trong chuẩn độ đo ampe, điểm kết thúc được xác định bằng cách quan sát sự biến đổi của cường độ dòng điện đo giữa hai điện cực (một điện cực chỉ thị và một điện cực so sánh hoặc hai điện cực chỉ thị) nhúng trong dung dịch khảo sát và duy trì một hiệu điện thế không đổi. Cường độ dòng điện này là một hàm số mà biến số là lượng dung dịch chuẩn độ thêm vào.
Thế của điện cực đo cần phải đủ để đảm bảo dòng khuếch tán đối với chất điện hoạt.

### Máy

Máy gồm có một nguồn cung cấp điện thế điều chỉnh được và một đồng hồ đo microampe nhạy. Hệ thống để phát hiện nói chung gồm một điện cực chỉ thị (ví dụ: điện cực platin, điện cực giọt thủy ngân, điện cực có đĩa quay hoặc điện cực than) ghép đôi với một điện cực so sánh như điện cực calomel hoặc điện cực bạc - bạc clorid.
Có thể dùng máy có 3 điện cực, máy này ngoài điện cực chỉ thị và điện cực so sánh còn có điện cực bổ trợ phân cực.




A: Nguồn cung cấp dòng có thể không đổi
B: Micro - ampe kế
C: Điện thế kế
D: Dung dịch chuẩn độ
E: Điện cực bổ trợ
F: Điện cực chỉ thị
G: Điện cực so sánh
H: Khuấy từ

*Hình 10.1* - Sơ đồ chuẩn độ đo Ampe

### Cách tiến hành

Chỉnh thế của điện cực chỉ thị theo các chỉ dẫn trong chuyên luận riêng. Lập đồ thị biểu diễn cường độ dòng ban đầu và các giá trị cường độ dòng khác thu được trong khi chuẩn độ, dưới dạng một hàm số với biến số là lượng dung dịch chuẩn độ thêm vào. Khi tổng lượng dung dịch chuẩn độ thêm vào đạt xấp xỉ 80 % thể tích lý thuyết dung dịch chuẩn độ cần dùng để đạt điểm tương đương, thêm dung dịch chuẩn độ không ít hơn 3 lần liên tiếp để tiến dần tới điểm tương đương. Các giá trị thu được này cần phải ở trên một đường thẳng. Tiếp tục thêm dung dịch chuẩn độ đến quá điểm tương đương và lại thêm không ít hơn ba lần liên tiếp dung dịch chuẩn độ nữa, các giá trị thu được lần này phải ở trên một đường thẳng khác. Điểm kết thúc của phép chuẩn độ là giao điểm của hai đường thẳng nói trên.
Trong trường hợp chuẩn độ đo ampe bằng hai điện cực chỉ thị nên ghi lại toàn bộ đường cong chuẩn độ và dùng đồ thị này để xác định điểm tương đương.

## 10.2 PHƯƠNG PHÁP CHUẨN ĐỘ ĐO ĐIỆN THẾ

Trong chuẩn độ đo điện thế, điểm kết thúc của chuẩn độ được xác định bằng cách quan sát sự biến đổi hiệu số điện thế đo được giữa hai điện cực (một điện cực chỉ thị và một điện cực so sánh hoặc hai điện cực chỉ thị) nhúng trong dung dịch khảo sát. Sự biến đổi này như là một hàm số mà biến số là lượng dung dịch chuẩn độ thêm vào. Điện thế thường được đo ở cường độ dòng điện bằng không hoặc thực tế bằng không.

### Máy

Máy được sử dụng (máy đo thế đơn hoặc máy có tổ hợp mạch điện tử) gồm có một von kế cho phép đọc được tới 1 mV.
Tùy theo bản chất của hợp chất cần định lượng mà chọn điện cực chỉ thị, có thể là điện cực thủy tinh hoặc điện cực kim loại (như platin, vàng, bạc, thủy ngân....). Điện cực so sánh thường là điện cực calomel hoặc điện cực bạc - bạc clorid.
Trong chuẩn độ acid kiềm, trừ trường hợp có những chỉ dẫn khác của chuyên luận riêng, người ta thường dùng điện cực kép thủy tinh - calomel hoặc thủy tinh - bạc - bạc clorid.

### Cách tiến hành

Lập đồ thị biểu diễn những biến đổi về điện thế tương ứng với lượng dung dịch chuẩn độ thêm vào cho đến và vượt điểm tương đương giả định. Điểm kết thúc của chuẩn độ tương ứng với điểm mà ở đó có sự thay đổi đột biến về điện thế.

## 10.3 ĐỊNH LƯỢNG NƯỚC

Nếu không có chỉ dẫn khác trong chuyên luận riêng, áp dụng Phương pháp 1 và định lượng trực tiếp.

### Phương pháp 1 (Định lượng nước bằng thuốc thử Karl Fischer)

#### *Nguyên tắc*

Phương pháp định lượng nước này dựa trên phản ứng toàn lượng của nước với lưu huỳnh dioxyd và iod trong dung môi khan chứa một chất base hữu cơ thích hợp.
Dung môi hữu cơ thông dụng là methanol khan nước, cũng có khi được thay bằng dung môi hữu cơ khác thích hợp để

hòa tan chế phẩm. Chất base hữu cơ là pyridin, nhưng hiện nay đã dùng những chất base hữu cơ khác để thay thế như imidazol, 2-methylaminopyridin.

***Thiết bị***

Hiện nay có nhiều loại dụng cụ, nhưng nguyên tắc đều phải cấu tạo sao cho thao tác thuận tiện và tránh ẩm. Dụng cụ gồm có một cốc chuẩn độ dung tích khoảng 60 ml, có nắp gắn điện cực kép platin, một ống dẫn khí nitrogen, có lỗ cắm với buret và lỗ cắm ống thông hơi chứa chất hút ẩm. Chế phẩm được đưa vào bình chuẩn độ qua lỗ trên nắp hoặc miệng bên cạnh có nút mài. Trong quá trình chuẩn độ, khuấy bằng máy khuấy từ hoặc bằng luồng khí nitrogen khô đi qua dung dịch. Điểm kết thúc phản ứng được xác định bằng điện kế gắn trong mạch có biến trở 2000 Ω, nối với một nguồn pin 1,5 V. Lúc bắt đầu kim điện kế chỉ điểm không, vì dòng điện chạy qua 2 điện cực platin không đáng kể. Khi nhỏ thuốc thử Karl Fischer vào dung dịch, do hiện tượng khử cực nên kim điện kế lệch đi nhưng lập tức trở về vị trí ban đầu, chỉ khi đến điểm kết thúc thì một giọt thuốc thử thừa sẽ làm kim lệch đi và duy trì ít nhất 30 s.

***Thuốc thử***

*Thuốc thử Karl Fischer* gốc gồm 4 thành phần chính là lưu huỳnh dioxyd, iod, pyridin hoặc một base hữu cơ khác và methanol pha thành một dung dịch, hoặc hai dung dịch. Trường hợp pha thành hai dung dịch thì dung dịch A chứa lưu huỳnh dioxyd và pyridin pha trong methanol khan, dung dịch B chứa iod pha trong methanol khan. Trước khi dùng 1 h, trộn đều 1 thể tích dung dịch A với 1 thể tích dung dịch B, sau đó xác định đương lượng nước của thuốc thử. Lượng thuốc thử thu được chỉ dùng trong ngày. Hiện nay trên thị trường vừa có các loại thuốc thử như trên, vừa có loại đã thay pyridin và methanol bằng chất kiềm hữu cơ khác và dung môi hữu cơ khác. Do vậy, cần kiểm tra kỹ thành phần thuốc thử và cách sử dụng cho đúng mục đích. Các thuốc thử Karl Fischer và dung môi dùng trong phương pháp đều phải khan nước, bảo quản trong lọ màu, tránh ánh sáng, chống ẩm và phải xác định lại đương lượng nước trước khi dùng.

*Xác định đương lượng nước của thuốc thử*

Đương lượng nước của thuốc thử Karl Fischer dễ bị thay đổi theo thời gian nên trước khi dùng phải xác định lại và phải đạt tối thiểu 3,5 mg nước cho 1 ml thuốc thử. Có thể xác định theo 2 cách:

a. Áp dụng xác định hàm lượng nước nhỏ hơn 1 %.

Dùng một hóa chất có hàm lượng nước kết tinh xác định, sau khi đã sấy ở nhiệt độ quy định đến khối lượng không đổi để loại hết ẩm, cho tác dụng với thuốc thử rồi tính ra đương lượng. Thường dùng *natri tartrat dihydrat* ($C_4H_4Na_2O_6.2H_2O$).

*Cách tiến hành:*

Cho một lượng *methanol khan (TT)* hoặc dung môi thích hợp dùng cho thuốc thử Karl Fischer vào cốc chuẩn độ đủ ngập điện cực platin rồi chuẩn độ bằng *thuốc thử Karl Fischer* đến điểm dừng. Cho nhanh khoảng từ 250 mg đến 350 mg *natri tartrat dihydrat* đã cân chính xác vào cốc và chuẩn độ bằng *thuốc thử Karl Fischer* đến điểm kết thúc, tính hệ số đương lượng nước F (tính bằng mg nước/ml thuốc thử) của thuốc thử theo công thức:

$$F = 2 \times (18,02/230,08) \times (W/V)$$

Trong đó:

18,02 và 230,08 là khối lượng phân tử của nước và của natri tartrat dihydrat;

W là khối lượng *natri tartrat dihydrat* (tính bằng mg);

V là thể tích của *thuốc thử Karl Fischer* đã dùng (tính bằng ml).

b. Áp dụng xác định hàm lượng nước lớn hơn hoặc bằng 1 %.

Dùng nước tinh khiết đã chưng cất đạt tiêu chuẩn làm chất chuẩn hòa vào *methanol khan (TT)* hoặc dung môi thích hợp loại dùng cho thuốc thử Karl Fischer rồi dùng *thuốc thử Karl Fischer* để chuẩn độ.

*Cách tiến hành:*

Cho 25 ml *methanol khan (TT)* vào cốc chuẩn độ, chuẩn độ bằng *thuốc thử Karl Fischer* đến điểm kết thúc. Thêm nhanh khoảng 50 mg *nước tinh khiết* đã cân chính xác vào cốc chuẩn độ trên và chuẩn độ bằng thuốc thử Karl Fischer đến điểm kết thúc. Tính hệ số đương lượng nước F (tính bằng mg nước/ml thuốc thử) của thuốc thử theo công thức:

$$F = W/V$$

Trong đó:

W là khối lượng nước (tính bằng mg);

V là thể tích thuốc thử Karl Fischer đã dùng (tính bằng ml).

***Định lượng***

*Chuẩn bị mẫu thử:* Nếu không có chỉ dẫn gì khác trong chuyên luận riêng, cân hoặc lấy chính xác một lượng chế phẩm ước lượng chứa khoảng 10 mg đến 50 mg nước đem định lượng. Thao tác phải nhanh và thực hiện trong phòng có độ ẩm thấp để tránh ẩm ở ngoài ảnh hưởng đến chất phân tích.

*Phương pháp định lượng trực tiếp*

Nếu không có chỉ dẫn gì khác trong chuyên luận riêng, cho khoảng 20 ml *methanol khan (TT)* hoặc dung môi thích hợp dùng cho thuốc thử Karl Fischer vào cốc chuẩn độ, chuẩn độ bằng *thuốc thử Karl Fischer* đến điểm dừng. Cho nhanh một lượng chế phẩm đã chỉ dẫn trong chuyên luận riêng vào cốc chuẩn độ, đóng nút ngay, khuấy đều để phản ứng tác dụng trong khoảng 1 min rồi tiếp tục chuẩn độ bằng thuốc thử Karl Fischer đến điểm dừng. Tính hàm lượng nước X (tính bằng mg) của chế phẩm theo công thức:

$$X = N \times F$$

Trong đó:

N là thể tích thuốc thử Karl Fischer đã dùng cho lần chuẩn độ sau khi cho chế phẩm (tính bằng ml);

F là hệ số đương lượng nước của thuốc thử Karl Fischer (tính bằng mg/ml).

*Phương pháp định lượng gián tiếp*

*Dung dịch nước chuẩn:* Pha loãng 2 ml *nước tinh khiết* với *methanol khan (TT)* hoặc dung môi thích hợp thành

1000 ml. Lấy chính xác 25,0 ml dung dịch này cho vào cốc định lượng và chuẩn độ bằng thuốc thử Karl Fischer vừa mới xác định độ chuẩn. Tính hàm lượng nước W (tính bằng mg/ml) của dung dịch nước chuẩn theo công thức:

$$W = V \times F/25$$

Trong đó:
V là thể tích thuốc thử Karl Fischer đã dùng (ml);
F là hệ số đương lượng nước của thuốc thử Karl Fischer (tính bằng mg/ml).
*Cách tiến hành:* Nếu không có chỉ dẫn gì khác trong chuyên luận riêng, cho một lượng *methanol khan (TT)*, hoặc dung môi được chỉ dẫn trong chuyên luận riêng vào cốc định lượng vừa đủ ngập điện cực, chuẩn độ bằng *thuốc thử Karl Fischer* đến điểm kết thúc. Cho nhanh một lượng chế phẩm đã chỉ dẫn trong chuyên luận riêng vào cốc, đóng nút ngay, thêm tiếp một lượng chính xác *thuốc thử Karl Fischer* vào cốc sao cho thừa khoảng 1 ml, hoặc theo một thể tích đã chỉ dẫn trong chuyên luận riêng. Đóng nút để yên 1 min, tránh ánh sáng, thỉnh thoảng khuấy. Chuẩn độ phần thuốc thử Karl Fischer thừa bằng dung dịch nước chuẩn vừa mới pha ở trên. Tính hàm lượng nước A (tính bằng mg) có trong chế phẩm theo công thức:

$$A = F \times V_1 - W \times V_2$$

Trong đó:
F là đương lượng nước của thuốc thử Karl Fischer (tính bằng mg/ml);
$V_1$ là thể tích *thuốc thử Karl Fischer* đã thêm vào (ml);
$V_2$ là thể tích dung dịch nước chuẩn đã dùng (ml);
W là hàm lượng nước của dung dịch nước chuẩn ở trên (tính bằng mg/ml).
*Chú ý:*
Cần phải kiểm tra xem chất thử có tương kỵ với thuốc thử Karl Fischer không trước khi áp dụng phương pháp này. Những chất có khả năng phản ứng với một hay nhiều thành phần của thuốc thử như acid ascorbic, các mercaptan, các sulfid, các muối hydrocarbonat và carbonat kiềm, các oxyd và hydrat của oxyd kim loại... không áp dụng được phương pháp này. Đối với các aldehyd và ceton, hiện nay đã có loại thuốc thử dành riêng để định lượng nước trong các chất này.
Những dung môi hữu cơ sau đây có thể dùng thay thế methanol trong thuốc thử Karl Fischer khi chất thử không tan trong methanol: Cloroform, methyl celosolve, diethylen glycol monoethyl ether. Trước khi sử dụng phải làm khan bằng zeolit đạt tiêu chuẩn cho định lượng nước.
Những chất base hữu cơ sau đây có thể thay pyridin trong thuốc thử Karl Fischer: Imidazol, 2-methyl-aminopyridin. Phải kiểm tra hàm lượng nước trước khi dùng.

**Phương pháp 2 (Phương pháp chuẩn độ đo điện tích)**

*Nguyên tắc*
Phương pháp chuẩn độ đo điện tích có nguyên tắc tương tự phương pháp 1 tức là dựa trên phản ứng toàn lượng của nước với lưu huỳnh dioxyd và iod trong dung môi khan chứa một chất base hữu cơ thích hợp. Tuy nhiên, khác với phương pháp 1, iod được tạo ra bằng cách oxy hóa ion iodid tại buồng phản ứng điện hóa. Iod tạo thành ở anod phản ứng ngay với nước và lưu huỳnh dioxyd có trong buồng phản ứng. Hàm lượng nước trong chế phẩm tỷ lệ thuận với lượng điện tích tăng thêm cho đến khi kết thúc chuẩn độ. Điểm kết thúc đạt được khi toàn bộ nước phản ứng hết và iod dư xuất hiện. 1 mol iod tương ứng với 1 mol nước, 10,71°C điện tích tương ứng với 1 mg nước.
Độ ẩm bị loại khỏi hệ thống bằng quy trình trước điện phân. Các lần định lượng có thể thực hiện nối tiếp nhau trong cùng một dung dịch thuốc thử, trong các điều kiện sau:
- Mỗi thành phần của hỗn hợp thử không tương kỵ lẫn nhau,
- Không có phản ứng nào khác xảy ra,
- Thuốc thử điện phân phải đủ về thể tích và có đủ khả năng trung hòa nước.
Phương pháp chuẩn độ đo điện tích chỉ áp dụng được với những mẫu có hàm lượng nước nhỏ, khoảng từ 10 µg đến 10 mg nước là phù hợp.
Độ đúng và độ chính xác của phương pháp chủ yếu phụ thuộc vào mức độ loại bỏ được độ ẩm của môi trường ra khỏi hệ thống. Việc kiểm soát hệ thống phải được theo dõi bằng cách đo độ trôi của đường nền.

***Thiết bị***
Thiết bị bao gồm một buồng phản ứng, điện cực và khuấy từ. Buồng phản ứng có một ngăn anod rộng và một ngăn cathod nhỏ hơn. Có thể có vách ngăn phân cách hai ngăn điện cực tùy theo thiết kế. Mỗi ngăn có một điện cực platin. Chất lỏng hoặc mẫu thử đã hòa tan được đưa vào buồng phản ứng bằng một xi lanh qua nắp septum. Có thể áp dụng kỹ thuật bay hơi trong đó mẫu thử được làm nóng lên trong một ống đựng mẫu (buồng sấy) và hơi nước từ mẫu được đưa đến buồng phản ứng nhờ một dòng khí trơ khô. Phải tránh việc đưa mẫu rắn vào buồng phản ứng. Tuy nhiên, nếu không có cách nào khác thì việc đưa mẫu rắn vào phải qua một cổng nạp mẫu kín, phải áp dụng các biện pháp thích hợp để tránh đưa thêm độ ẩm của môi trường vào, ví dụ phải làm việc trong hộp có lồng găng tay và trong môi tường khí trơ khô. Quy trình thử nghiệm được theo dõi bằng một thiết bị điện tử phù hợp, có hiển thị kết quả.

***Cách tiến hành***
Dồ đầy các ngăn của buồng phản ứng bằng *thuốc thử điện phân dùng trong vi định lượng nước* theo hướng dẫn của nhà sản xuất và tiến hành chuẩn độ đến điểm kết thúc ổn định. Đưa lượng mẫu theo chỉ dẫn vào buồng phản ứng và khuấy 30 s, nếu không có chỉ dẫn khác trong chuyên luận riêng, chuẩn độ đến khi đạt được điểm kết thúc ổn định. Trường hợp phải dùng kỹ thuật bay hơi, đưa lượng mẫu như chỉ dẫn vào buồng sấy và làm nóng. Sau khi hơi nước bay hết sang buồng phản ứng, quá trình chuẩn độ bắt đầu. Đọc kết quả trên máy và tính phần trăm nước có trong chế phẩm, nếu cần. Thực hiện mẫu trắng tùy theo loại mẫu hoặc cách chuẩn bị mẫu.

***Kiểm tra độ đúng***

Giữa hai lần chuẩn độ, đưa một lượng nước được cân chính xác tương đương với lượng nước trong một lần chuẩn độ mẫu thử, có thể dùng *nước* hoặc *dung dịch chuẩn dùng cho vi định lượng nước*, tiến hành chuẩn độ. Tỷ lệ tìm thấy phải từ 97,5 % đến 102,5 % trong trường hợp lượng nước thêm vào khoảng 1000 µg; từ 90,0 % đến 110,0 % trong trường hợp lượng nước thêm vào khoảng 100 µg.

## 10.4 PHƯƠNG PHÁP CHUẨN ĐỘ BẰNG NITRIT

Chuẩn độ bằng nitrit là phương pháp định lượng thể tích, trong đó dung dịch chuẩn độ là dung dịch natri nitrit.

Phương pháp này được dùng chủ yếu để định lượng các chế phẩm có chứa nhóm amin thơm bậc nhất hoặc những chế phẩm khác mà qua biến đổi hóa học chuyển được thành hợp chất có nhóm amin thơm bậc nhất.

**Cách tiến hành**

Cân chính xác một lượng chế phẩm tương ứng với khoảng 0,002 phân tử gam hoạt chất (hoặc theo chỉ dẫn trong chuyên luận riêng) hòa tan trong 20 ml *acid hydrocloric (TT)*, và 50 ml *nước*. Cho thêm 2 g *kali bromid (TT)*, làm lạnh trong nước đá rồi chuẩn độ bằng *dung dịch natri nitrit 0,1 M (CĐ)* (phải để đầu nhỏ dung dịch chuẩn độ của buret ngập dưới mặt dung dịch cần chuẩn độ). Trong quá trình chuẩn độ phải lắc bình liên tục, nhẹ nhàng sao cho không tạo ra dòng xoáy không khí trong dung dịch (tốt nhất là dùng máy khuấy từ). Nhỏ dung dịch chuẩn độ với tốc độ lúc đầu chừng 2 ml trong một phút, đến trước điểm tương đương khoảng 1 ml thì nhỏ từng 0,1 ml một và để yên ít nhất 1 min sau mỗi lần thêm dung dịch.

Điểm kết thúc được xác định bằng phương pháp đo điện (theo hướng dẫn trong các Phụ lục 10.1, Phương pháp chuẩn độ đo ampe hoặc Phụ lục 10.2, Phương pháp chuẩn độ đo điện thế) hoặc bằng chỉ thị màu thích hợp.

## 10.5 PHƯƠNG PHÁP CHUẨN ĐỘ COMPLEXON

**Nhôm (Al)**

Lấy một lượng dung dịch như chỉ dẫn trong chuyên luận riêng cho vào một bình nón 500 ml. Thêm 25 ml *dung dịch Trilon B 0,1 M (CĐ)* và 10 ml hỗn hợp đồng thể tích của *dung dịch amoni acetat 2 M* và *acid acetic loãng (TT)*. Đun sôi dung dịch 2 min, để nguội, thêm 50 ml *ethanol (TT)* và 3 ml *dung dịch dithizon 0,025 % (kl/tt) mới pha trong ethanol (TT)* rồi chuẩn độ *dung dịch Trilon B 0,1 M* thừa bằng *dung dịch kẽm sulfat 0,1 M (CĐ)* đến khi màu của dung dịch chuyển từ xanh sang tím đỏ.

1 ml *dung dịch Trilon B 0,1 M (CĐ)* tương đương với 2,698 mg Al.

**Bismuth (Bi)**

Nếu không có chỉ dẫn gì khác, pha loãng chế phẩm với *nước* thành 250 ml. Vừa lắc vừa thêm từng giọt *amoniac 13,5 M (TT)* cho đến khi tủa bắt đầu xuất hiện. Thêm 0,5 ml *acid nitric (TT)* và đun nóng đến 70 °C, duy trì nhiệt độ này cho đến khi dung dịch trong suốt. Thêm khoảng 50 mg *hỗn hợp đa cam xylenol (TT)* rồi chuẩn độ bằng *dung dịch Trilon B 0,1 M (CĐ)* đến khi màu của dung dịch chuyển từ tím hồng sang vàng.

1 ml *dung dịch Trilon B 0,1 M (CĐ)* tương đương với 20,90 mg Bi.

**Calci (Ca)**

Lấy một lượng dung dịch chế phẩm như chỉ dẫn trong chuyên luận cho vào một bình nón 500 ml rồi pha loãng với *nước* thành 300 ml. Thêm 6 ml *dung dịch natri hydroxyd 10 M (TT)* và khoảng 200 mg *hỗn hợp calcon (TT)* rồi chuẩn độ bằng *dung dịch Trilon B 0,1 M (CĐ)* đến khi màu của dung dịch chuyển từ tím sang xanh hoàn toàn.

1 ml *dung dịch Trilon B 0,1 M (CĐ)* tương đương với 4,008 mg Ca.

**Chì (Pb)**

Lấy một lượng dung dịch chế phẩm như chỉ dẫn trong chuyên luận cho vào một bình 500 ml rồi pha loãng với *nước* thành 200 ml. Thêm khoảng 50 mg *hỗn hợp đa cam xylenol (TT)* và một lượng *hexamin (TT)* vừa đủ để thu được dung dịch có màu hồng tím rồi chuẩn độ bằng *dung dịch Trilon B 0,1 M (CĐ)* đến khi dung dịch chuyển sang màu vàng.

1 ml *dung dịch Trilon B 0,1 M (CĐ)* tương đương với 20,72 mg Pb.

**Magnesi (Mg)**

Cho vào một bình nón 500 ml một lượng dung dịch chế phẩm như chỉ dẫn trong chuyên luận và pha loãng với *nước* thành 300 ml hoặc hòa tan một lượng chế phẩm như chỉ dẫn trong chuyên luận trong 5 ml đến 10 ml *nước* hoặc trong một lượng nhỏ *dung dịch acid hydrocloric 2 M (TT)* rồi pha loãng với nước thành 50 ml. Thêm 10 ml *dung dịch đệm amoniac pH 10,0 (TT)* và khoảng 50 mg *hỗn hợp đen eriocrom T (TT)* vào dung dịch cuối cùng. Đun nóng dung dịch đến 40 °C và chuẩn độ ở nhiệt độ đó bằng *dung dịch Trilon B 0,1 M (CĐ)* đến khi màu của dung dịch chuyển từ tím sang xanh lam hoàn toàn.

1 ml *dung dịch Trilon B 0,1 M (CĐ)* tương đương với 2,431 mg Mg.

**Kẽm (Zn)**

Cho vào một bình nón 500 ml một lượng dung dịch như đã chỉ dẫn trong chuyên luận rồi pha loãng với *nước* thành 200 ml. Thêm khoảng 50 mg *hỗn hợp đa cam xylenol (TT)* và một lượng *hexamin (TT)* vừa đủ để làm dung dịch chuyển sang màu hồng tím. Thêm 2 g *hexamin (TT)* nữa rồi chuẩn độ bằng *dung dịch Trilon B 0,1 M (CĐ)* đến khi màu của dung dịch chuyển sang vàng.

1 ml *dung dịch Trilon B 0,1 M (CĐ)* tương đương với 6,54 mg Zn.

## 10.6 PHƯƠNG PHÁP CHUẨN ĐỘ TRONG MÔI TRƯỜNG KHAN

Chuẩn độ trong môi trường khan là phương pháp chuẩn độ acid và base yếu hoặc những muối của chúng trong môi trường không phải là nước.

**Phương pháp 1**

(Áp dụng cho base và muối của chúng)

Hòa tan một lượng chế phẩm như chỉ dẫn trong chuyên luận riêng trong một thể tích thích hợp *acid acetic khan (TT)* đã được trung tính hóa trước với chỉ thị quy định trong chuyên luận riêng, nếu cần thiết có thể làm ấm hay làm lạnh, hoặc chuẩn bị một dung dịch như chỉ dẫn trong chuyên luận riêng.

Khi chế phẩm là muối của acid hydrocloric hoặc acid hydrobromic thì thêm 15 ml *dung dịch thủy ngân (II) acetat 5 % (TT)* trước khi trung tính dung môi, trừ khi có những chỉ dẫn khác trong chuyên luận riêng.

Chuẩn độ bằng *dung dịch acid percloric 0,1 N (CĐ)* đến khi có sự chuyển màu của chỉ thị, điều này tương ứng với giá trị tuyệt đối cao nhất của dE/dV trong chuẩn độ đo thế của chế phẩm thử, ở đây E là thế điện động và V là thể tích dung dịch chuẩn độ (Phụ lục 10.2).

Việc trung tính hóa dung dịch thủy ngân (II) acetat và chuẩn hóa dung dịch chuẩn độ cũng phải dùng cùng một chỉ thị được quy định trong chuyên luận riêng cho chuẩn độ chế phẩm.

Khi nhiệt độ $t_2$ của dung dịch chuẩn độ ở thời điểm định lượng khác với nhiệt độ $t_1$ của dung dịch chuẩn độ lúc được chuẩn hóa thì tính kết quả định lượng căn cứ vào thể tích dung dịch chuẩn độ hiệu chỉnh.

$$V(h) = V(c) \times [1 + 0{,}0011 \times (t_1 - t_2)]$$

Trong đó:

V(h) là thể tích dung dịch chuẩn độ hiệu chỉnh;

V(c) là thể tích dung dịch chuẩn độ đã dùng.

Tiến hành chuẩn độ mẫu trắng khi cần thiết.

**Phương pháp 2**

(Áp dụng cho acid yếu)

Dung dịch chuẩn độ, dung môi và chỉ thị được chỉ dẫn trong chuyên luận riêng.

Bảo vệ dung dịch thử và dung dịch chuẩn độ khỏi sự thâm nhập của carbon dioxyd và độ ẩm của không khí trong suốt quá trình chuẩn độ.

Hòa tan chế phẩm trong một thể tích thích hợp dung môi đã trung tính hóa trước với chỉ thị quy định, nếu cần có thể làm ấm hay lạnh, hoặc chuẩn bị một dung dịch chế phẩm như đã chỉ dẫn trong chuyên luận riêng.

Chuẩn độ cho đến khi có sự chuyển màu của chỉ thị, điều này tương ứng với giá trị tuyệt đối cao nhất của dE/dV trong chuẩn độ đo thế của chế phẩm, ở đây E là thế điện động và V là thể tích dung dịch chuẩn độ (Phụ lục 10.2).

Dung dịch chuẩn độ được chuẩn hóa bằng cách sử dụng dung môi và chỉ thị giống như đã sử dụng cho chuẩn độ chế phẩm.

Tiến hành chuẩn độ mẫu trắng khi cần thiết.

## 10.7 ĐỊNH LƯỢNG CÁC KHÁNG SINH HỌ PENICILIN BẰNG PHƯƠNG PHÁP ĐO IOD

Phương pháp sau đây được áp dụng để định lượng phần lớn thuốc kháng sinh họ penicillin trong Dược điển và những dạng bào chế của chúng mà phép chuẩn độ đo iod là đặc biệt thích hợp. Tiến hành thí nghiệm ở nhiệt độ 25 °C ± 2 °C.

**Dung dịch chuẩn**

Cân chính xác một lượng thích hợp chất chuẩn quy định trong từng chuyên luận, hòa tan vào dung môi đã được ghi trong Bảng 10.7 và pha loãng với cùng dung môi đó để được một dung dịch có nồng độ ở khoảng nồng độ quy định trong Bảng 10.7.

**Dung dịch thử**

Nếu không có chỉ định gì khác trong chuyên luận riêng, cân chính xác một lượng mẫu thử thích hợp hòa tan trong dung môi ghi trong Bảng 10.7 và pha loãng với dung môi đó để được một dung dịch có nồng độ ở vào khoảng nồng độ ghi trong Bảng 10.7.

**Phương pháp tiến hành**

*Làm mất hoạt tính và chuẩn độ:* Hút riêng rẽ 2,0 ml dung dịch chuẩn và 2,0 ml dung dịch thử vào 2 bình nón nút mài dung tích 125 ml tương ứng. Thêm vào mỗi bình 2,0 ml *dung dịch natri hydroxyd 1 M (TT)*, lắc đều và để yên 15 min. Tiếp tục cho vào mỗi bình 2,4 ml *dung dịch acid hydrocloric 1 M (TT)*, thêm 10,0 ml *dung dịch iod 0,01 N (CĐ)*, đậy ngay nút bình và để yên 15 min. Chuẩn độ bằng *dung dịch natri thiosulfat 0,01 N (CĐ)* đến gần điểm kết thúc, thêm 1 giọt *dung dịch hồ tinh bột (TT)* và tiếp tục chuẩn độ đến khi mất màu xanh.

*Mẫu trắng:* Hút 2,0 ml dung dịch chuẩn cho vào một bình nón nút mài, thêm 10,0 ml *dung dịch iod 0.01 N (CĐ)*. Nếu dung dịch chuẩn là amoxicilin hay ampicilin thì thêm ngay lập tức 0,12 ml *dung dịch acid hydrocloric 1 M (TT)*. Chuẩn độ ngay bằng *dung dịch natri thiosulfat 0,01 N (CĐ)* đến gần điểm kết thúc, thêm 1 giọt *dung dịch hồ tinh bột (TT)* và tiếp tục chuẩn độ đến khi mất màu xanh. Cũng làm như vậy đối với bình có chứa 2,0 ml dung dịch thử.

*Tính toán:* Tính đương lượng F [số microgam (hay đơn vị) kháng sinh chuẩn tương ứng với 1 ml *dung dịch natri thiosulfat 0,01 N (CĐ)*] bằng công thức:

$$\frac{2 \times C \times P}{B - I}$$

Trong đó:

C là nồng độ chất chuẩn tính bằng mg trong 1 ml của dung dịch chuẩn;

P là hoạt lực tính bằng microgam (hay đơn vị ) trong 1 mg của chất chuẩn;

B là thể tích tính bằng ml của *dung dịch natri thiosulfat 0,01 N (CĐ)* tiêu thụ trong mẫu trắng của dung dịch chuẩn;

I là thể tích tính bằng ml của *dung dịch natri thiosulfat 0,01 N (CĐ)* tiêu thụ trong phép thử làm mất hoạt tính và chuẩn độ của dung dịch chuẩn;

*Bảng 10.7* - Những dung môi và nồng độ cuối cùng của dung dịch kháng sinh

| Chất kháng sinh | Dung môi | Nồng độ cuối cùng |
|---|---|---|
| Amoxicilin | Nước | 1,0 mg/ml |
| Ampicilin | Nước | 1,25 mg/ml |
| Ampicilin natri | Đệm phosphat pH 6,0 | 1,25 mg/ml |
| Cloxacilin natri | Nước | 1,25 mg/ml |
| Dicloxacilin natri | Đệm phosphat pH 6,0 | 1,25 mg/ml |
| Methicilin natri | Đệm phosphat pH 6,0 | 1,25 mg/ml |
| Oxacilin natri | Đệm phosphat pH 6,0 | 1,25 mg/ml |
| Penicilin G kali | Đệm phosphat pH 6,0 | 2000 đơn vị/ml |
| Penicilin G natri | Đệm phosphat pH 6,0 | 2000 đơn vị/ml |
| Penicilin V kali | Đệm phosphat pH 6,0 | 2000 đơn vị/ml |

## 10.8 ĐỊNH LƯỢNG CÁC STEROID BẰNG TETRAZOLIUM

Phương pháp này được áp dụng để định lượng các steroid chứa các nhóm chức có tính khử.

Các sản phẩm của phản ứng màu này có khuynh hướng hấp phụ lên bề mặt của thủy tinh. Để tránh sự sai lệch kết quả, nên xử lý các bình phản ứng thủy tinh bằng cách để chúng chứa chính các sản phẩm của phản ứng màu này trước khi dùng. Nên giữ các bình thủy tinh đã được xử lý để dùng riêng cho phép định lượng này và chỉ rửa bình bằng nước giữa các lần định lượng. Phương pháp này được tiến hành trong điều kiện tránh ánh sáng.

### Dung dịch thử

Trừ khi có chỉ dẫn cụ thể trong chuyên luận riêng, hòa tan một lượng chế phẩm trong *ethanol không có aldehyd (TT)* để thu được một dung dịch thử có nồng độ từ 30 µg/ml đến 35 µg/ml.

### Dung dịch chuẩn

Chuẩn bị một dung dịch chất chuẩn tương ứng trong *ethanol không có aldehyd (TT)* có nồng độ tương đương với nồng độ của dung dịch thử.

### Tiến hành

Lấy chính xác 10 ml mỗi dung dịch thử và dung dịch chuẩn cho vào hai bình định mức 25 ml riêng biệt và cho 10 ml *ethanol không có aldehyd (TT)* vào một bình định mức 25 ml thứ ba. Lần lượt thêm vào các bình 2 ml *dung dịch triphenyltetrazolium clorid (TT)*, 2 ml *dung dịch tetramethylamoni hydroxyd loãng (TT)*. Đậy bình, trộn đều bằng cách lắc xoay tròn nhẹ nhàng và ngâm các bình phản ứng này trong cách thủy ở 30 °C trong 1 h, trừ khi có quy định cụ thể trong chuyên luận riêng. Làm lạnh nhanh, thêm *ethanol không có aldehyd (TT)* đến định mức 25 ml. Lắc đều và đo ngay độ hấp thụ ánh sáng của các dung dịch thu được trong hai bình đầu (theo thứ tự khi cho thuốc thử) ở cực đại 485 nm (Phụ lục 4.1), trong cốc đo có nắp đậy, lấy dung dịch thu được trong bình thứ ba làm mẫu trắng.

## 10.9 ĐỊNH LƯỢNG NITROGEN TRONG HỢP CHẤT HỮU CƠ

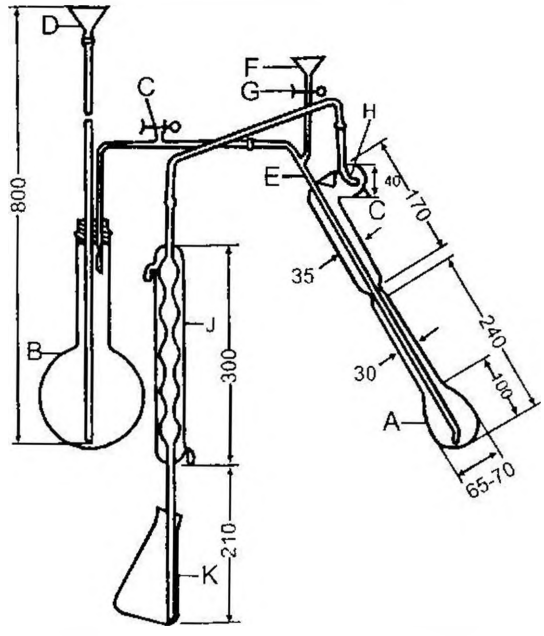
Nitrogen trong hợp chất hữu cơ được định lượng dưới dạng amoniac trong amoni sulfat thu được khi vô cơ hóa các hợp chất hữu cơ có chứa nitrogen với acid sulfuric.

Áp dụng phương pháp I nếu không có chỉ dẫn khác.

### Phương pháp I

#### *Dụng cụ*

Bộ dụng cụ định lượng nitrogen có thể được chế tạo nguyên bộ chuyên dùng cất amoniac hoặc được lắp ghép từ các dụng cụ thủy tinh cần thiết với nhau sao cho đảm bảo đủ các bộ phận và yêu cầu như Hình 10.9. Các phần bằng cao su của thiết bị nên được xử lý bằng cách đun sôi 10 min đến 30 min trong *dung dịch natri hydroxyd 1 M (TT)*, tiếp theo 30 min đến 60 min trong *nước*, cuối cùng rửa lại bằng *nước* trước khi dùng.




*Hình 10.9* - Dụng cụ định lượng nitrogen
*(Đơn vị đo tính bằng milimét)*

A. Bình Kjeldahl để vô cơ hóa mẫu thử và thực hiện phản ứng.
B. Bình cầu để cung cấp hơi nước.
C. Khoá an toàn.
D. Phễu cấp nước vào bình B.
E. Ống dẫn hơi nước từ bình B sang bình phản ứng A.
F. Phễu cấp dung dịch kiềm vào bình phản ứng A.
G. Ống nối bằng cao su có kẹp khóa.
H. Lỗ nhỏ có đường kính bằng đường kính ống cấp hơi.
J. Ống sinh hàn.
K. Bình hứng dịch cất được.

***Cách tiến hành***

Nếu chuyên luận riêng không có chỉ dẫn gì đặc biệt thì tiến hành như sau:

*a. Vô cơ hóa*

Lấy chính xác một lượng mẫu thử có chứa khoảng 5 mg nitrogen cho vào bình Kjeldahl A, thêm 1 g hỗn hợp *kali sulfat (TT)* hoặc *natri sulfat khan (TT)* và *đồng sulfat (TT)* (tỷ lệ 10 : 1) đã được tán nhỏ, 7 ml *acid sulfuric đậm đặc (TT)* và vài viên bi thủy tinh. Đậy bình bằng một phễu có cuống dài. Đặt bình nghiêng 45° trên ngọn lửa nhỏ để hỗn hợp nóng lên từ từ rồi tăng dần nhiệt độ tới khi sôi và tiếp tục đun tới khi chất lỏng trong bình có màu lục tươi và không còn những đốm đen của chất hóa than trên thành bình. Nếu chất lỏng trong bình chưa chuyển sang màu lục tươi, có thể thêm 1 ml đến 2 ml *dung dịch hydrogen peroxyd 100 tt (TT)* khi đã để nguội và đun tiếp đến khi thu được màu này. Đun thêm 30 min nữa, để nguội.

*b. Chuẩn bị cất*

Thêm 20 ml *nước cất* vào bình Kjeldahl đã vô cơ hóa, để nguội trở lại rồi lắp bình này vào bộ dụng cụ cất đã được làm sạch trước bằng cách cho hơi nước chạy qua. Nếu bộ dụng cụ cất amoniac có bình phản ứng A gắn liền thì dùng 20 ml *nước cất* để chuyển hỗn hợp từ bình Kjeldahl vào bình phản ứng.

Cho *nước cất* vào khoảng 2/3 bình cấp hơi nước B, thêm vài giọt *acid sulfuric (TT)* để acid hóa chống sự thâm nhập của amoniac từ không khí.

Lấy chính xác 30,0 ml *dung dịch acid sulfuric 0,02 N (CĐ)* và 2 giọt *dung dịch hỗn hợp đỏ methyl (TT)* cho vào bình hứng K.

Lắp nối các bộ phận với nhau như hình vẽ sao cho tạo thành một hệ thống kín, đầu cuối của ống sinh hàn thu dịch cất được phải ngập sâu trong dung dịch của bình hứng K.

*c. Tiến hành cất*

Khi việc chuẩn bị cất đã hoàn tất, cho nước lạnh chảy qua ống sinh hàn và bắt đầu đun nước trong bình B. Khi nước sôi thì cho vào bình phản ứng A qua phễu F từng ít một 30 ml *dung dịch natri hydroxyd 40 % (TT)* bằng cách sau: đổ hết lượng kiềm này vào phễu F và dùng kẹp G điều chỉnh cho dung dịch kiềm chảy xuống từ từ, khi xong khóa chặt kẹp lại. Tiếp tục cất đến khi hứng được khoảng 100 ml dịch cất. Hạ thấp bình hứng và rửa đầu sinh hàn với một ít *nước cất*.

*d. Chuẩn độ*

Chuẩn độ acid sulfuric thừa trong bình hứng dịch cất bằng *dung dịch natri hydroxyd 0,02 N (CĐ)* tới khi chuyển sang màu vàng, ghi số ml *dung dịch natri hydroxyd 0,02 N (CĐ)* đã dùng (a ml).

Tiến hành song song một mẫu trắng theo trình tự trên. Ghi số ml *dung dịch natri hydroxyd 0,02 N (CĐ)* đã dùng (b ml).

Tính kết quả: Lượng nitrogen trong mẫu thử (X) tính bằng gam theo công thức:

$$X = (b - a) \times 0,00028$$

*Trường hợp mẫu thử có lẫn nitrat và nitrit:*

Tiến hành tương tự như trên nhưng giai đoạn vô cơ hóa cần tiến hành loại trừ ảnh hưởng của nitrat và nitrit như sau:

Sau khi cho mẫu thử vào bình Kjeldahl A, thêm 10 ml *acid sulfuric (TT)* đã hòa tan 0,4 g *acid salicylic (TT)*, lắc đều và để yên 30 min (thỉnh thoảng lắc đều). Thêm 2 g *natri thiosulfat (TT)*, lắc đều, thêm 200 mg bột *đồng sulfat khan (TT)* rồi tiến hành vô cơ hóa như trên bắt đầu từ "Đặt bình nghiêng 45°... "

**Phương pháp II**

Định lượng protein trong các chế phẩm máu

Đối với các chế phẩm máu khô, chuẩn bị dung dịch chế phẩm như chỉ dẫn trong chuyên luận riêng.

Lấy một thể tích chế phẩm tương ứng với 0,1 g protein, pha loãng thành 20 ml bằng *dung dịch natri clorid 0,9 % (TT)*. Lấy 2 ml dung dịch thu được chuyển vào ống nghiệm dung tích 75 ml, thêm 2 ml dung dịch chứa 75 % *acid sulfuric không có nitrogen (TT)*, 4,5 % *kali sulfat (TT)* và 0,5 % *đồng sulfat (TT)*, trộn đều và đậy ống nghiệm một cách lỏng lẻo. Đun nóng từ từ đến sôi và tiếp tục đun sôi mạnh trong khoảng 1,5 h và để nguội. Nếu dung dịch thu được không trong thì thêm 0,25 ml dung dịch *dung dịch hydrogen peroxyd 20 tt (TT)* và đun tiếp đến khi thu được dung dịch trong và để nguội. Trong quá trình đun, chú ý không để phần trên của ống nghiệm bị nóng quá.

Chuyển dung dịch thu được vào bộ dụng cụ cất, dùng *nước* tráng rửa 3 lần, mỗi lần 3 ml. Thêm vào bình cất 10 ml *dung dịch natri hydroxyd 10 M (TT)* và cất nhanh trong vòng 4 min. Hứng dịch cất vào trong hỗn hợp 5 ml *dung dịch acid boric bão hòa (TT)* và 5 ml *nước*, giữ đầu cuối của ống sinh hàn ngập trong dịch hứng. Hạ thấp bình hứng để đầu ống sinh hàn không còn ngập trong dịch hứng và tiếp tục cất thêm 1 min nữa. Chuẩn độ bằng *dung dịch acid hydrocloric 0,02 N (CĐ)* dùng *dung dịch hỗn hợp đỏ methyl (TT)* làm chỉ thị ($V_1$).

Lấy một thể tích chế phẩm tương ứng với 0,1 g protein, thêm 12 ml *dung dịch natri clorid 0,9 % (TT)*, thêm 2 ml *dung dịch natri molybdat 7,5 %* và 2 ml hỗn hợp *acid sulfuric không có nitrogen - nước* (1 : 30). Lắc đều, để yên 15 min và thêm *nước* vừa đủ 20 ml. Lắc và ly tâm. Lấy 2 ml dịch ly tâm ở trên chuyển vào ống nghiệm dung tích 75 ml và tiếp tục tiến hành như trên, bắt đầu từ: "thêm 2 ml dung dịch chứa *75 % acid sulfuric không có nitrogen*..." ($V_2$). Tính hàm lượng protein trong chế phẩm (X mg/ml) áp dụng công thức sau (cần tính đến hệ số pha loãng ban đầu):

$$X = 6,25 \times 0,280(V_1 - V_2)$$

## 10.10 ĐỊNH LƯỢNG VITAMIN A

Hoạt lực của vitamin A được tính theo đơn vị quốc tế (ký hiệu IU). 1 IU vitamin A tương đương với 0,300 µg retinol; 0,344 µg retinyl acetat; 0,359 µg retinyl propionat hoặc 0,550 µg retinyl palmitat.

Tiến hành định lượng nhanh nhất có thể trong điều kiện tránh ánh sáng, không khí và các chất oxy hóa, các chất

xúc tác sự oxy hóa (như đồng, sắt), acid và tránh đun nóng (với vitamin A có nguồn gốc tự nhiên), tránh đun nóng kéo dài với retinol tổng hợp đậm đặc dạng bột và dạng dầu. Sử dụng các dung dịch mới pha.

Tùy theo đặc điểm của vitamin A trong các thuốc và nguyên liệu làm thuốc mà áp dụng 1 trong 5 phương pháp dưới đây để định lượng.

**Phương pháp 1**

***(Phương pháp đo quang trực tiếp)***

Có thể áp dụng đối với nguyên liệu là các ester của retinol đậm đặc dạng dầu với hàm lượng lớn (≥ 5000 IU/g).

Cân chính xác đến 0,1 % (so với lượng cân) khoảng từ 25 mg đến 100 mg chế phẩm và đem hòa tan trong 5 ml *pentan (TT)*, pha loãng bằng *2-propanol (TT)* để được dung dịch chứa chính xác khoảng 10 IU đến 15 IU vitamin A trong 1 ml.

Xác định độ hấp thụ cực đại của dung dịch đo, nếu cực đại hấp thụ nằm trong khoảng bước sóng từ 325 nm đến 327 nm thì đo độ hấp thụ của dung dịch tại các bước sóng 300 nm, 326 nm, 350 nm và 370 nm trong cốc đo dày 1 cm, dùng *2-propanol (TT)* làm mẫu trắng, đo 2 lần lấy giá trị trung bình làm kết quả đo. Tính tỷ lệ độ hấp thụ tại mỗi bước sóng so với độ hấp thụ tại bước sóng 326 nm ($A_\lambda/A_{326}$).

Nếu tỷ lệ $A_\lambda/A_{326}$ không lớn hơn các giá trị ghi dưới đây:

0,60 ở $\lambda$ = 300 nm

0,54 ở $\lambda$ = 350 nm

0,14 ở $\lambda$ = 370 nm

thì tính kết quả hàm lượng vitamin A trong mẫu thử (IU/g) theo công thức:

$$\frac{A_{326} \times V \times 1900}{100 \times m}$$

Trong đó:

$A_{326}$ là độ hấp thụ tại bước sóng 326 nm.

m là lượng chế phẩm đem thử (g).

V là lượng thể tích dung dịch thu được sau khi pha loãng đến nồng độ 10 IU/ml đến 15 IU/ml để đem đo (ml).

1900 là hệ số chuyển đổi độ hấp thụ riêng của ester retinol thành IU/g.

Nếu cực đại hấp thụ nằm ngoài dải sóng từ 325 nm đến 327 nm hoặc có một giá trị $A_\lambda/A_{326}$ lớn hơn giá trị qui định thì kết quả không có giá trị, tiến hành định lượng theo phương pháp 4.

**Phương pháp 2**

***(Phương pháp đo quang sau khi chiết tách vitamin A)***

Có thể áp dụng cho các nguyên liệu vitamin A có nguồn gốc tự nhiên và đa số các dạng thuốc chứa vitamin A: Thuốc nang, viên nén, thuốc bột, thuốc mỡ, dầu gan cá...

Lấy một lượng chế phẩm chứa khoảng 50 000 IU vitamin A vào bình nút mài, thêm 3 ml dung dịch *kali hydroxyd (TT)* 50 % mới pha, 30 ml *ethanol (TT)*, đun sôi 30 min trên cách thủy có lắp ống sinh hàn hồi lưu, dưới dòng khí nitrogen không có oxygen. Làm nguội nhanh rồi dùng 30 ml *nước cất* chuyển hết hỗn hợp sang bình gạn. Chiết 4 lần mỗi lần với 50 ml *ether (TT)* và bỏ lớp dưới khi tách lớp hoàn toàn. Tập trung dịch chiết lại rồi rửa dịch chiết 4 lần, mỗi lần 50 ml *nước cất*, (chú ý lắc rất nhẹ nhàng ở 2 lần đầu để tránh tạo thành nhũ tương). Làm bay hơi dịch chiết ether trên cách thủy dưới dòng khí nitrogen không có oxygen hoặc cất quay chân không ở nhiệt độ không quá 30 °C đến hết dung môi. Hòa tan cắn trong một lượng *2-propanol (TT)* vừa đủ để thu được dung dịch chứa 10 IU đến 15 IU vitamin A trong 1 ml. Đo độ hấp thụ của dung dịch thu được ở các bước sóng 300 nm, 310 nm, 325 nm, và 334 nm trong cốc dày 1 cm với mẫu trắng là *2-propanol (TT)*, sau đó xác định bước sóng có hấp thụ cực đại.

*Nếu cực đại hấp thụ nằm trong khoảng 323 nm đến 327 nm và tỷ lệ $A_{300}/A_{325} \leq 0,73$* thì kết quả được tính như sau:

Tính độ hấp thụ hiệu chỉnh $A_{325(K)}$:

$$A_{325(K)} = 6,815A_{325} - 2,555A_{310} - 4,260A_{334}$$

Nếu $A_{325(K)}/A_{325} \geq 0,970$ thì tính kết quả hàm lượng vitamin A trong mẫu thử (IU/g) theo công thức sau:

$$A_{325} \times \frac{1830}{100m} \times V$$

Nếu $A_{325(K)}/A_{325} < 0,970$ thì tính kết quả hàm lượng vitamin A trong mẫu thử (IU/g) theo công thức sau:

$$A_{325(K)} \times \frac{1830}{100m} \times V$$

Trong đó:

$A_{325}$ là độ hấp thụ quang tại bước sóng 325nm;

m là lượng chế phẩm đem thử (g);

V là lượng thể tích dung dịch thu được sau khi hòa tan cắn đến nồng độ 10 IU đến 15 IU vitamin A để đem đo (ml);

1830 là hệ số chuyển đổi độ hấp thụ riêng của ester retinol thành IU.

*Nếu cực đại hấp thụ nằm ngoài khoảng 323 nm đến 327 nm hoặc tỷ lệ $A_{300}/A_{325} > 0,73$* thì phải tiến hành theo phương pháp 5.

***Chú ý***

Trong cách tiến hành của phương pháp 2 nếu chế phẩm ở dạng thuốc nang, viên nén hoặc dạng bào chế thể rắn khác, sau khi đã bỏ vỏ, nghiền thành bột mà vẫn không xà phòng hóa được (do ở dạng vỉ nang) thì phải xử lý trước bằng cách đun nóng với 10 ml *nước cất* trên cách thủy 5 min, dùng đũa thủy tinh nghiền nhỏ các chất rắn còn lại và giữ nóng 5 min nữa.

Khi tiến hành xà phòng hóa, nếu không có khí nitrogen có thể thay thế bằng cách cho chất chống oxy hóa vào bình phản ứng như 3 ml *dung dịch hydroquinon 1 % trong ethanol*, hoặc 30 mg BHT *[butyl hydroxytoluen (TT)]*.

Để chiết vitamin A có thể thay *ether (TT)* bằng *ether dầu hỏa (TT)* hoặc *n-hexan (TT)*.

**Phương pháp 3**

***(Phương pháp sắc ký lỏng trực tiếp)***

Có thể áp dụng đối với các nguyên liệu vitamin A tổng hợp, các thành phẩm chứa vitamin A tổng hợp mà trong thành phần chỉ chứa vitamin A ở một dạng ester đồng nhất hoặc dạng retinol.

Phương pháp sắc ký lỏng (Phụ lục 5.3).
*Pha động: Methanol - ethyl acetat - nước* (90 : 7 : 3).
*Dung dịch thử:* Lấy chính xác một lượng chế phẩm có chứa khoảng 4000 IU vitamin A cho vào bình định mức dung tích 100 ml, thêm *ethanol (TT)*, lắc kỹ rồi thêm *ethanol (TT)* đến định mức, lắc đều, lọc.
*Dung dịch chuẩn:* Pha chất chuẩn vitamin A (dạng giống với dung dịch thử: retinol, retinyl acetat, retinyl palmitat ...) trong *ethanol (TT)* để thu được dung dịch chuẩn có nồng độ vitamin A chính xác khoảng 40 IU/ml.
*Điều kiện sắc ký:*
Cột kích thước (25 cm × 4 mm) được nhồi pha tĩnh C (5 µm đến 10 µm).
Detector quang phổ tử ngoại đặt ở bước sóng 325 nm.
Tốc độ dòng: 1,5 ml/min đến 2,0 ml/min.
Thể tích tiêm: 20 µl.
*Cách tiến hành:*
Kiểm tra tính phù hợp của hệ thống sắc ký: Tiến hành sắc ký với dung dịch chuẩn, độ lệch chuẩn tương đối (RSD) của diện tích pic thu được trên sắc ký đồ của 6 lần tiêm lặp lại mẫu chuẩn không được lớn hơn 2,0 %.
Tiến hành sắc ký lần lượt với dung dịch chuẩn và dung dịch thử.
*Cách tính kết quả:*
Hàm lượng vitamin A trong mẫu thử (IU/g) được tính theo công thức:

$$\frac{S_T \times C \times 100}{S_C \times m_T} \text{ (IU/g)}$$

Trong đó:
$S_T$ và $S_C$ là diện tích của pic vitamin A trên sắc đồ của thử và chuẩn;
$m_T$ là lượng cân mẫu thử (g);
C là nồng độ vitamin A trong dung dịch chuẩn (IU/ml).

***Chú ý***
Trong việc chuẩn bị dung dịch thử, nếu chế phẩm ở dạng thuốc nang, viên nén hoặc dạng bào chế thể rắn khác, sau khi bỏ vỏ, nghiền thành bột, mà vitamin A vẫn không hòa tan được trong ethanol (do ở dạng vi nang) thì phải xử lý trước bằng cách đun nóng với 10 ml *nước cất* trên cách thủy 5 min, dùng đũa thủy tinh nghiền nhỏ các khối rắn còn lại và giữ nóng thêm 5 min nữa rồi mới cho ethanol vào để hòa tan.
Nếu mẫu thử có nhiều tá dược dạng dầu thì nên thêm 2 ml *ethyl acetat (TT)* hoặc 2 ml *n-hexan (TT)* và lắc kỹ trước khi cho ethanol vào để hòa tan.
Nếu trên sắc đồ thu được ngoài pic của dạng vitamin A cần đo còn có pic của dạng vitamin A khác thì phải tiến hành theo phương pháp 2 hoặc 5.

**Phương pháp 4**
***(Phương pháp sắc ký lỏng sau khi thủy phân)***

Có thể áp dụng đối với nguyên liệu vitamin A tổng hợp dạng bột, dạng dầu và dạng nhũ tương.
Phương pháp sắc ký lỏng (Phụ lục 5.3).
*Pha động: Methanol - nước* (95 : 5).
*Dung dịch thử (1):*
*Đối với nguyên liệu dạng bột:* Cân 0,200 g chế phẩm vào bình định mức 100 ml. Thêm khoảng 20 mg đến 30 mg *bromelain (TT)*, 5,0 ml *nước* và 0,15 ml *2-propanol (TT)*. Đun trong cách thủy ở 60 °C đến 65 °C trong 5 min và thỉnh thoảng khuấy. Thêm 40 ml *dung dịch tetrabutylamoni hydroxyd 0,1 M trong 2-propanol (TT)*. Khuấy nhẹ và để thủy phân trong cách thủy ở 60 °C đến 65 °C trong 10 min, thỉnh thoảng khuấy. Đảm bảo chế phẩm được làm ướt hoàn toàn. Để nguội đến nhiệt độ phòng rồi pha loãng thành 100,0 ml bằng *2-propanol (TT)* có chứa 0,1 % *butyl hydroxytoluen (TT)*. Lắc đều cẩn thận tránh tạo bọt khí. Dung dịch có thể vẫn đục.
*Đối với nguyên liệu dạng dầu hoặc nhũ tương:* Cân 0,100 g chế phẩm vào bình định mức 100 ml. Hòa tan ngay trong 5 ml *pentan (TT)*. Thêm 40 ml *dung dịch tetrabutylamoni hydroxyd 0,1 M trong 2-propanol*. Khuấy nhẹ và để thủy phân trong cách thủy ở 60 °C đến 65 °C trong 10 min, thỉnh thoảng khuấy nhẹ. Để nguội đến nhiệt độ phòng, rồi pha loãng thành 100,0 ml bằng *2-propanol (TT)* có chứa 0,1 % *butyl hydroxytoluen (TT)*. Lắc cẩn thận tránh tạo bọt khí.
*Dung dịch thử (2):* Pha loãng dung dịch thử (1) bằng *2-propanol (TT)* để thu được dung dịch có nồng độ 100 IU/ml.
Lọc trước khi tiêm đối với dung dịch thử được chuẩn bị từ nguyên liệu dạng bột.
*Dung dịch chuẩn (1):* Cân chính xác 0,100 g retinyl acetat chuẩn (hàm lượng khoảng 1 000 000 IU/g) vào bình định mức 100 ml và tiến hành như dung dịch thử (1) đối với nguyên liệu dạng dầu hoặc nhũ tương.
*Dung dịch chuẩn (2):* Pha loãng 5,0 ml dung dịch chuẩn (1) thành 50,0 ml bằng *2-propanol (TT)*. Lắc cẩn thận tránh tạo bọt khí.
*Điều kiện sắc ký:*
Cột kích thước (12,5 cm × 4 mm) được nhồi pha tĩnh C (5 µm).
Detector quang phổ tử ngoại đặt ở bước sóng 325 nm.
Tốc độ dòng: 1 ml/min.
Thể tích tiêm: 10 µl.
*Cách tiến hành:*
Tiến hành sắc ký dung dịch thử (2) và dung dịch chuẩn (2) với thời gian gấp 1,5 lần thời gian lưu của retinol.
Thời gian lưu của retinol khoảng 3 min.
*Cách tính kết quả:*
Hàm lượng vitamin A trong mẫu thử (IU/g) được tính theo công thức:

$$\frac{S_T \times C \times m_C \times F}{S_C \times m_T \times 1000}$$

Trong đó:
$S_T$, $S_C$ là diện tích pic của retinol trên sắc đồ của dung dịch thử và dung dịch chuẩn;
$m_C$, $m_T$ là lượng cân mẫu chuẩn, thử (mg);
C là hàm lượng retinyl acetat chuẩn được xác định theo phương pháp 1 (IU/g);
F là độ pha loãng của dung dịch thử.

**Phương pháp 5**
***(Phương pháp sắc ký lỏng sau khi chiết tách vitamin A)***

Có thể áp dụng đối với các chế phẩm phức tạp và có chứa vitamin A với hàm lượng thấp không thực hiện được 1 trong 4 phương pháp trên.
Phương pháp sắc ký lỏng (Phụ lục 5.3).
*Pha động: Methanol - nước* (97 : 3).
*Dung dịch thử:* Lấy một lượng chế phẩm chứa khoảng 2000 IU vitamin A vào bình cầu nút mài, thêm 5 ml dung dịch *acid ascorbic (TT)* 10 % mới pha và 10 ml dung dịch *kali hydroxyd (TT)* 80 % mới pha, 100 ml *ethanol 96 % (TT)*, đun sôi 15 min trên cách thủy có lắp ống sinh hàn hồi lưu, thêm 100 ml dung dịch *natri clorid (TT)* 1 % và để nguội. Chuyển dung dịch vào bình chiết dung tích 500 ml, tráng rửa bình nút mài bằng 75 ml dung dịch *natri clorid (TT)* 1 % và rửa tiếp với 150 ml dung dịch đồng thể tích *ether dầu hỏa (40 °C đến 60 °C)* và *ether (TT)*, chuyển hết dịch tráng rửa vào bình chiết ở trên. Lắc 1 min, khi tách lớp hoàn toàn, bỏ lớp dưới, rửa lớp trên lần đầu với 50 ml dung dịch *kali hydroxyd (TT)* 3 % trong dung dịch 10 % (tt/tt) *ethanol 96 % (TT)*, sau đó rửa 3 lần, mỗi lần với 50 ml dung dịch *natri clorid (TT)* 1 %. Lọc nhanh lớp trên qua giấy lọc có chứa 5 g *natri sulfat khan (TT)* vào bình cầu 250 ml thích hợp để lắp vào dụng cụ cất quay. Rửa bình chiết bằng 10 ml hỗn hợp dung môi dùng để chiết mới pha [dung dịch đồng thể tích *ether dầu hỏa (40 °C đến 60 °C)* và *ether (TT)]*, lọc và gộp các dịch lọc lại. Cất quay ở nhiệt độ không quá 30 °C dưới áp suất giảm (đuổi nước) và đóng đầy với khí nitrogen khi bay hơi xong. Hoặc có thể bay hơi dung môi dưới luồng khí nitrogen ở nhiệt độ không quá 30 °C. Hòa tan cắn trong *2-propanol (TT)* và chuyển vào bình định mức 25 ml, pha loãng thành 25 ml với cùng dung môi, đun nóng nhẹ hay siêu âm nếu cần.
*Dung dịch chuẩn gốc:* Hòa tan retinyl acetat chuẩn trong *2-propanol ($TT_1$)* để thu được dung dịch có nồng độ khoảng 1000 IU vitamin A trong 1 ml. Nồng độ chính xác của dung dịch chuẩn gốc được xác định bằng phương pháp quang phổ hấp thụ tử ngoại và khả kiến (Phụ lục 4.1). Pha loãng dung dịch chuẩn gốc bằng *2-propanol ($TT_1$)* tới nồng độ 10 đến 15 IU trong 1 ml rồi đo độ hấp thụ ở bước sóng 326 nm trong cốc đo dày 1 cm, dùng *2-propanol ($TT_1$)* làm mẫu trắng.
Tính nồng độ vitamin A trong dung dịch chuẩn gốc (IU/ml) tính theo retinyl acetat theo công thức:

$$A_{326} \times \frac{1900 \times V_2}{100 \times V_1}$$

Trong đó:
$A_{326}$ là độ hấp thụ quang của dung dịch ở 326 nm;
$V_1$ là thể tích dung dịch chuẩn gốc đem pha loãng (ml);
$V_2$ là thể tích dung dịch loãng đã pha (ml);
1900 là hệ số chuyển đổi độ hấp thụ riêng của ester retinol thành IU.
*Dung dịch chuẩn:* Lấy chính xác 2 ml dung dịch chuẩn gốc đem xử lý hoàn toàn như mẫu thử. Xác định nồng độ chính xác của dung dịch chuẩn bằng phương pháp quang phổ hấp thụ tử ngoại và khả kiến (Phụ lục 4.1). Pha loãng dung dịch chuẩn bằng *2-propanol ($TT_1$)* tới nồng độ 10 IU đến 15 IU trong 1 ml rồi đo độ hấp thụ ở bước sóng 325 nm trong cốc đo dày 1 cm, dùng *2-propanol ($TT_1$)* làm mẫu trắng.
Tính nồng độ all-*trans*-retinol trong dung dịch chuẩn (IU/ml) theo công thức:

$$A_{325} \times \frac{1830 \times V_4}{100 \times V_3}$$

Trong đó:
$A_{325}$ là độ hấp thụ của dung dịch ở 325 nm;
$V_3$ là thể tích dung dịch chuẩn đem pha loãng (ml);
$V_4$ là thể tích dung dịch đã pha loãng (ml);
1830 là hệ số chuyển đổi độ hấp thụ riêng của all-*trans*-retinol thành IU.
*Điều kiện sắc ký:*
Cột kích thước (25 cm × 4 mm) được nhồi pha tĩnh C (5 đến 10 µm).
Tốc độ dòng: 1 ml/min.
Detector quang phổ tử ngoại đặt ở bước sóng 325 nm.
Thể tích tiêm: 10 µl.
*Cách tiến hành:*
Tiến hành sắc ký 3 lần với mỗi dung dịch thử và dung dịch chuẩn.
Thời gian lưu của all-*trans*-retinol khoảng (5 ± 1) min.
Kết quả được chấp nhận nếu đáp ứng các yêu cầu sau:
Trên sắc ký đồ của dung dịch thử có pic tương ứng với pic của all-*trans*-retinol trên sắc ký đồ của dung dịch chuẩn.
Khi dùng phương pháp thêm chuẩn vào dung dịch thử thì phần trăm thu hồi retinol acetat chuẩn phải lớn hơn 95 % và phần trăm thu hồi all-*trans*-retinol trong dung dịch chuẩn được xác định bằng phương pháp đo quang phải lớn hơn 95 % so với nồng độ tính từ dung dịch chuẩn gốc.
*Tính kết quả:*
Hàm lượng vitamin A trong mẫu thử (IU/g) được tính theo công thức:

$$S_1 \times \frac{C \times V}{S_2} \times \frac{1}{m}$$

Trong đó:
$S_1$ là diện tích pic của all-*trans*-retinol trên sắc đồ của dung dịch thử;
$S_2$ là diện tích pic của all-*trans*-retinol trên sắc đồ của dung dịch chuẩn;
C là nồng độ retinyl acetat trong dung dịch chuẩn gốc (IU/ml);
m là lượng chế phẩm đem xử lý thành dung dịch thử (g);
V là thể tích dung dịch chuẩn gốc đã đem xử lý (ml).

## 10.11 PHƯƠNG PHÁP PHÂN TÍCH ACID AMIN

Phương pháp phân tích acid amin là phương pháp xác định thành phần và hàm lượng các acid amin trong các protein và peptid, cũng như trong các chế phẩm thuốc. Phương pháp phân tích acid amin được áp dụng để định tính và định lượng các protein và peptid dựa trên các cấu tử acid

amin tạo ra chúng, để giúp việc xác định cấu trúc của các protein và peptid cũng như việc xác định cách phân đoạn của chúng nhằm thiết lập giản đồ peptid và để phát hiện các acid amin không điển hình có thể có mặt trong một protein hoặc peptid.

Trước khi phân tích acid amin trong protein hoặc peptid, cần thiết phải thủy phân protein hoặc peptid thành các acid amin. Sau đó tiến hành phân tách các acid amin thu được giống như khi ta phân tách các acid amin tự do có trong các chế phẩm thuốc. Điều quan trọng là chúng phải được biến đổi thành các dẫn chất thích hợp cho việc phân tách và phát hiện.

**Thiết bị**

Các phương pháp để phân tích acid amin thường dựa trên việc tách các acid amin có trong mẫu thử bằng phương pháp sắc ký. Các thiết bị sắc ký tự động thường chiếm lợi thế. Thiết bị phân tích acid amin điển hình là một máy sắc ký lỏng áp suất thấp hoặc áp suất cao, có khả năng thực hiện chương trình dung môi để tách các acid amin khi qua cột sắc ký. Máy cần có thêm thiết bị tạo dẫn chất acid amin sau cột, trừ khi mẫu thử được tạo thành dẫn chất trước cột. Để phát hiện kết quả, thường dùng detector hấp thụ tử ngoại - khả kiến hoặc detector huỳnh quang, tùy thuộc vào cách tạo dẫn chất đã áp dụng. Một thiết bị tích phân cho phép chuyển đổi tín hiệu tương tự đi từ detector ra và cho phép định lượng.

Thường sử dụng các máy chuyên dụng để phân tích acid amin.

**Chú ý**

Nhiễu đường nền luôn là mối quan tâm của người tiến hành phân tích acid amin. Để khắc phục, phải dùng các thuốc thử có độ tinh khiết cao (ví dụ acid hydrocloric có độ tinh khiết thấp có thể gây nhiễm glycin). Thông thường cách một vài tuần lại phải thay mới các thuốc thử. Chỉ dùng các dung môi dùng cho sắc ký lỏng. Lọc lại các dung môi trước khi dùng để giảm thiểu sự nhiễm khuẩn và các tạp chất. Đậy kín các bình đựng dung môi. Không để các thiết bị phân tích acid amin tiếp xúc trực tiếp với tia sáng mặt trời.

Chất lượng thực hành phòng thí nghiệm có thể quyết định chất lượng phân tích acid amin. Giữ phòng thí nghiệm sạch sẽ. Đặt thiết bị phân tích trong phòng thí nghiệm tại chỗ riêng biệt, ít bị ảnh hưởng của các hoạt động khác. Định kỳ rửa sạch và chuẩn hóa lại các pipet. Bảo quản đầu pipet trong hộp đậy kín. Không được cầm đầu piped bằng tay trần, phải mang găng tay bằng cao su không xoa bột talc hoặc loại khác có chất lượng tương đương. Hạn chế số lần mở và đóng bình đựng mẫu thử vì bụi có thể làm gia tăng kết quả về hàm lượng các chất glycin, serin và alanin. Cần bảo dưỡng tốt thiết bị phân tích acid amin để có kết quả chấp nhận được. Nếu thiết bị được dùng thường ngày thì hàng ngày phải kiểm tra độ rò rỉ dung môi của thiết bị, độ ổn định của đèn và detector, độ phân giải của cột.

Định kỳ làm sạch hoặc thay thế các kính lọc của thiết bị và các linh phụ kiện cần bảo dưỡng khác.

**Các chất đối chiếu**

Trên thị trường có sẵn các acid amin chuẩn để dùng trong phân tích acid amin; chúng thường là dung dịch hỗn hợp các acid amin chuẩn trong nước. Khi cần xác định thành phần acid amin trong một mẫu thử, các protein hoặc peptid chuẩn phải được phân tích song song với mẫu thử để kiểm tra sự toàn vẹn của thử nghiệm. Trong trường hợp này, chuẩn protein được sử dụng là albumin huyết thanh bò tinh khiết cao.

**Chuẩn hóa thiết bị**

Việc chuẩn hóa thiết bị phân tích acid amin được thực hiện bằng cách phân tích một chuẩn acid amin, gồm hỗn hợp các acid amin chuẩn đã biết trước hàm lượng của từng chất, để xác định hệ số đáp ứng và khoảng tuyến tính ứng với mỗi một acid amin chuẩn đã thử.

Pha loãng mẫu chuẩn acid amin thành nhiều dung dịch có nồng độ khác nhau, nằm trong khoảng tuyến tính dự đoán trước của các acid amin có trong mẫu chuẩn. Tiến hành phân tích nhiều lần với mỗi nồng độ. Biểu thị kết quả thu được trên biểu đồ thể hiện tương quan giữa diện tích pic thu được ứng với mỗi nồng độ của acid amin đã thử. Nhờ biểu đồ này, có thể xác định được khoảng tuyến tính của mỗi acid amin, tại đó, các diện tích pic thu được có tương quan xấp xỉ tuyến tính với các nồng độ của các acid amin đã thử. Khi phân tích acid amin, để có kết quả đúng và lặp lại, điều quan trọng là phải pha và thử nghiệm trên các mẫu thử có nồng độ nằm trong khoảng tuyến tính tương ứng với kỹ thuật phân tích đang áp dụng.

Để xác định hệ số đáp ứng cho mỗi acid amin, ta phân tích từ 4 nồng độ đến 6 nồng độ của acid amin chuẩn tương ứng. Hệ số đáp ứng tính được là giá trị trung bình của diện tích pic (hoặc của chiều cao pic) ứng với nồng độ 1 nanomol của dung dịch acid amin chuẩn. Thiết lập một dãy chuẩn hóa bao gồm hệ số đáp ứng tương ứng của các acid amin và sử dụng dãy này để tính nồng độ (nanomol) của mỗi acid amin có trong mẫu thử bằng cách chia diện tích pic (hoặc chiều cao pic) thu được của acid amin đó cho hệ số đáp ứng tương ứng có trong dãy chuẩn hóa.

Trong việc phân tích thường ngày, khi dùng dãy chuẩn hóa, ta chỉ cần xác định một diện tích pic là đủ. Tuy nhiên, dãy chuẩn hóa này phải thường xuyên được thử lại bằng các phân tích kiểm tra và được cập nhật để bao đảm tính toàn vẹn của nó.

**Độ lặp lại**

Muốn có các kết quả phân tích acid amin có chất lượng ổn định tại một phòng thí nghiệm phân tích, cần quan tâm đến độ lặp lại của phép định lượng. Cần có một hệ thống thiết bị phân tích các acid amin có khả năng cung cấp các giá trị lặp lại của thời gian lưu của pic (để định tính) và các giá trị lặp lại của diện tích pic (để định lượng). Cách xác định tiêu biểu độ lặp lại bao gồm việc pha chế một dung dịch chuẩn các acid amin, rồi tiến hành đo mẫu đó nhiều lần (6 lần hoặc nhiều hơn). Sau đó, tính độ lệch chuẩn của các giá trị thời gian lưu và độ lệch chuẩn các giá trị diện

tích pic đã được tích phân, ứng với mỗi acid amin đã được phân tích. Việc xác định độ lặp lại còn được mở rộng bằng cách nhiều người phân tích khác nhau cùng tiến hành xác định độ lặp lại đó trong nhiều ngày. Người ta còn thực hiện việc định lượng nhiều dung dịch có nồng độ khác nhau của chuẩn gốc để xác định sự biến thiên do việc pha chế mẫu thử. Thường người ta phân tích thành phần acid amin của một protein chuẩn (ví dụ albumin huyết thanh bò) để đánh giá độ lặp lại. Nhờ việc xác định độ lệch chuẩn, ta có thể thiết lập các giới hạn phân tích để đạt kết quả tốt, với độ lệch chuẩn thấp nhất. Để giảm bớt sai số trong phân tích, nhiều yếu tố cần được quan tâm và xem xét đầy đủ như: cách chuẩn bị mẫu thử, nhiễu đường nền do chất lượng của các thuốc thử, việc thực hành thí nghiệm, tính năng và việc bảo dưỡng máy móc thiết bị, các dữ liệu phân tích và cách biện giải và cuối cùng là việc thực thi thành thạo của người làm phân tích.

**Chuẩn bị mẫu thử**

Muốn có kết quả phân tích acid amin đúng, phải dùng các mẫu thử protein và peptid đã tinh chế. Các tạp chất như các muối, ure, chất tẩy rửa... có thể gây nhiễu, nên cần phải loại khỏi mẫu thử trước khi tiến hành phân tích. Phương pháp điều chế dẫn chất sau cột sắc ký không bị nhiễm bởi các tạp chất ở mức độ lớn như khi điều chế dẫn chất trước cột sắc ký. Nên giảm số thao tác trên mẫu thử để giảm nhiễu đường nền, tăng kết quả tìm thấy và giảm công lao động. Các cách thông thường để loại tạp chất trong mẫu thử protein bao gồm:

Tách bằng sắc ký lỏng cao áp pha đảo, thu protein bằng một dung môi bay hơi có chứa một lượng thích hợp thành phần hữu cơ rồi làm khô bằng ly tâm chân không;

Thẩm tách loại bỏ tạp chất;

Ly tâm siêu lọc;

Kết tủa protein bằng một dung môi hữu cơ (ví dụ aceton);

Lọc qua gel.

**Chất chuẩn nội**

Cần dùng một chất chuẩn nội để kiểm soát những mất mát và biến đổi lý hóa học xảy ra trong quá trình phân tích acid amin. Do đó, trước khi tiến hành thủy phân phải thêm một lượng chính xác chất chuẩn nội vào dung dịch protein cần phân tích. Lượng chuẩn nội tìm thấy được sẽ là một thông số chung cho lượng tìm thấy được của các acid amin có trong protein. Tuy nhiên các acid amin tự do và các acid amin liên kết trong cấu trúc protein không giống nhau về tốc độ thủy phân hoặc phân hủy. Vì vậy việc dùng chất chuẩn nội để hiệu chỉnh sự mất mát trong quá trình thủy phân có thể cho kết quả không đáng tin cậy. Cần chú ý điều này khi biện giải kết quả phân tích. Ta còn có thể thêm chất chuẩn nội vào hỗn hợp các acid amin sau khi đã được thủy phân để hiệu chỉnh những sai lệch về kết quả phân tích gây ra do các sai lệch khi tiêm mẫu, do thay đổi độ ổn định của thuốc thử cũng như tốc độ dòng của dung môi. Chất chuẩn nội lý tưởng là một acid amin bậc nhất nhân tạo, có sẵn trên thị trường với giá rẻ. Chất này phải bền vững trong quá trình thủy phân, có hệ số đáp ứng tuyến tính với nồng độ và phải được rửa giải cho một pic có thời gian lưu duy nhất và được phân giải tốt với các pic tương ứng với các acid amin khác. Các chất chuẩn nội thường được dùng bao gồm norleucin, nitrotyrosin và acid α-aminobutyric.

**Thủy phân protein**

Cần thiết phải tiến hành thủy phân các mẫu thử protein và peptid trước khi phân tích các acid amin tạo thành. Để tránh sai kết quả, các đồ thủy tinh dùng trong thủy phân phải hết sức sạch. Dấu vân tay trên ống thủy phân hoặc bột tách ra từ bao tay cũng có thể làm nhiễm bẩn mẫu thử. Để rửa sạch các ống thủy tinh dùng trong thủy phân (ống thủy phân), ta đun sôi chúng 1 h trong dung dịch acid hydrocloric 1 M hoặc ngâm chúng trong acid nitric đậm đặc hoặc trong hỗn hợp đồng thể tích acid hydrocloric và dung dịch nitric đậm đặc. Sau đó tráng sạch bằng nước cất tinh khiết cao, tiếp đến bằng methanol dùng trong sắc ký lỏng cao áp. Cuối cùng sấy qua đêm trong tủ sấy rồi bảo quản kín cho đến khi dùng. Cũng có thể nung đồ thủy tinh dùng để thủy phân ở nhiệt độ 500 °C trong 4 h để tránh nhiễm bẩn. Cũng có thể sử dụng loại dụng cụ thích hợp, chỉ dùng một lần rồi bỏ.

Thủy phân bằng acid là phương pháp thông dụng nhất để thủy phân một mẫu thử protein trước khi tiến hành phân tách các acid amin tạo ra mẫu thử đó. Thủy phân bằng acid có thể cho kết quả phân tích thay đổi vì một số acid amin bị phân hủy một phần hay hoàn toàn. Cụ thể là: Tryptophan bị phân hủy, serin và threonin bị phân hủy một phần, methionin có thể bị oxy hóa còn cystein thì chuyển đổi thành cystin (tuy nhiên lượng cystin tìm thấy được thường thấp hơn thực tế vì một phần bị phân hủy hoặc bị khử trở lại thành cystein). Có thể giảm thiểu sự phân hủy do bị oxy hóa bằng cách tiến hành thủy phân trong môi trường chân không thích hợp (áp suất thấp hơn 200 µm thủy ngân hoặc 26,7 Pa) hoặc bằng cách nạp một khí trơ (argon) vào khoảng trống phía trên của bình phản ứng. Các đường nối peptid giữa isoleucin - isoleucin, valin - valin, isoleucin - valin và valin - isoleucin chỉ có một phần được cắt đứt để giải phóng acid amin thôi. Asparagin và glutamin đều bị khử amid để thành acid aspartic và acid glutamic tương ứng. Vì tryptophan, asparagin và glutamin bị mất mát trong khi thủy phân bằng acid nên ta chỉ còn định lượng được 17 acid amin. Một số kỹ thuật thủy phân mô tả sau đây sẽ đề cập cách khắc phục các trở ngại nêu trên. Tuy nhiên một số kỹ thuật (từ số 4 đến số 11) lại có thể biến đổi một số acid amin khác. Vì vậy cần cân nhắc lợi hại khi chọn kỹ thuật thủy phân protein/peptid và phải thực nghiệm thích hợp trước khi chọn một kỹ thuật thủy phân khác kỹ thuật thủy phân bằng acid.

Thường hay dùng phương pháp phân tích acid amin theo chương trình thời gian thủy phân (tức là phân tích acid amin ở các thời điểm thủy phân là 24 h, 48 h và 72 h) để xác định nồng độ ban đầu của các acid amin dễ bị phân hủy hoặc chậm bị phân tách khi thủy phân: Vẽ đồ thị biểu thị sự liên quan giữa nồng độ thu được của acid amin dễ

bị phân hủy (ví dụ serin, threonin) với thời gian thủy phân rồi ngoại suy tới điểm gốc thời gian, ta sẽ được nồng độ ban đầu (nồng độ ở gốc thời gian) của acid amin dễ bị phân hủy đó. Áp dụng phương pháp chương trình thời gian thủy phân này cho các acid amin chậm được phân tách (ví dụ isoleucin và valin), trên đồ thị sẽ có một đoạn bằng (đoạn thẳng nằm ngang) ứng với nồng độ của acid amin cần phân tích đó. Nếu thời gian thủy phân quá dài, nồng độ của các acid amin cần phân tích sẽ bắt đầu giảm, chứng tỏ acid amin đó đã bị phân hủy do điều kiện thủy phân.

Một cách khác của phân tích acid amin theo chương trình thời gian thủy phân được chấp thuận là cho một chuẩn acid amin trải qua cùng các điều kiện như khi thủy phân mẫu thử protein/peptid. Acid amin chuẩn, ở thể tự do, có thể sẽ không có kết quả hoàn toàn tiêu biểu cho tốc độ phân hủy của các acid amin dễ bị phân hủy có trong mẫu thử protein/peptid. Điều này đặc biệt đúng đối với các liên kết peptid chậm bị phân tách (như liên kết isoleucin - valin). Tuy nhiên cách phân tích này sẽ cho phép giải thích một vài trường hợp phân hủy acid amin trong mẫu thử.

Cách thủy phân bằng acid trong lò vi sóng cũng đã được sử dụng, cho kết quả nhanh chóng nhưng đòi hỏi thiết bị đặc biệt và cần thận trọng đặc biệt. Phải xác định được các điều kiện thủy phân trong lò vi sóng tối ưu cho mỗi mẫu thử protein/peptid riêng biệt. Thủy phân trong lò vi sóng chỉ cần thời gian ít phút, nhưng nếu chỉ thêm hoặc bớt một phút so với yêu cầu thôi cũng sẽ có thể có kết quả sai lệch (hoặc do các acid amin dễ bị phân hủy sẽ bị phân hủy hoặc do mẫu thử chưa được thủy phân hoàn toàn).

Cách thủy phân hoàn toàn bằng một hỗn hợp các men protease cũng được áp dụng nhưng phức tạp, đòi hỏi phải được kiểm soát chặt chẽ và thường được áp dụng nhiều để phân tích các peptid hơn là các protein.

Khi tiến hành phân tích lần đầu một mẫu thử protein mới, cần phải làm thực nghiệm để xác định các điều kiện tối ưu về thời gian và nhiệt độ thủy phân.

***Kỹ thuật thủy phân 1***

Thủy phân bằng acid hydrocloric có chứa một lượng phenol là kỹ thuật thông dụng nhất để thủy phân mẫu thử protein/peptid trước khi tiến hành phân tích acid amin. Thêm phenol vào môi trường thủy phân cốt để ngăn ngừa hiện tượng halogen hóa tyrosin.

*Dung dịch thủy phân:* Dung dịch acid hydrocloric 6 M chứa từ 0,1 % đến 1 % phenol.

*Thủy phân pha lỏng:* Cho vào ống thủy phân mẫu thử protein/peptid rồi làm khô (để loại nước, tránh pha loãng dung dịch thủy phân). Cứ 500 µg mẫu thử đông khô, ta thêm 200 µl dung dịch thủy phân. Làm lạnh ống thử trong aceton đông băng khan. Hàn ống thủy phân ở chân không. Thủy phân mẫu thử trong 24 h ở 110 °C và trong chân không hoặc khí trơ để tránh oxy hóa. Nếu lo ngại mẫu thử chưa được thủy phân hoàn toàn, cần nghiên cứu kéo dài thêm thời gian thủy phân (ví dụ trong 48 h và 72 h).

*Thủy phân pha hơi:* Đây là một trong các kỹ thuật thủy phân thông dụng nhất được ưa dùng để làm vi phân tích, khi chỉ có một lượng nhỏ mẫu thử. Kỹ thuật này cũng cho phép giảm thiểu việc mẫu thử bị nhiễm bẩn bởi dung dịch thủy phân. Đặt ống thủy phân chứa mẫu thử đã làm khô trong một ống thử to hơn, ống này chứa một lượng thích hợp dung dịch thủy phân và như vậy ngăn không cho mẫu thử tiếp xúc trực tiếp với dung dịch thủy phân. Hút chân không (áp suất thấp hơn 200 µm thủy ngân hoặc 26,7 Pa), hoặc bơm một khí trơ vào phần trên của ống thử. Hàn ống lớn và thủy phân ở 110 °C trong 24 h. Hơi acid sẽ thủy phân mẫu thử và lượng acid ngưng tụ trong ống thủy phân chứa mẫu thử là tối thiểu. Sau khi thủy phân xong, sấy khô mẫu thử trong chân không để loại bỏ acid dư thừa.

***Kỹ thuật thủy phân 2***

Giảm hiện tượng oxy hóa tryptophan trong khi thủy phân bằng cách dùng acid mercaptoethansulfonic (MESA) làm acid khử.

*Dung dịch thủy phân: Dung dịch MESA 2,5 M.*

*Thủy phân pha hơi:* Làm khô 1 µg đến 100 µg mẫu thử protein/peptid trong ống thủy phân. Đặt ống thủy phân trong một ống lớn hơn, chứa khoảng 200 µl dung dịch thủy phân. Hàn ống lớn trong chân không (áp suất khoảng 50 µm thủy ngân hoặc 6,7 Pa). Thủy phân ở 170 °C đến 185 °C trong khoảng 12,5 min. Sau khi thủy phân xong làm khô ống thủy phân ở chân không trong 15 min để loại acid dư thừa.

***Kỹ thuật thủy phân 3***

Ngăn ngừa hiện tượng oxy hóa tryptophan bằng cách dùng acid thioglycolic (TGA) làm acid khử.

*Dung dịch thủy phân:* Dung dịch acid hydrocloric 7 M chứa 1 % phenol, 10 % acid trifluoroacetic và 20 % acid thioglycolic.

*Thủy phân pha hơi:* Làm khô từ 10 µg đến 50 µg mẫu thử protein/peptid trong một ống thủy phân. Đặt ống thủy phân trong một ống lớn hơn, chứa khoảng 200 µl dung dịch thủy phân. Hàn ống lớn trong chân không (áp suất khoảng 50 µm thủy ngân hoặc 6,7 Pa). Thủy phân mẫu thử ở 166 °C trong khoảng 15 min đến 30 min. Sau khi thủy phân xong, làm khô ống thủy phân trong chân không trong 5 min để loại acid dư thừa.

Lượng tryptophan tìm thấy có thể phụ thuộc vào lượng mẫu lấy thử.

***Kỹ thuật thủy phân 4***

Oxy hóa cystein/cystin và methionin bằng acid performic trước khi thủy phân mẫu thử.

*Dung dịch oxy hóa:* Dùng acid performic mới pha bằng cách trộn đều 1 thể tích *hydrogen peroxyd 30 % (TT)* với 9 thể tích *acid formic khan (TT)*, rồi để ở nhiệt độ phòng trong 1 h.

*Tiến hành:* Hòa tan mẫu thử protein/peptid trong 20 µl *acid formic khan (TT)* và để ở 50 °C trong 5 min. Sau đó thêm 100 µl dung dịch oxy hóa. Để phản ứng xảy ra trong 10 min đến 30 min. Cystein sẽ chuyển thành acid cysteic, còn methionin thành methionin sulfon. Ly tâm chân không

để loại thuốc thử thừa, rồi thủy phân mẫu thử đã được oxy hóa theo kỹ thuật 1 hoặc 2 nói trên.
Kỹ thuật 4 này có thể làm biến đổi tyrosin khi môi trường có muối halid.

***Kỹ thuật thủy phân 5***
Oxy hóa cystein/cystin trong quá trình thủy phân pha lỏng bằng natri azid.
*Dung dịch thủy phân:* Thêm vào *dung dịch acid hydrocloric 6 M (TT)* có chứa 0,2 % phenol một lượng *natri azid (TT)* để có nồng độ 0,2 %. Phenol có trong dung dịch thủy phân ngăn ngừa sự halogen hóa của tyrosin.
*Thủy phân pha lỏng:* Thủy phân mẫu thử protein/peptid ở 110 °C trong 24 h. Trong quá trình thủy phân, cystein/cystin trong mẫu thử chuyển thành acid cysteic bởi tác dụng của natri azid có trong dung dịch thủy phân. Kỹ thuật 5 này cho kết quả tìm thấy của tyrosin tốt hơn kỹ thuật 4 nhưng lại không định lượng được methionin. Methionin chuyển thành hỗn hợp của methionin với 2 dẫn chất oxy hóa là methionin sulfoxid và methionin sulfon.

***Kỹ thuật thủy phân 6***
Oxy hóa cystein/cystin bằng *dimethyl sulfoxid (DMSO) (TT).*
*Dung dịch thủy phân:* Thêm vào dung dịch acid hydrocloric 6 M, chứa 0,1 % đến 1 % phenol, một lượng DMSO để được dung dịch nồng độ DMSO 2 % (tt/tt).
*Thủy phân pha hơi:* Tiến hành thủy phân mẫu thử protein/peptid ở khoảng 110 °C trong 24 h. Trong quá trình thủy phân, cystein/cystin có trong mẫu thử sẽ bị DMSO có trong dung dịch thủy phân chuyển thành acid cysteic. Để hạn chế sự bất ổn định của kết quả thu được và để chỉnh lý những sai lệch do sự phân hủy từng phần, người ta khuyên nên xác định kết quả tìm thấy acid cysteic sau khi đã thủy phân oxy hóa các mẫu protein chuẩn chứa từ 1 mol đến 8 mol cystein. Các hệ số đáp ứng thu được từ các dung dịch thủy phân protein/peptid thường thấp hơn khoảng 30 % so với hệ số đáp ứng thu được từ các chuẩn acid cysteic không qua thủy phân.
Vì histidin, methionin, tyrosin và tryptophan đều bị biến đổi nên kỹ thuật 6 này không cho kết quả phân tích đầy đủ thành phần cấu tạo của protein/peptid.

***Kỹ thuật thủy phân 7***
Khử oxy và alkyl hóa cystein/cystin bằng phản ứng pyridylethyl hóa ở pha hơi.
*Dung dịch khử:* Cho vào một bình thích hợp: 83,3 µl *pyridin (TT)*, 16,7 µl *4-vinylpyridin*, 16,7 µl *tributyl phosphin* và 83,3 µl *nước cất* rồi trộn đều.
*Tiến hành:* Cho vào ống thủy phân một lượng mẫu thử protein/peptid (trong khoảng từ 1 µg đến 100 µg). Đặt ống thủy phân vào một ống lớn hơn đã có sẵn dung dịch khử. Hàn kín ống lớn ở chân không (áp suất khoảng 50 µm thủy ngân hoặc 6,7 Pa) rồi làm nóng ở 100 °C trong 5 min. Sau đó lấy ống thủy phân ra, làm khô trong bình hút ẩm chân không trong 15 min để loại bỏ thuốc thử dư thừa. Cuối cùng thủy phân mẫu thử đã được pyridylethyl hóa, theo một trong các kỹ thuật thủy phân mô tả ở trên. Song song, tiến hành pyridylethyl hóa trong cùng điều kiện một mẫu chuẩn protein chứa 1 mol đến 8 mol cystein để xác định giá trị tìm thấy của pyridylethyl cystein.
*Chú ý:* Việc kéo dài thời gian phản ứng pyridylethyl hóa sẽ gây biến đổi các nhóm α-amino và ε-amino của lysin có trong mẫu thử protein/peptid.

***Kỹ thuật thủy phân 8***
Khử oxy và alkyl hóa cystein/cystin bằng phản ứng pyridylethyl hóa ở pha lỏng.
*Các dung dịch gốc:* Pha chế và lọc 3 dung dịch trong *nước* sau đây:
Dung dịch gốc A: *Dung dịch Tris-hydroclorid 1 M (pH 8,5) chứa 4 mM dinatri edetat.*
Dung dịch gốc B: *Dung dịch guanidin hydroclorid 8 M.*
Dung dịch gốc C: *Dung dịch 2-mercaptoethanol 10 %.*
*Dung dịch khử:* Pha hỗn hợp gồm 1 thể tích dung dịch gốc A và 3 thể tích dung dịch gốc B để có dung dịch đệm guanidin hydroclorid 6 M trong Tris-hydroclorid 0,25 M.
*Tiến hành:* Hòa tan khoảng 10 µg mẫu thử protein/peptid trong 50 µl dung dịch khử, rồi thêm 2,5 µl dung dịch gốc C. Để 2 h ở nhiệt độ phòng, trong khí nitrogen hoặc argon và ở chỗ tối. Để thực hiện phản ứng pyridylethyl hóa, thêm vào khoảng 2 µl 4-vinylpyridin và để yên 2 h trong tối, ở nhiệt độ phòng. Sau đó, loại tạp bằng cách tách bằng sắc ký lỏng cao áp pha đảo. Làm khô mẫu thử protein/peptid sau khi qua sắc ký bằng cách ly tâm chân không rồi tiến hành thủy phân bằng acid.

***Kỹ thuật thủy phân 9***
Khử oxy và alkyl hóa cystein/cystin bằng phản ứng carboxymethyl hóa ở pha lỏng.
*Các dung dịch gốc:* Pha như ở kỹ thuật thủy phân 8.
*Dung dịch carboxymethyl hóa: Dung dịch iodoacetamid 10 % trong ethanol 96 %.*
*Dung dịch đệm:* Dùng dung dịch khử của kỹ thuật thủy phân 8.
*Tiến hành:* Hòa tan mẫu thử protein/peptid trong 50 µl dung dịch đệm, thêm khoảng 2,5 µl dung dịch gốc C. Bảo quản 2 h trong khí nitrogen hoặc argon ở nhiệt độ phòng và trong tối. Thêm một lượng dung dịch carboxymethyl hóa gấp 1,5 lần tổng lượng các thiol có trong mẫu thử theo lý thuyết. Nếu không biết hàm lượng các thiol trong mẫu thử thì cứ 20 nanomol protein dùng 5 µl *dung dịch iodoacetamid 100 mM.* Để tiếp 30 min trong tối ở nhiệt độ phòng. Sau đó thêm lượng dư *2-mercaptoethanol* để dừng phản ứng. Loại tạp và thu phần protein/peptid bằng cách phân tách trên sắc ký lỏng pha đảo. Làm khô phần protein/peptid thu được bằng ly tâm chân không trước khi thủy phân bằng acid.
Chất S-carboxyamidomethylcystein mới tạo thành được chuyển đổi thành S-carboxymethylcystein trong quá trình thủy phân.

***Kỹ thuật thủy phân 10***
Cystein/cystin tác dụng với acid dithiodiglycolic hoặc acid dithiodipropionic để cho một disulfid hỗn tạp. Tùy theo

yêu cầu về độ phân giải của kỹ thuật phân tích acid amin được áp dụng mà chọn dùng acid dithiodiglycolic hoặc acid dithiodipropionic.

*Dung dịch khử: Dung dịch acid dithiodiglycolic* (hoặc *acid dithiodipropionic*) *1 % trong dung dịch NaOH 0,2 M.*

*Tiến hành:* Cho vào ống thủy phân khoảng 20 µg mẫu thử protein/peptid. Thêm 5 µl dung dịch khử và 10 µl *isopropanol.* Ly tâm chân không để loại pha lỏng rồi thủy phân mẫu thử theo kỹ thuật thủy phân 1.

Kỹ thuật 10 này có lợi là các thành phần acid amin khác trong mẫu thử không bị ảnh hưởng của phản ứng và không cần loại tạp trước khi thủy phân.

***Kỹ thuật thủy phân 11***

Trong quá trình thủy phân bằng acid, asparagin và glutamin được chuyển đổi thành acid aspartic và acid glutamic tương ứng. Asparagin và acid aspartic được biểu thị bằng một đại lượng chung Asx, còn glutamin và acid glutamic bằng Glx. Trái lại, khi thủy phân bằng acid với sự có mặt của thuốc thử bis (1,1-trifluoroacetoxy)iodobenzen (BTI), asparagin và glutamin bị tác dụng và chuyển tương ứng thành acid diaminopropionic và acid diaminobutyric. Nhờ đó, ta xác định được asparagin và glutamin trong protein/peptid ngay khi có mặt của acid aspartic và acid glutamic.

*Các dung dịch khử:* Pha chế và lọc 3 dung dịch sau:

Dung dịch A: *Dung dịch acid trifluoroacetic 10 mM.*

Dung dịch B: *Dung dịch chứa guanidin hydroclorid 5 M và acid trifluoroacetic 10 mM.*

Dung dịch C: *Dung dịch mới pha BTI 3,6 % trong dimethylformamid.*

*Tiến hành:* Cho vào một ống thủy phân sạch khoảng 200 µg mẫu thử protein/peptid, 2 ml dung dịch A hoặc dung dịch B và 2 ml dung dịch C. Hàn ống thủy phân trong chân không. Để 4 h ở nhiệt độ 60 °C, trong tối. Sau đó thẩm tách mẫu thử bằng *nước cất* để loại bỏ thuốc thử dư thừa. Chiết mẫu thử đã thẩm tách 3 lần bằng 3 thể tích tương đương *butyl acetat (TT),* rồi làm đông khô.

Cuối cùng thủy phân mẫu thử đông khô theo các kỹ thuật thủy phân đã nói ở trên.

Các acid α,β-diaminopropionic và α,γ- diaminobutyric đều không được phân giải rõ ràng với lysin có trong mẫu thử, khi phân tách bằng sắc ký trao đổi ion. Vì vậy, khi dùng sắc ký trao đổi ion để tách các acid amin, hàm lượng của asparagin và của glutamin có mặt trong mẫu thử được xác định bằng hiệu số giữa hàm lượng của acid aspactic và của acid glutamic tương ứng thu được khi thủy phân acid không có BTI và hàm lượng của acid aspartic và của acid glutamic tương ứng thu được khi thủy phân có BTI.

Hàm lượng của threonin, methionin, cystein, tyrosin và histidin có thể bị sai lệch khi thủy phân bằng acid có BTI. Vì vậy, muốn có giá trị đúng của các hàm lượng này, mẫu thử phải được thủy phân bằng acid, không có thuốc thử BTI.

**Tách và phát hiện các acid amin**

Có nhiều kỹ thuật để tách và phát hiện các acid amin. Lựa chọn kỹ thuật nào phụ thuộc vào yêu cầu về độ nhạy của phép định lượng. Nhìn chung, khoảng một nửa các phép phân tích acid amin dựa trên việc tách thành acid amin tự do bằng sắc ký lỏng trao đổi ion rồi tạo dẫn chất sau cột phân tách. Kỹ thuật tạo dẫn chất sau cột có thể áp dụng cho các mẫu thử có một lượng nhỏ chất đệm (như các muối và urê) và thường cần từ 5 µg đến 10 µg mẫu thử protein cho một lần phân tích.

Các kỹ thuật còn lại, bao gồm việc tạo các dẫn chất trước cột rồi tách chúng bằng sắc ký lỏng cao áp pha đảo. Các kỹ thuật tạo dẫn chất trước cột rất nhạy và thường chỉ cần từ 0,5 µg đến 1,0 µg mẫu thử protein/peptid cho mỗi lần phân tích, nhưng lại có thể bị ảnh hưởng bởi các muối đệm có trong mẫu thử. Mặt khác, kỹ thuật tạo dẫn chất trước cột còn có thể cho nhiều dẫn chất khác nhau của cùng một acid amin, do đó gây trở ngại cho việc biện giải kết quả phân tích. So với kỹ thuật tạo dẫn chất trước cột, thường kỹ thuật tạo dẫn chất sau cột ít bị ảnh hưởng bởi các biến thiên trong việc thực hiện phép định lượng hơn.

Có thể dùng các kỹ thuật sau đây để phân tích định lượng các acid amin.

Thiết bị và thuốc thử đều có sẵn trên thị trường. Hơn nữa, hiện có nhiều cải tiến về các mặt như pha chế thuốc thử, cách tiến hành phản ứng, thiết bị sắc ký dùng trong các kỹ thuật này, v.v.... Các thông số đặc trưng có thể thay đổi tùy thuộc vào thiết bị đã dùng và cách tiến hành phân tích. Nhiều phòng thí nghiệm còn áp dụng đồng thời nhiều kỹ thuật chứ không chỉ một, để tận dụng lợi ích của mỗi kỹ thuật đã áp dụng. Trong các kỹ thuật sau đây, tín hiệu tương tự được hiển thị trên máy ghi và diện tích các pic được tích phân để định lượng.

*Kỹ thuật 1: Tạo dẫn chất sau cột với thuốc thử ninhydrin*

Sắc ký trao đổi ion tạo dẫn chất sau cột với thuốc thử ninhydrin là một trong các kỹ thuật thông dụng nhất để phân tích định lượng các acid amin. Theo nguyên tắc, sắc ký trao đổi cation, dùng lithi làm đối ion trong pha động được áp dụng để phân tích các mẫu thử sinh học phức tạp; trái lại, sắc ký trao đổi cation, dùng natri làm đối ion trong pha động, nhanh hơn, được dùng với các mẫu thử đơn giản hơn, gồm hỗn hợp các acid amin đã được thủy phân từ protein/peptid ra (tiêu biểu gồm 17 acid amin khác nhau). Việc phân tích acid amin trên cột trao đổi ion được thực hiện thông qua sự phối hợp giữa thay đổi pH và thay đổi lực ion của pha động (chương trình dung môi). Chương trình nhiệt độ cũng thường được áp dụng để tăng nhanh sự phân tách.

Các acid amin bậc nhất tác dụng với ninhydrin cho hợp chất màu tím, hấp thụ cực đại ở bước sóng 570 nm. Trái lại, các acid amin bậc 2 (các imino acid) như prolin, tác dụng với ninhydrin cho hợp chất màu vàng, hấp thụ cực đại ở 440 nm. Vì vậy ta phát hiện các dẫn chất của acid amin thu được sau cột ở các bước sóng 440 nm và 570 nm. Đối với đa số các dẫn chất acid amin, giới hạn phát hiện được xác định là 10 picomol; đối với dẫn chất của prolin, giới hạn đó là 50 picomol. Khoảng tuyến tính là 20 picomol đến 500 picomol, với hệ số tương quan

r > 0,999. Để có kết quả tốt, dùng một lượng mẫu thử lớn hơn 1 µg để thủy phân trước khi phân tích các acid amin trong protein/peptid là thích hợp nhất.

*Kỹ thuật 2: Tạo dẫn chất sau cột với thuốc thử OPA*

Thuốc thử ortho-phthalaldehyd (OPA) tác dụng với các amin bậc nhất, khi có mặt một hợp chất thiol, cho các hợp chất isoindol phát huỳnh quang. OPA không tác dụng với các amin bậc 2 (các imino acid như prolin) để có hợp chất phát huỳnh quang; tuy nhiên, nếu oxy hóa chúng bằng natri hypoclorid hoặc cloramin T thì phản ứng với OPA sẽ xảy ra. Do đó, để phân tích các acid amin trong mẫu thử protein/peptid bằng kỹ thuật này, ta phải tách các acid amin tự do bằng sắc ký trao đổi cation mạnh rồi oxy hóa sau cột bằng natri hypoclorid hoặc cloramin T và tiếp đó tạo dẫn chất phát huỳnh quang bằng thuốc thử OPA với sự có mặt của một hợp chất thiol như N-acetyl-L-cystein hoặc 2-mercaptoethanol. Các acid amin bậc nhất không bị ảnh hưởng bởi sự oxy hóa nói trên.

Việc tách các acid amin bằng sắc ký lỏng trao đổi ion được thực hiện nhờ sự phối hợp giữa việc thay đổi pH và thay đổi lực ion của pha động (chương trình dung môi). Sau khi được phân tách, các dẫn chất phát huỳnh quang sẽ được phát hiện với bước sóng kích thích ở 348 nm và bước sóng phát quang ở 450 nm.

Giới hạn phát hiện được xác định ở mức một vài chục picomol, đối với đa số các dẫn chất OPA của acid amin. Khoảng tuyến tính là từ vài picomol đến vài chục nanomol. Để có kết quả phân tích tốt, lấy mẫu thử protein/peptid lớn hơn 500 ng để thủy phân.

*Kỹ thuật 3: Tạo dẫn chất trước cột với thuốc thử PITC*

Thuốc thử phenylisothiocyanat (PITC) tác dụng với các acid amin để thành dẫn chất phenylthiocarbamyl (PTC) hấp thụ mạnh bức xạ ở bước sóng 254 nm. Tách các dẫn chất PTC của acid amin, đã được tạo trước cột, bằng sắc ký lỏng cao áp pha đảo, dùng cột octadecylsilyl (ODS) và phát hiện ở bước sóng 254 nm.

Việc phân tách các dẫn chất acid amin bằng sắc ký lỏng cao áp pha đảo được thực hiện nhờ việc phối hợp giữa các thay đổi về nồng độ acetonitril và về lực ion trong pha động.

Đối với đa số các dẫn chất PTC-acid amin, giới hạn phát hiện được xác định là 1 picomol. Khoảng tuyến tính là 20 picomol đến 500 picomol với hệ số tương quan r > 0,999. Để có kết quả phân tích tốt, lấy lượng mẫu thử lớn hơn 500 ng để thủy phân.

Chú ý: Sau khi đã loại bỏ trong chân không thuốc thử dư, các dẫn chất PTC-acid amin có thể bảo quản khô và đông băng trong vài tuần lễ mà không có sự phân hủy nào đáng kể. Nếu dung dịch để tiêm vào máy sắc ký được bảo quản lạnh, sau 3 ngày cũng chưa thấy suy giảm đáp ứng sắc ký nào đáng kể xảy ra.

*Kỹ thuật 4: Tạo dẫn chất trước cột với thuốc thử AQC*

Thuốc thử 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamat (AQC) tác dụng với các acid amin tạo thành các dẫn chất urê bất đối xứng, ổn định, phát huỳnh quang (các dẫn chất AQC-acid amin) và được phân tách bằng sắc ký lỏng cao áp pha đảo. Do đó, ta tạo dẫn chất AQC trước cột rồi tách chúng bằng sắc ký lỏng cao áp pha đảo, dùng cột ODS và phát hiện bằng detector huỳnh quang, ở bước sóng kích thích 250 nm và bước sóng phát quang ở 395 nm. Việc phân tách được thực hiện nhờ việc phối hợp sự thay đổi nồng độ acetonitril và thay đổi lực ion của pha động (chương trình dung môi). Tiêm trực tiếp hỗn hợp mẫu thử và thuốc thử vào máy sắc ký. Không có nhiễu đáng kể gây ra bởi 6-aminoquinolin, sản phẩm thứ cấp chủ yếu phát huỳnh quang của thuốc thử. Thuốc thử dư được thủy phân nhanh chóng (nửa đời < 15 s) thành các chất 6-aminoquinolin, N-hydroxysuccinimid và carbon dioxyd và sau 1 min, không còn phản ứng tạo dẫn chất xảy ra.

Diện tích pic của các dẫn chất AQC-acid amin không thay đổi chủ yếu trong thời gian 1 tuần, ở nhiệt độ phòng. Nhờ tính ổn định này, có thể tiến hành phân tích qua đêm trên các máy tự động được.

Giới hạn phát hiện được xác định ở vào khoảng từ 40 femtomol đến 320 femtomol, tính cho mỗi acid amin, trừ cystein. Giới hạn phát hiện của cystein xấp xỉ bằng 800 femtomol. Khoảng tuyến tính là từ 2,5 micromol đến 200 micromol, với hệ số tương quan r > 0,999. Có thể thu được kết quả phân tích tốt với lượng mẫu protein/peptid lấy thử thấp tới 30 ng.

*Kỹ thuật 5: Tạo dẫn chất trước cột với thuốc thử OPA*

Thuốc thử ortho-phthalaldehyd (OPA), khi có mặt một hợp chất thiol (có thể dùng 2-mercaptoethanol hoặc acid 3-mercaptopropionic), sẽ tác dụng với các amin bậc nhất để cho một hợp chất isoindol phát huỳnh quang mạnh. Bản thân thuốc thử OPA không phát huỳnh quang, nên không gây trở ngại. Mặt khác, vì OPA dễ tan và ổn định trong nước đồng thời cho phản ứng nhanh nên có thể tạo dẫn chất và phân tích mẫu thử một cách tự động, dùng thiết bị tự nạp mẫu thử để trộn lẫn mẫu thử với thuốc thử. Tuy nhiên, OPA không cho phản ứng với các amin bậc 2, nên kỹ thuật 5 này không áp dụng được để phân tích các acid amin có hóa chức amin bậc 2 như prolin. Để khắc phục, phải phối hợp kỹ thuật 5 này với kỹ thuật 7 hoặc 8 mô tả sau đây.

Vì dẫn chất OPA-acid amin không bền vững nên sau khi tạo dẫn chất trước cột, phải tiến hành phân tích ngay trên sắc ký lỏng cao áp pha đảo và phát hiện kết quả bằng detector huỳnh quang ở bước sóng kích thích 348 nm và bước sóng phát quang 450 nm.

Giới hạn phát hiện bằng huỳnh quang thấp tới 50 femtomol đã được báo cáo. Tuy nhiên, giới hạn phát hiện thực tế của phép phân tích là 1 picomol.

*Kỹ thuật 6: Tạo dẫn chất trước cột bằng thuốc thử DABS-Cl*

Thuốc thử dimethylamino-azobenzensulfonyl clorid (DABS-Cl) là một thuốc thử cho màu để phát hiện acid amin. Các dẫn chất tạo thành (DABS-acid amin) rất bền vững và hấp thụ cực đại ở bước sóng 436 nm. Tạo các dẫn chất này trước cột rồi tách chúng bằng sắc ký

lỏng cao áp pha đảo, dùng cột ODS và phát hiện kết quả ở bước sóng 436 nm.

Kỹ thuật này có thể phân tích cả các acid amin bậc nhất và acid amin bậc hai (như prolin) với cùng độ nhạy như nhau. Còn có thể định lượng đồng thời thành phần tryptophan có trong mẫu thử protein/peptid sau khi đã thủy phân mẫu thử bằng các acid sulfonic như: acid mercaptoethansulfonic, acid p-toluensulfonic hoặc acid methansulfonic như đã mô tả ở kỹ thuật thủy phân 2 ở trên. Các thành phần khác dễ hỏng vì acid như asparagin và glutamin cũng được phân tích sau khi đã làm phản ứng chuyển đổi thành acid diaminopropionic và acid diaminobutyric tương ứng bằng phản ứng với thuốc thử BTI đã mô tả ở kỹ thuật thủy phân 11 ở trên.

Trong kỹ thuật này, không dùng norleucin nhân tạo để làm chuẩn nội, vì nó được rửa giải ra tại vùng dày đặc các pic của các acid amin bậc nhất trên sắc đồ. Có thể dùng nitrotyrosin làm chuẩn nội vì nó được rửa giải ra tại vùng có ít pic trên sắc đồ.

Giới hạn phát hiện các DABS-acid amin ở khoảng 1 picomol. Lượng nhỏ từ 2 đến 5 picomol của một DABS-acid amin nào đó cũng có thể cho kết quả định lượng đáng tin cậy, và chỉ cần dùng 10 ng đến 30 ng protein thủy phân đã được dẫn chất hóa cho mỗi lần phân tích.

*Kỹ thuật 7: Tạo dẫn chất trước cột với thuốc thử FMOC-Cl*

Thuốc thử 9-fluorenylmethyl cloroformat (FMOC-Cl) tác dụng với acid amin bậc nhất và acid amin bậc hai để tạo thành các dẫn chất FMOC-acid amin phát huỳnh quang mạnh.

Phản ứng xảy ra nhẹ nhàng trong môi trường nước, trong 30 s. Các dẫn chất được tạo thành đều bền vững, chỉ riêng dẫn chất của histidin là có biểu hiện phân hủy nào đó. Mặc dù bản thân thuốc thử và các sản phẩm phụ của phản ứng đều phát huỳnh quang nhưng ta có thể loại chúng mà không làm mất mát các dẫn chất FMOC-acid amin.

Sau khi tạo dẫn chất trước cột, tiến hành tách các FMOC-acid amin bằng sắc ký lỏng cao áp pha đảo, dùng cột ODS, với chương trình gradient dung môi, biến thiên tuyến tính từ hỗn hợp gồm 10 thể tích acetonitril, 40 thể tích methanol và 50 thể tích đệm acid acetic đến hỗn hợp gồm 50 thể tích acetonitril, 50 thể tích đệm acid acetic. Phát hiện kết quả bằng detector huỳnh quang ở bước sóng kích thích 260 nm và bước sóng phát quang 313 nm. Có thể phân tích được 20 dẫn chất acid amin trong vòng 20 min.

Giới hạn phát hiện vào cỡ femtomol. Đa số các acid amin có khoảng tuyến tính từ 0,1 micromol đến 50 micromol.

*Kỹ thuật 8: Tạo dẫn chất trước cột bằng thuốc thử NBD-F*

Thuốc thử 7-fluoro-4-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazol (NBD-F) tác dụng với cả acid amin bậc nhất và acid amin bậc 2, ở nhiệt độ 60 °C, trong 5 min, để cho các dẫn chất NBD-acid amin phát huỳnh quang mạnh. Sau khi tạo dẫn chất trước cột, tách chúng bằng sắc ký lỏng cao áp pha đảo, dùng cột ODS và chương trình gradient dung môi gồm acetonitril và hỗn hợp đệm trong nước. 17 dẫn chất acid amin được tách ra trong vòng 35 min. Có thể dùng acid ε-aminocaproic làm chất chuẩn nội, vì được rửa giải ở vùng ít pic trên sắc đồ. Phát hiện kết quả bằng detector huỳnh quang, ở bước sóng kích thích 480 nm và bước sóng phát quang ở 530 nm.

Kỹ thuật này có độ nhạy gần tương tự như độ nhạy của kỹ thuật tạo dẫn chất trước cột với thuốc thử OPA (kỹ thuật 5) đối với các acid amin, trừ prolin không phân tích được bằng kỹ thuật 5 vì không phản ứng với thuốc thử OPA. Như vậy, kỹ thuật 8 này ích lợi hơn kỹ thuật 5.

Giới hạn phát hiện mỗi acid amin ở khoảng 10 femtomol và lượng mẫu thử protein/peptid thủy phân cần lấy để tạo dẫn chất trước cột ở khoảng 1,5 mg.

**Tính kết quả**

Khi xác định hàm lượng các acid amin trong một mẫu thử protein/peptid, cần nhớ rằng, trong quá trình thủy phân bằng acid, tryptophan và cystein bị phá hủy, serin và threonin bị phá hủy một phần, valin và isoleucin không được tách hoàn toàn, methionin có thể bị oxy hóa và một vài acid amin như glycin và serin thường bị nhiễu. Tiến hành phân tích ở môi trường chân không thích hợp (áp suất thấp hơn 200 µm thủy ngân hoặc 26,7 Pa) hoặc ở môi trường có khí trơ (như argon) khi thủy phân pha hơi, có thể giảm mức phân hủy do bị oxy hóa. Các kết quả định lượng cystein, tryptophan, threonin, isoleucin, valin, methionin, glycin và serin trong một mẫu thử protein/peptid đã thủy phân có thể thay đổi và do đó thường cần tiến hành xem xét đánh giá bổ sung.

***Tính tỷ lệ phần trăm hàm lượng của một loại acid amin có trong mẫu thử protein/peptid***

Đó là số lượng nanomol của một loại acid amin có trong 100 nanomol của toàn thể các acid amin có trong mẫu thử protein/peptid. Tỷ lệ này có ích trong việc đánh giá các dữ liệu thu được khi phân tích các acid amin trong một protein mà ta chưa biết khối lượng phân tử. Nó giúp cùng cố kết quả định tính một protein/peptid chưa biết bằng cách so sánh tỷ lệ phần trăm hàm lượng mỗi loại acid amin trong mẫu thử chưa biết với tỷ lệ phần trăm hàm lượng của mỗi loại acid amin tương ứng có trong các protein/peptid đã biết.

Tính tỷ lệ phần trăm hàm lượng của một acid amin trong protein/peptid theo công thức sau:

$$\frac{100r_i}{r_t}$$

Trong đó:

$r_i$ là đáp ứng (hàm lượng) tính theo nanomol của acid amin i;

$r_t$ là đáp ứng (hàm lượng) tính theo nanomol của tất cả các acid amin thu được trên sắc đồ.

***Mẫu thử protein/peptid chưa biết***

*Xác định khối lượng $Q_i$ (tính theo microgam) của mỗi loại acid amin có mặt trong mẫu protein/peptid chưa biết*

Tính bằng công thức sau:

$$Q_i = \frac{m_i \times M_i}{1000}$$

Trong đó:
$Q_i$ là khối lượng (tính theo microgam) của acid amin i có trong mẫu thử;
$m_i$ là hàm lượng (tính theo nanomol) của tất cả các acid amin i tìm thấy trên sắc đồ;
$M_i$ là phân tử lượng trung bình (tính theo gam) của acid amin i, đã được hiệu chỉnh về khối lượng $H_2O$ bị loại khi tạo thành liên kết peptid.

*Ước lượng tổng khối lượng của mẫu thử protein/peptid:*
Tổng khối lượng $\sum Q_i$ của các loại acid amin tìm thấy cho phép ta ước lượng khối lượng của protein/peptid đem thử sau khi đã hiệu chỉnh về khối lượng mất mát do có sự phân hủy từng phần hoặc toàn phần của một số acid amin dễ bị phân hủy trong quá trình thủy phân.

*Xác định số lượng của mỗi loại acid amin tham gia cấu tạo mẫu thử protein/peptid chưa biết.* Nếu xác định được phân tử lượng $M_p$ của protein/peptid đem thử (ví dụ bằng khối phổ), ta tính số lượng của mỗi loại acid amin i theo công thức sau:

$$\frac{\frac{m_i}{1000Q_p}}{M_p} = \frac{m_i \times M_p}{1000Q_p}$$

Trong đó:
$m_i$ là hàm lượng (tính theo nanomol) của acid amin i tìm thấy trong mẫu thử;
$Q_p$ là khối lượng (tính theo microgam) của protein đem thử;
$M_p$ là phân tử lượng của protein đem thử (tính theo gam).

***Mẫu thử protein/peptid đã biết phân tử lượng và thành phần cấu tạo***

Khi phân tích acid amin, một số acid amin cho kết quả tìm thấy tốt, trái lại, một số cho kết quả tìm thấy không sử dụng được vì hoặc bị phân hủy một phần hay toàn phần (ví dụ: tryptophan, cystein, threonin, serin, methionin), hoặc liên kết peptid không được tách hoàn toàn (như liên kết của isoleucin, của valin), hoặc bị nhiễu bởi một số acid amin tự do (như bởi glycin và serin). Các acid amin cho kết quả tìm thấy tốt điển hình là aspartat-asparagin, glutamat-glutamin, alanin, leucin, phenylalanin, lysin và arginin. Danh sách này có thể thay đổi tùy thuộc vào hệ thống phân tích đã dùng. Các acid amin cho kết quả tìm thấy tốt đại diện cho protein, do đó ta lợi dụng chúng để xác định hàm lượng protein và số lượng của mỗi loại acid amin (còn gọi là thành phần của acid amin) có trong mẫu thử.

*Xác định hàm lượng protein trong mẫu thử*

Chia hàm lượng (tính theo nanomol) của mỗi loại acid amin có giá trị tìm thấy tốt cho số lượng dự đoán của acid amin đó trong protein để có hàm lượng protein tính theo loại acid amin đó. Tính giá trị trung bình của tất cả các hàm lượng protein tính được theo từng loại acid amin có giá trị tìm thấy tốt của mẫu thử. Các hàm lượng protein tính theo từng loại acid amin riêng rẽ phải được phân bố đồng đều xung quanh giá trị trung bình của hàm lượng protein mới tính được ở trên. Phải loại bỏ các giá trị hàm lượng protein riêng rẽ của từng acid amin quá sai lệch với giá trị trung bình đã tính được. Thường các giá trị sai lệch quá 5 % phải loại bỏ. Khi đó, phải tính lại giá trị trung bình của hàm lượng protein mới, dựa trên các giá trị còn lại (không bị loại bỏ) của hàm lượng protein riêng rẽ tính theo từng loại acid amin còn lại.

*Xác định số lượng của từng loại acid amin trong mẫu thử*

Chia hàm lượng của mỗi loại acid amin cho giá trị trung bình của hàm lượng protein đã tính ở trên, ta được số lượng của loại acid amin đó (tức thành phần acid amin) trong mẫu thử.

*Tính sai số tương đối (theo tỷ lệ phần trăm) về thành phần trong mẫu thử*

Áp dụng công thức sau để tính sai số tương đối về thành phần đối với một loại acid amin i:

$$\frac{100m_i}{m_{is}}$$

Trong đó:
$m_i$ là hàm lượng, tính theo nanomol, xác định bằng thực nghiệm, của loại acid amin i có trong mẫu thử;
$m_{is}$ là hàm lượng (tính theo nanomol) đã biết của loại acid amin i có trong mẫu thử.

*Giá trị sai số tương đối trung bình* về thành phần của mẫu thử là giá trị trung bình của tất cả các sai số tương đối về thành phần tính theo từng loại acid amin riêng rẽ, trừ tryptophan và cystein. Giá trị sai số tương đối trung bình về thành phần của một mẫu thử cung cấp thông tin quan trọng về độ ổn định của phép phân tích theo thời gian. Sự phù hợp giữa giá trị thành phần acid amin trong mẫu thử, tìm thấy bằng thực nghiệm với giá trị thành phần acid amin đã biết trước của protein đem thử có thể giúp cho việc củng cố kết quả định tính và xác định độ tinh khiết của protein trong mẫu thử.

## 10.12 XÁC ĐỊNH HÀM LƯỢNG ETHANOL

Sử dụng phương pháp 1 hoặc phương pháp 2 trừ khi có những chỉ dẫn khác trong chuyên luận riêng.

### Phương pháp 1

Tiến hành phương pháp sắc ký khí (Phụ lục 5.2) sử dụng các dung dịch sau:

*Dung dịch 1*: Chứa 5 % (tt/tt) *ethanol (TT)* và 5 % (tt/tt) *propan-1-ol (TT)* (chuẩn nội).

*Dung dịch 2*: Hòa loãng một thể tích chế phẩm thử bằng *nước* để được dung dịch có nồng độ ethanol từ 4,0 % đến 6,0 % (tt/tt).

*Dung dịch 3*: Chuẩn bị như dung dịch 2 nhưng thêm vừa đủ chất chuẩn nội để tạo ra nồng độ cuối cùng của chuẩn nội trong dung dịch này là 5,0 % (tt/tt).

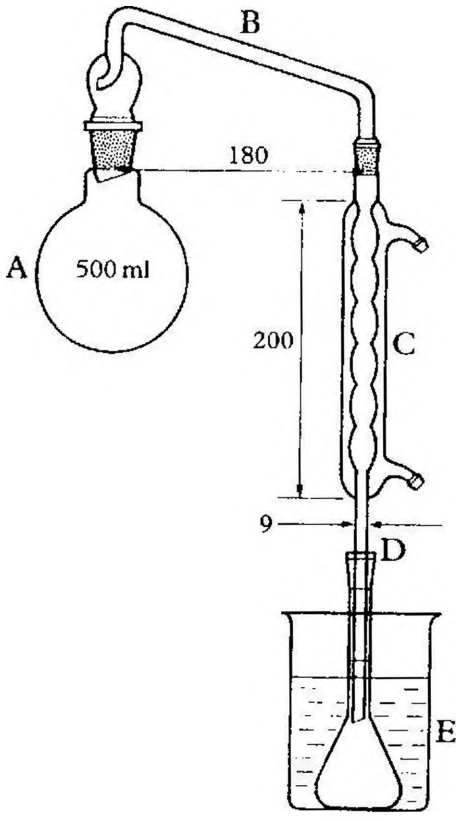
Quá trình sắc ký có thể thực hiện bằng cách dùng cột (1,5 m × 4 mm) đã nhồi hạt xốp polymer (100 mesh đến 120 mesh) (Porapak Q hoặc Chromosorb 101 đều thích

hợp) với nhiệt độ lò cột đặt ở 150 °C, nhiệt độ buồng tiêm và detector ở 170 °C.
Tính hàm lượng phần trăm ethanol căn cứ vào các diện tích pic ethanol trong sắc ký đồ thu được từ dung dịch 1 và dung dịch 3.

**Phương pháp 2**
Với những chế phẩm thử mà trong đó theo quy định của chuyên luận riêng đã sử dụng cồn công nghiệp, xác định hàm lượng ethanol giống như phương pháp 1 nhưng chuẩn bị dung dịch 2 bằng cách hòa loãng một thể tích chế phẩm thử với nước để tạo một dung dịch có nồng độ tổng cộng của methanol và ethanol từ 4,0 % đến 6,0 % (tt/tt).
Xác định hàm lượng methanol bằng cách thực hiện quá trình sắc ký như đã mô tả ở phương pháp 1 nhưng chuẩn bị các dung dịch như sau:
*Dung dịch 1*: Chứa 0,25 % (tt/tt) *methanol (T)* và 0,25 % (tt/tt) *propan-1-ol (TT)*.
*Dung dịch 2*: Hòa loãng một thể tích chế phẩm thử bằng *nước* để được dung dịch có nồng độ methanol từ 0,2 % đến 0,3 % (tt/tt).
*Dung dịch 3*: Chuẩn bị như dung dịch 2 nhưng thêm vừa đủ chất chuẩn nội để có nồng độ cuối cùng của chuẩn nội trong dung dịch này là 0,25 %.
Tổng lượng ethanol và methanol phải ở trong giới hạn quy định của chuyên luận riêng và tỷ số giữa lượng methanol và lượng ethanol tìm được phải tương ứng với tỷ lệ này của cồn công nghiệp đã sử dụng.

**Phương pháp 3**
Phương pháp này chỉ dùng để khảo sát những chế phẩm thuốc dạng lỏng, chắc chắn chứa ethanol đồng thời với các chất tan khác, nhưng các chất này phải được tách khỏi ethanol khi cất.
Khi cất nếu trong mẫu thử, ngoài ethanol và nước, còn có lẫn các chất bay hơi khác thì các hướng dẫn thích hợp sẽ được quy định trong chuyên luận riêng.
Hàm lượng ethanol chứa trong một chất lỏng được biểu thị bằng số thể tích ethanol trong 100 thể tích chất lỏng ấy ở 20 °C ± 0,1 °C và được hiểu là phần trăm ethanol tính theo thể tích/thể tích.
Hàm lượng cũng có thể được biểu thị bằng gam ethanol cho 100 g chất lỏng và được hiểu là phần trăm ethanol tính theo khối lượng/khối lượng.
Liên quan giữa tỷ trọng ở 20 °C ± 0,1 °C, tỷ trọng tương đối (đã hiệu chỉnh ở chân không) và hàm lượng ethanol của hỗn hợp nước và ethanol được ghi trong Bảng của Tổ chức Quốc tế về Đo lường hợp pháp (1972) * Khuyến cáo Quốc tế số 22**.
[*International Organisation for Legal Metrology (1972).
** International Recommendation (No 22)].

**Thiết bị**
Thiết bị (Hình 10.12) bao gồm một bình cầu thủy tinh đáy tròn (A) gắn với một đầu cất có bộ phận bẫy hơi (B), bộ phận này được nối với một ống sinh hàn (C) đặt thẳng đứng. Tiếp theo là một ống dẫn gắn vào phần thấp của ống sinh hàn để dẫn dịch cất vào bình hứng (D). Bình hứng có vạch định mức dung tích 100 ml hoặc 250 ml. Trong suốt quá trình cất, bình hứng này được nhúng trong cốc (E) chứa hỗn hợp đá và nước đá. Ngoài ra còn có thêm một đĩa có khoét thủng một lỗ tròn đường kính khoảng 6 cm đặt dưới bình cất để bảo hiểm.




*Hình 10.12* - Dụng cụ để xác định hàm lượng ethanol
*(Kích thước tính bằng milimét)*

**Xác định bằng lọ đo tỷ trọng (Pycnomet)**
Đong chính xác 25 ml chế phẩm ở 20 °C ± 0,1 °C chuyển vào bình cất. Pha loãng với 100 ml đến 150 ml *nước cất* và thêm vài hạt đá bọt. Lắp hệ thống chưng cất. Chưng cất và hứng không dưới 90 ml dịch cất vào bình định mức 100 ml. Điều chỉnh nhiệt độ dịch cất tới 20 °C ± 0,1°C, pha loãng đến 100 ml bằng *nước cất* ở 20 °C ± 0,1 °C. Xác định tỷ trọng tương đối ở 20 °C ± 0,1 °C bằng lọ đo tỷ trọng (Phụ lục 6.5).
Hàm lượng ethanol tính bằng phần trăm theo thể tích bằng 4 lần trị số chỉ ra trong cột 3 ở Bảng 10.12. (Liên quan giữa tỷ trọng, tỷ trọng tương đối và hàm lượng ethanol trong dung dịch). Biểu thị kết quả với một chữ số ở phần thập phân.

**Xác định bằng tỷ trọng kế** (Phụ lục 6.5)
Đong chính xác 50 ml chế phẩm ở 20 °C ± 0,1 °C chuyển vào bình cất. Pha loãng với 200 ml đến 250 ml *nước cất* và thêm vài hạt đá bọt. Lắp hệ thống chưng cất. Chưng cất

và hứng không dưới 180 ml dịch cất vào bình định mức 250 ml. Điều chỉnh nhiệt độ dịch cất tới 20 °C ± 0,1 °C; pha loãng đến 250 ml bằng *nước cất* ở 20 °C ± 0,1 °C. Chuyển dịch cất vào một ống đong hình trụ có đường kính lớn hơn đường kính bầu của tỷ trọng kế ít nhất 6 mm. Nếu thể tích dịch cất không đủ, tăng lượng mẫu gấp đôi và pha loãng dịch cất đến 500 ml bằng *nước cất* ở 20 °C ± 0,1 °C. Hàm lượng ethanol tính bằng phần trăm theo thể tích bằng 5 lần trị số chỉ ra trong cột 3 ở Bảng 10.12 (Liên quan giữa tỷ trọng, tỷ trọng tương đối và hàm lượng ethanol trong dung dịch). Biểu thị kết quả ở dạng có một chữ số ở phần thập phân.

*Bảng 10.12* - Liên quan giữa tỷ trọng, tỷ trọng tương đối và hàm lượng ethanol

| $\rho_{20}$ (kg·m$^{-3}$) | Tỷ trọng tương đối của dịch cất đo trong không khí ở 20 °C ($d_{20}^{20}$) | Hàm lượng ethanol tính theo % (tt/tt) ở 20 °C | $\rho_{20}$ (kg·m$^{-3}$) | Tỷ trọng tương đối của dịch cất đo trong không khí ở 20 °C ($d_{20}^{20}$) | Hàm lượng ethanol tính theo % (tt/tt) ở 20 °C |
|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 2 | 3 | 1 | 2 | 3 |
| 968,0 | 0,9697 | 25,09 | 983,5 | 0,9853 | 11,02 |
| 968,5 | 0,9702 | 24,64 | 984,0 | 0,9858 | 10,60 |
| 969,0 | 0,9707 | 24,19 | 984,5 | 0,9863 | 10,18 |
| 969,5 | 0,9712 | 23,74 | 985,0 | 0,9868 | 9,76 |
| 970,0 | 0,9717 | 23,29 | 985,5 | 0,9873 | 9,35 |
| 970,5 | 0,9722 | 22,83 | 986,0 | 0,9878 | 8,94 |
| 971,0 | 0,9727 | 22,37 | 986,5 | 0,9883 | 8,53 |
| 971,5 | 0,9733 | 21,91 | 987,0 | 0,9888 | 8,13 |
| 972,0 | 0,9738 | 21,45 | 987,5 | 0,9893 | 7,73 |
| 972,5 | 0,9743 | 20,98 | 988,0 | 0,9898 | 7,34 |
| 973,0 | 0,9748 | 20,52 | 988,5 | 0,9903 | 6,95 |
| 973,5 | 0,9753 | 20,05 | 989,0 | 0,9908 | 6,56 |
| 974,0 | 0,9758 | 19,59 | 989,5 | 0,9913 | 6,17 |
| 974,5 | 0,9763 | 19,12 | 990,0 | 0,9918 | 5,79 |
| 975,0 | 0,9768 | 18,66 | 990,5 | 0,9923 | 5,42 |
| 975,5 | 0,9773 | 18,19 | 991,0 | 0,9928 | 5,04 |
| 976,0 | 0,9778 | 17,73 | 991,5 | 0,9933 | 4,67 |
| 976,5 | 0,9783 | 17,25 | 992,0 | 0,9938 | 4,30 |
| 977,0 | 0,9788 | 16,80 | 992,5 | 0,9943 | 3,94 |
| 977,5 | 0,9793 | 16,34 | 993,0 | 0,9948 | 3,58 |
| 978,0 | 0,9798 | 15,88 | 993,5 | 0,9953 | 3,22 |
| 978,5 | 0,9803 | 15,43 | 994,0 | 0,9958 | 2,86 |
| 979,0 | 0,9808 | 14,97 | 994,5 | 0,9963 | 2,51 |
| 979,5 | 0,9813 | 14,52 | 995,0 | 0,9968 | 2,16 |
| 980,0 | 0,9818 | 14,07 | 995,5 | 0,9973 | 1,82 |
| 980,5 | 0,9823 | 13,63 | 996,0 | 0,9978 | 1,47 |
| 981,0 | 0,9828 | 13,18 | 996,5 | 0,9983 | 1,13 |
| 981,5 | 0,9833 | 12,74 | 997,0 | 0,9988 | 0,80 |
| 982,0 | 0,9838 | 12,31 | 997,5 | 0,9993 | 0,46 |
| 982,5 | 0,9843 | 11,87 | 998,0 | 0,9998 | 0,13 |
| 983,0 | 0,9848 | 11,44 | | | |

## 10.13 XÁC ĐỊNH HÀM LƯỢNG METHANOL VÀ PROPAN-2-OL

### Phương pháp

Tiến hành phương pháp sắc ký khí (Phụ lục 5.2), sử dụng các dung dịch sau:

*Dung dịch chuẩn nội:* Chuẩn bị một dung dịch chứa *propan -1-ol (TT)* 2,5 %.

*Dung dịch thử:* Thêm 2,0 ml dung dịch chuẩn nội vào bình định mức dung tích 50 ml có chứa dịch cất mẫu thử (dịch cất thu được từ phương pháp 3, chuyên luận xác định hàm lượng ethanol, Phụ lục 10.12), điều chỉnh hàm lượng ethanol tới 10 % (tt/tt) bằng cách pha loãng với *nước* hoặc với *ethanol 90 % (TT)* vừa đủ để đạt tới 50 ml dung dịch thử, tùy theo hàm lượng ethanol trong dịch cất cao hay thấp hơn 10,0 % (tt/tt).

*Dung dịch đối chiếu:* Chuẩn bị 50 ml dung dịch chứa 2,0 ml dung dịch chuẩn nội, 10 % (tt/tt) *ethanol (TT)*, 0,05 % (tt/tt) *propan-2-ol (TT)* và một lượng *methanol khan (TT)* vừa đủ để có nồng độ tổng cộng của methanol trong dung dịch này là 0,05 % (tt/tt) kể cả lượng methanol chứa trong *ethanol (TT)*.

### Quá trình sắc ký

Có thể thực hiện bằng cách sử dụng cột thủy tinh đã nhồi hạt xốp copolymer ethylvinylbenzen divinylbenzen (125 µm đến 150 µm) với nhiệt độ cột đặt và duy trì ở 130 °C, buồng tiêm ở 200 °C, detector 220 °C. Tiêm 1 µl mỗi dung dịch trên. Từ các sắc ký đồ thu được, tính hàm lượng methanol và propan-2-ol có trong sản phẩm gốc.

### Độ nhạy của phương pháp

Với phương pháp này có thể phát hiện được hàm lượng methanol và propan-2-ol thấp hơn 0,025 % (tt/tt).

## 10.14 XÁC ĐỊNH DUNG MÔI TỒN DƯ

Quy trình mô tả trong phụ lục này được áp dụng để xác định dung môi tồn dư trong các trường hợp:

1. Định tính dung môi nhóm 1 và dung môi nhóm 2 tồn dư trong dược chất, tá dược, hay dược phẩm;
2. Thử giới hạn dung môi nhóm 1 và dung môi nhóm 2 khi chúng tồn tại trong dược chất, tá dược, hay dược phẩm;
3. Định lượng dung môi nhóm 2 khi lượng tồn dư lớn hơn 1000 phần triệu (0,1 %) hoặc định lượng dung môi nhóm 3 tồn dư khi có yêu cầu.

Các dung môi tồn dư nhóm 1, nhóm 2, nhóm 3 được liệt kê tại các bảng trong Phụ lục 10.14.1 Quy định đối với tạp chất là dung môi tồn dư.

Chuyên luận này giới thiệu 3 cách pha mẫu thử và các điều kiện kỹ thuật tiêm pha hơi các mẫu thử hóa hơi lên hệ thống sắc ký khí. Sử dụng hai hệ sắc ký, hệ sắc ký A thường được chọn trước, còn hệ sắc ký B thường được dùng để củng cố kết quả phát hiện. Việc chọn cách pha mẫu thử tùy thuộc vào độ tan của mẫu thử. Trong một số ít trường hợp cách pha mẫu tùy thuộc dung môi tồn dư cần kiểm tra.

Các dung môi tồn dư sau đây không dễ dàng phát hiện được bằng các điều kiện tiêm pha hơi ghi trong chuyên luận này: formamid, 2-ethoxyethanol, 2-methoxyethanol, ethylen glycol, N-methylpyrrolidon và sulfolan. Phải áp dụng các qui trình khác thích hợp để kiểm tra sự tồn dư của các dung môi trên.

Khi dùng qui trình của chuyên luận này để định lượng các dung môi tồn dư, phải tiến hành thẩm định qui trình.

### Tiến hành

Thực nghiệm bằng phương pháp sắc ký khí (Phụ lục 5.2) với kỹ thuật tiêm pha hơi tĩnh (static head-space injection).

### Pha mẫu thử

Cách 1: Dùng để kiểm tra dung môi tồn dư trong các chất tan trong nước.

*Dung dịch mẫu thử (1):* Hòa tan 0,200 g mẫu thử trong *nước*, pha loãng với *nước* tới 20,0 ml.

Cách 2: Dùng để kiểm tra dung môi tồn dư trong các chất không tan trong nước.

*Dung dịch mẫu thử (2):* Hòa tan 0,200 g mẫu thử trong *N,N-dimethylformamid (DMF) (TT)*, pha loãng tới 20,0 ml với cùng dung môi.

Cách 3: Dùng để kiểm tra N,N-dimethylacetamid và/hoặc N,N-dimethylformamid khi biết rõ hoặc nghi ngờ có một hoặc cả hai dung môi này tồn dư trong mẫu thử.

*Dung dịch mẫu thử (3):* Hòa tan 0,200 g mẫu thử trong *1,3-dimethyl-2-imidazolidinon (DMI)* và pha loãng đến 20,0 ml với cùng dung môi.

Khi không có cách pha mẫu nào nêu trên phù hợp với mẫu thử, thì cách pha mẫu thử và điều kiện tiêm pha hơi tĩnh áp dụng phải được chứng minh là phù hợp.

*Dung dịch dung môi (a):* Hòa tan 1,0 ml *dung dịch dung môi tồn dư nhóm 1 chuẩn* với 9 ml *dimethyl sulfoxid (TT)* và pha loãng với *nước* thành 100 ml. Pha loãng 1,0 ml dung dịch này với *nước* thành 10,0 ml.

*Dung dịch dung môi (b):* Hòa tan một lượng thích hợp dung môi tồn dư nhóm 2 trong *dimethyl sulfoxid (TT)*. Pha loãng với *nước* thành 100,0 ml. Tiếp tục pha loãng để thu được dung dịch có nồng độ bằng 1/20 giới hạn quy định tại Bảng 10.14.1-2 trong Phụ lục 10.14.1 Quy định đối với tạp chất là dung môi tồn dư.

*Dung dịch dung môi (c):* Hòa tan 1,00 g dung môi hoặc các dung môi có trong mẫu thử với *dimethyl sulfoxid (TT)* hoặc *nước* (nếu thích hợp), và pha loãng với *nước* thành 100,0 ml. Tiếp tục pha loãng để thu được dung dịch có nồng độ bằng 1/20 giới hạn quy định tại Bảng 10.14.1-1 hoặc Bảng 10.14.1-2. trong Phụ lục 10.14.1 Qui định đối với tạp chất là dung môi tồn dư.

*Dung dịch mẫu trắng:* Chuẩn bị như cách pha dung dịch dung môi (c) nhưng không thêm dung môi cần xác định (để kiểm tra sự vắng mặt của các pic nhiễu).

*Dung dịch thử:* Lấy 5,0 ml dung dịch mẫu thử và 1,0 ml dung dịch mẫu trắng cho vào một lọ đựng mẫu tiêm.

*Dung dịch đối chiếu (a)* (nhóm 1): Lấy 1,0 ml dung dịch dung môi (a) và 5,0 ml chất pha loãng thích hợp vào một lọ đựng mẫu tiêm.

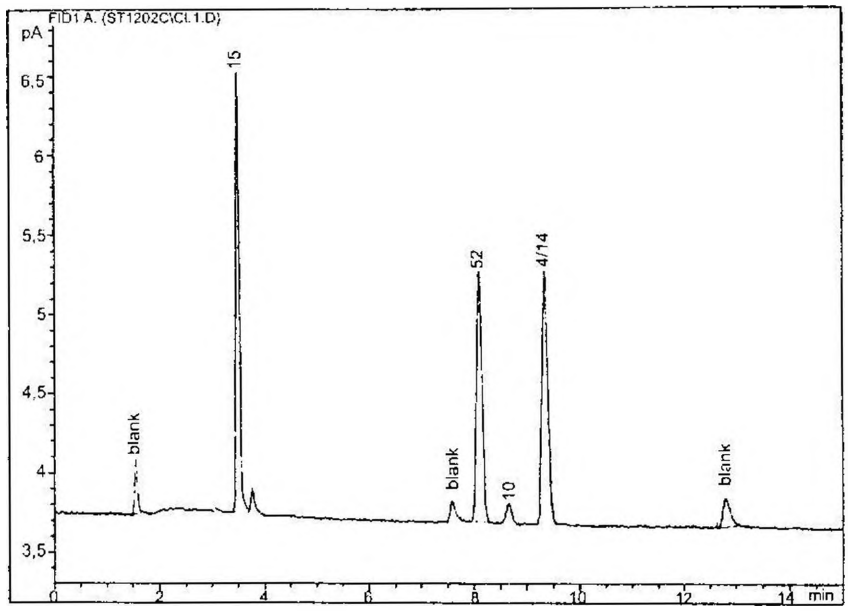
*Dung dịch đối chiếu ($a_1$)* (nhóm 1): Lấy 1,0 ml dung dịch dung môi (a) và 5,0 ml dung dịch mẫu thử vào một lọ đựng mẫu tiêm.
*Dung dịch đối chiếu (b)* (nhóm 2): Lấy 1,0 ml dung dịch dung môi (b) và 5,0 ml chất pha loãng thích hợp vào một lọ đựng mẫu tiêm.
*Dung dịch đối chiếu (c)*: Lấy 1,0 ml dung dịch dung môi (c) và 5,0 ml dung dịch mẫu thử vào một lọ đựng mẫu tiêm.
*Dung dịch đối chiếu (d)*: Lấy 1,0 ml dung dịch mẫu trắng và 5,0 ml chất pha loãng thích hợp vào một lọ đựng mẫu tiêm.
Đóng kín các lọ đựng mẫu tiêm nói trên bằng nút cao su có bao lớp polytetrafluoroethylen và giữ bởi một vòng chụp ngoài bằng nhôm. Lắc mạnh để có một dung dịch đồng nhất.
*Các điều kiện tiêm pha hơi tĩnh có thể dùng:*

| Thông số hoạt động | Cách pha mẫu | | |
|---|---|---|---|
| | 1 | 2 | 3 |
| Nhiệt độ cân bằng (°C) | 80 | 105 | 80 |
| Thời gian cân bằng (min) | 60 | 45 | 45 |
| Nhiệt độ dòng chảy (°C) | 85 | 110 | 105 |
| Khí mang | Nitrogen hoặc heli dùng cho sắc ký khí ở áp suất thích hợp | | |
| Thời gian điều áp (s) | 30 | 30 | 30 |
| Thể tích tiêm (ml) | 1 | 1 | 1 |

**Điều kiện sắc ký**
*Hệ sắc ký A*
Cột mao quản thủy tinh hoặc cột có nòng rỗng, dài 30 m, đường kính trong 0,32 mm hoặc 0,53 mm được phủ bằng lớp các polymer liên kết mạng gồm polydimethylsiloxan 94 % và polycyanopropylphenylsiloxan 6 % (dày 1,8 µm hoặc 3,0 µm).
Khí mang: *Nitrogen dùng cho sắc ký khí* hoặc *heli dùng cho sắc ký khí*, tỷ lệ chia dòng 1 : 5, tốc độ dòng khoảng 35 cm/s.
Detector ion hóa ngọn lửa [có thể dùng detector khối phổ hoặc để phát hiện dung môi tồn dư nhóm 1 ở dạng hợp chất clor hóa có thể dùng detector thu (bắt) điện tử].
Duy trì nhiệt độ cột ở 40 °C, trong 20 min, sau đó gia tăng nhiệt độ với tốc độ 10 °C/min cho đến khi đạt 240 °C, giữ ở 240 °C trong 20 min. Nhiệt độ buồng tiêm 140 °C, nhiệt độ detector 250 °C.
*Hệ sắc ký B*
Cột mao quản thủy tinh hoặc cột có nòng rỗng, dài 30 m có đường kính trong 0,32 mm hoặc 0,53 mm, được phủ macrogol 20 000 dày 0,25 µm.
Khí mang: *Nitrogen dùng cho sắc ký khí* hoặc *heli dùng cho sắc ký khí*, tỷ lệ chia dòng 1 : 5, tốc độ dòng khoảng 35 cm/s.
Detector ion hóa ngọn lửa [có thể dùng detector khối phổ hoặc để phát hiện dung môi tồn dư nhóm 1 ở dạng hợp chất clorid có thể dùng detector thu (bắt) điện tử].
Duy trì nhiệt độ cột ở 50 °C trong 20 min, sau đó gia tăng nhiệt độ với tốc độ 6 °C/min cho đến khi đạt 165 °C. Giữ ở 165 °C trong 20 min. Nhiệt độ buồng tiêm ở 140 °C, nhiệt độ detector ở 250 °C.
*Phân tích trên hệ A*
Tiêm 1 ml pha hơi của dung dịch đối chiếu (a), ghi sắc ký đồ ở các điều kiện sao cho có thể xác định được tỷ lệ tín hiệu/nhiễu của 1,1,1-tricloroethan. Tỷ lệ tín hiệu/nhiễu của 1,1,1-tricloroethan không được nhỏ hơn 5; xem sắc ký đồ tại Hình 10.14-1.
Tiêm 1 ml pha hơi của dung dịch đối chiếu ($a_1$). Pic của các dung môi nhóm 1 thường được phát hiện.
Tiêm 1 ml pha hơi của dung dịch đối chiếu (b), ghi sắc ký đồ ở các điều kiện sao cho hệ số phân giải giữa acetonitril và methylen clorid có thể xác định được. Hệ sắc ký A sẽ thích hợp nếu hệ số phân giải giữa acetonitril và methylen clorid không nhỏ hơn 1,0 và sắc ký đồ có dạng như Hình 10.14-2.
Tiêm 1 ml pha hơi của dung dịch thử lên cột phân tích của hệ A. Nếu sắc ký đồ thu được không có pic nào tương ứng với một trong các pic của những dung môi tồn dư trong sắc ký đồ cho bởi các dung dịch đối chiếu (a) và (b) thì mẫu thử đạt yêu cầu. Nếu sắc ký đồ của mẫu thử có pic tương ứng với pic của một trong những dung môi tồn dư trong sắc ký đồ cho bởi các dung dịch đối chiếu (a) và (b), thì phải tiếp tục phân tích trên hệ B.
*Phân tích trên hệ B*
Tiêm 1 ml pha hơi của dung dịch đối chiếu (a) ghi sắc ký đồ ở các điều kiện sao cho có thể xác định được tỷ lệ tín hiệu/nhiễu của benzen. Tỷ lệ tín hiệu/nhiễu của benzen không được nhỏ hơn 5. Xem sắc ký đồ tại Hình 10.14-3.
Tiêm 1 ml pha hơi của dung dịch đối chiếu ($a_1$). Pic của các dung môi nhóm 1 thường được phát hiện.
Tiêm 1 ml pha hơi của dung dịch đối chiếu (b), ghi sắc ký đồ ở các điều kiện sao cho hệ số phân giải giữa acetonitril và tricloroethylen có thể xác định được. Hệ sắc ký B sẽ thích hợp nếu hệ số phân giải giữa acetonitril và tricloroethylen không nhỏ hơn 1,0 và sắc ký đồ có dạng như Hình 10.14-4.
Tiêm 1 ml pha hơi của dung dịch thử. Nếu sắc ký đồ thu được không có pic nào tương ứng với một trong các pic của dung môi tồn dư trong sắc ký đồ cho bởi các dung dịch đối chiếu (a) và (b) thì mẫu thử đạt yêu cầu. Nếu sắc ký đồ của mẫu thử có pic tương ứng với một trong những pic của dung môi tồn dư trong sắc ký đồ cho bởi các dung dịch đối chiếu (a) và (b) và phù hợp với kết quả phân tích trên hệ A thì tiến hành như sau:
Tiêm 1 ml pha hơi của dung dịch đối chiếu (c) lên cột phân tích của hệ A hoặc B. Điều chỉnh độ nhạy của hệ thống sao cho chiều cao của pic dung môi tồn dư (hay của các dung môi tồn dư) không dưới 50 % của thang đo.
Tiêm 1 ml pha hơi của dung dịch đối chiếu (d) lên cột. Phải không có pic nhiễu nào được phát hiện. Tiêm 1,0 ml pha hơi của dung dịch thử và 1,0 ml pha hơi của dung dịch đối chiếu (c) lên cột. Tiêm lặp lại 2 lần nữa.
Diện tích pic trung bình của dung môi tồn dư trong sắc ký đồ cho bởi dung dịch thử không được lớn hơn một nửa (1/2) diện tích trung bình của pic tương ứng trong sắc ký

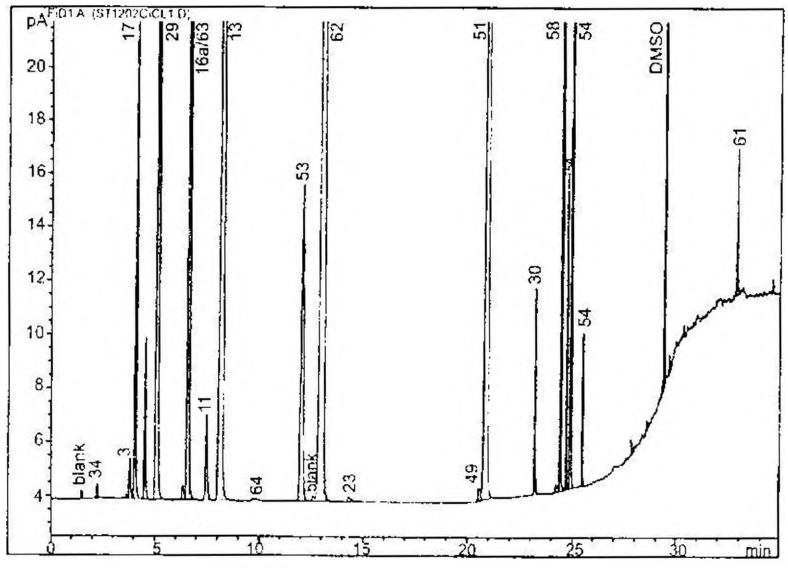
đồ cho bởi dung dịch đối chiếu (c). Thử nghiệm chỉ có giá trị nếu độ lệch chuẩn tương đối của các hiệu số giữa ba cặp diện tích pic của chất phân tích thu được từ dung dịch đối chiếu (a) và dung dịch thử nhỏ hơn 15 %.

Khi hàm lượng dung môi tồn dư thuộc nhóm 2 hoặc nhóm 3 ở mức 0,1 % hoặc lớn hơn thì có thể tiến hành định lượng bằng phương pháp thêm chuẩn.



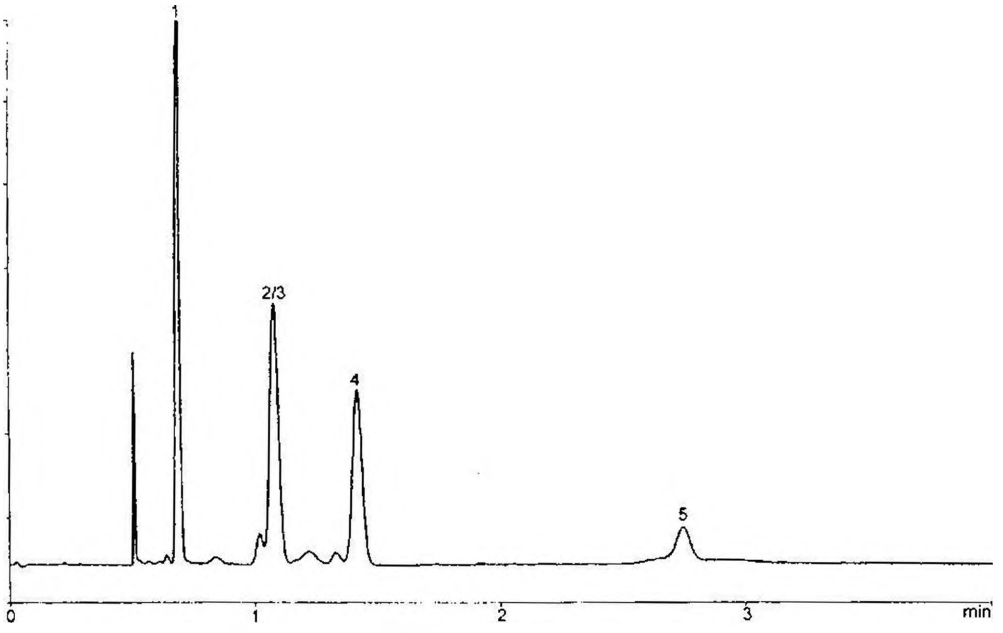

4. benzen
10. carbon tetrachlorid
14. 1,2-dicloroethan
15. 1,1-dicloroethylen
52. 1,1,1-tricloroethan

*Hình 10.14-1* - Sắc ký đồ các dung môi nhóm 1 phân tích trên hệ thống A theo qui trình 1. Detector ion hóa ngọn lửa



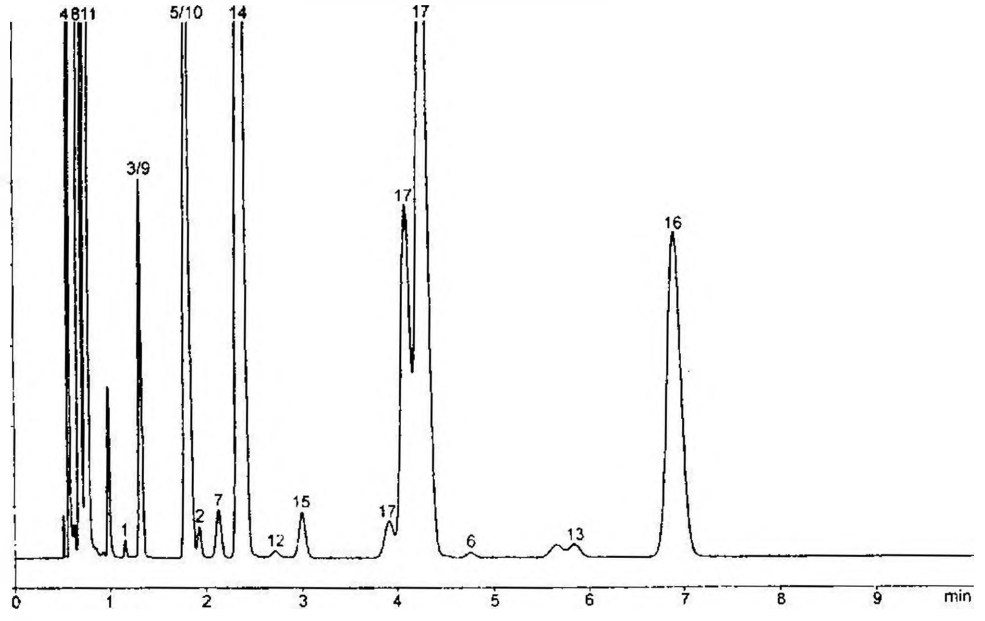

3. acetonitril
11. cloroform
13. cyclohexan
30. 2-hexanon
16a. *cis*-1.2- dicloroethylen
17. diclorometan
23. 1,4-dioxan
29. hexan
54. xylen (ortho, meta, para)
34. methanol
49. pyridin
51. toluen
53. 1,1,2-tricloroethylen
64. 1,2-dimethoxyethan
58. clorobenzen
61. tetralin
62. methylcyclohexan
63. nitromethan

*Hình 10.14-2* - Sắc ký đồ các dung môi nhóm 2 phân tích trên hệ thống A theo qui trình 1. Detector ion hóa ngọn lửa



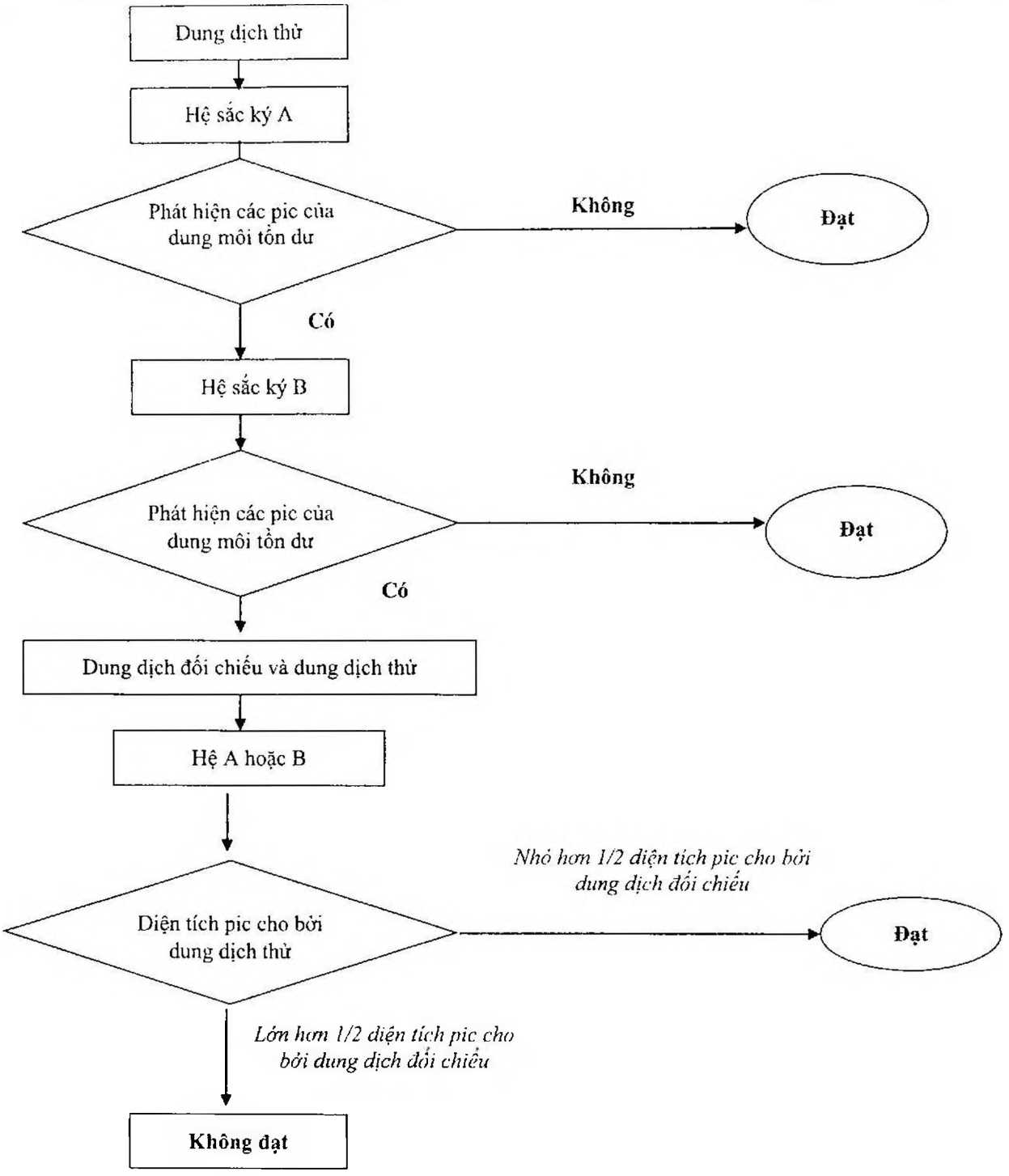

1. 1,1-dicloroethen
2. 1,1,1-tricloroethan
3. carbon tetraclorid
4. benzen
5. 1,2-dicloroethan

*Hình 10.14-3* - Sắc ký đồ các dung môi nhóm 1 phân tích trên hệ thống B theo qui trình 1. Detector ion hóa ngọn lửa




1. methanol
2. acetonitril
3. dicloromethan
4. hexan
5. *cis*-1,2-dichloroethen
6. nitromethan
7. cloroform
8. cyclohexan
9. 1,2-dimethoxyethan
10. 1,1,2-tricloroethen
11. methylcyclohexan
12. 1,4-dioxan
13. pyridin
14. toluen
15. 2-hexanon
16. clorobenzen
17. xylen (ortho, meta, para)
18. tetralin ($t_r$ – 28 min).

*Hình 10.14-4* - Sắc ký đồ các dung môi nhóm 2, phân tích trên hệ thống B theo qui trình 1. Detector ion hóa ngọn lửa




*Hình 10.14-5* - Sơ đồ các bước tiến hành định tính và thử giới hạn các dung môi tồn dư

### 10.14.1 Quy định đối với tạp chất là dung môi tồn dư

(Theo tài liệu CPMP/ICH/283/95)

**1. Mở đầu**

Mục tiêu của Quy định này là đề ra lượng dung môi cho phép tồn dư trong dược phẩm, nhằm bảo đảm sự an toàn của người bệnh. Quy định khuyến cáo dùng các dung môi ít độc và đưa ra những giới hạn độc tính có thể chấp nhận được đối với một số dung môi.

Dung môi tồn dư trong dược phẩm là các chất hữu cơ bay hơi, được sử dụng hoặc sinh ra trong quá trình sản xuất các dược chất, tá dược hoặc trong quá trình bào chế các dược phẩm. Các dung môi này không loại bỏ được hoàn toàn trong quá trình sản xuất. Sự chọn lọc dung môi thích hợp dùng trong tổng hợp các dược chất có thể nâng cao sản lượng hoặc quyết định các đặc tính như dạng tinh thể, độ tinh khiết, tính hòa tan của sản phẩm. Vì vậy, đôi khi dung môi là một yếu tố quyết định trong quy trình tổng hợp. Quy định này không đề cập đến các dung môi dùng có cân nhắc kỹ lưỡng như một chất phụ gia, hoặc đến các solvat. Tuy nhiên hàm lượng dung môi trong các sản phẩm loại này phải được xác định và chứng minh hợp lý.

Vì các dung môi tồn dư không có tác dụng điều trị, các dung môi này phải được loại bỏ đến mức tối đa để đạt được các yêu cầu kỹ thuật của sản phẩm, việc thực hành tốt sản xuất (GMP) hoặc các yêu cầu chất lượng khác. Dược phẩm phải chứa một mức dung môi tồn dư không được cao hơn các dữ liệu an toàn. Phải tránh dùng một số dung môi có độc tính không thể chấp nhận được (dung môi Nhóm 1, Bảng 10.14.1-1), trừ khi lợi ích của việc sử dụng chúng được xác định chắc chắn. Một số dung môi có độc tính ít nguy hiểm hơn (dung môi Nhóm 2, Bảng 10.14.1-2) cũng cần phải dùng hạn chế, để bảo vệ người bệnh khỏi tác dụng độc hại. Tốt nhất phải dùng các dung môi ít độc (dung môi Nhóm 3, Bảng 10.14.1-3).

**2. Phạm vi áp dụng**

Các dung môi tồn dư trong dược chất, tá dược và dược phẩm thuộc phạm vi áp dụng của quy định này. Vì thế phải thực hiện phép thử tìm các dung môi tồn dư trong quá trình sản xuất hay tinh chế để kiểm soát sự hiện diện của chúng. Chỉ cần kiểm tra đối với các dung môi đã được sử dụng hay được sản sinh ra trong quá trình sản xuất hoặc tinh chế các dược chất, tá dược hoặc dược phẩm đó. Mặc dù các nhà sản xuất có thể chọn phương pháp xác định hàm lượng dung môi tồn dư trong sản phẩm, ta vẫn có thể tính hàm lượng đó, đi từ hàm lượng dung môi tồn dư trong các thành phần dùng để sản xuất ra sản phẩm đó. Nếu kết quả tính toán bằng hoặc thấp hơn giới hạn cho phép đã được khuyến cáo trong bản quy định này, thì không cần tiến hành thí nghiệm trên sản phẩm. Trái lại, nếu kết quả tính được vượt mức giới hạn cho phép, dược phẩm phải được thử nghiệm để biết chắc chắn lượng tồn dư dung môi đó có nằm trong phạm vi cho phép không. Sản phẩm cũng phải được thử nghiệm nếu có dùng dung môi trong quá trình sản xuất.

Quy trình này không áp dụng cho dược chất, tá dược hoặc sản phẩm mới đang trong quá trình nghiên cứu áp dụng lâm sàng và cũng không áp dụng cho các dược phẩm đang được lưu hành trên thị trường.

Quy định này áp dụng cho mọi dạng bào chế và mọi cách dùng thuốc. Trong một vài trường hợp, có thể cho phép giới hạn dung môi tồn dư cao hơn như khi dùng trong thời gian ngắn (30 ngày hay ít hơn), hoặc khi dùng dạng thuốc đắp. Việc chứng minh sự đúng đắn của giới hạn cao này phải dựa trên cơ sở của từng trường hợp một.

Xem Chú thích 2 (ở bên dưới) để biết thêm thông tin cơ bản có liên quan tới các dung môi tồn dư.

**3. Các nguyên tắc cơ bản**

***Phân loại dung môi tồn dư theo mức độ nguy hiểm***

Thuật ngữ "liều có thể dung nạp được cho mỗi ngày" (*tolerable daily intake, TDI*) được Chương trình quốc tế về an toàn hóa chất (IPCS) sử dụng và thuật ngữ "liều có thể dùng mỗi ngày" (*acceptable daily intake ADI*) được Tổ chức Y tế Thế giới, các Viện và các cơ quan quản lý sức khỏe quốc gia và quốc tế khác sử dụng để chỉ giới hạn hàm lượng các hóa chất độc có thể dùng mỗi ngày.

Thuật ngữ mới "liều phơi nhiễm được phép mỗi ngày" (*permitted daily exposure, PDE*) được nêu trong Quy định này là một lượng dung môi tồn dư trong dược phẩm có thể đưa vào cơ thể, để tránh nhầm với liều ADI của cùng dung môi.

Các dung môi tồn dư ghi trong Quy định này được liệt kê theo tên thông thường. Chúng được phân làm 3 nhóm, tùy thuộc khả năng gây độc đối với sức khỏe con người, như sau:

*Nhóm 1: Các dung môi phải tránh sử dụng*

Các chất gây ung thư cho người hay có khả năng gây ung thư cho người rõ rệt. Các chất gây nhiễm độc môi trường.

*Nhóm 2: Các dung môi phải hạn chế sử dụng*

Các chất gây ung thư trên động vật, không độc cho gen hoặc các tác nhân có thể gây độc không hồi phục như độc tính trên thần kinh hoặc gây quái thai. Các dung môi nghi có độc tính quan trọng, nhưng hồi phục được.

*Nhóm 3: Các dung môi độc tính thấp*

Các dung môi có độc tính thấp trên người: Không cần xác định liều gây tác hại cho sức khỏe.

Các dung môi Nhóm 3 có liều phơi nhiễm được phép mỗi ngày (PDE) bằng hoặc lớn hơn 50 mg/ngày.

***Phương pháp xác định giới hạn phơi nhiễm***

Phương pháp dùng để xác định liều PDE của các dung môi tồn dư được giới thiệu trong Chú thích 3. Tóm tắt các dữ liệu về độc tính dùng để thiết lập PDE được công bố trong *Pharmeuropa Vol 1, No 1, Supplement April/1997.*

***Phương pháp xác định giới hạn dung môi Nhóm 2***

Có hai cách có thể áp dụng để xác định giới hạn cho các dung môi Nhóm 2.

*Cách 1:*

Có thể dùng hàm lượng (nồng độ) giới hạn tính theo phần triệu (ppm) ghi trong Bảng 10.14.1-2. Các nồng độ này

được tính theo công thức (1) với lượng chế phẩm dùng mỗi ngày cho là 10 g.

$$\text{Nồng độ (phần triệu)} = \frac{1000 \times PDE}{10} \quad (1)$$

Trong đó:

PDE là liều phơi nhiễm được phép mỗi ngày tính theo mg/ngày; 10 là số lấy làm lượng chế phẩm dùng trong mỗi ngày và tính theo g/ngày.

Giới hạn này áp dụng cho mọi dược chất, tá dược hoặc dược phẩm. Cách 1 có thể áp dụng nếu liều dùng hàng ngày không được biết hoặc không được quy định cụ thể. Khi mọi tá dược, dược chất có trong công thức bào chế đáp ứng với giới hạn cho bởi cách 1, các thành phần của chế phẩm có thể dùng theo bất kỳ tỷ lệ nào. Không cần tính toán gì thêm, nếu liều dùng mỗi ngày không quá 10 g. Chế phẩm có liều dùng lớn hơn 10 g mỗi ngày phải tính theo cách 2.

*Cách 2:*

Không nhất thiết mỗi thành phần của dược phẩm đều phải đáp ứng giới hạn đã đưa ra trong cách 1. Có thể dùng PDE tính theo mg/ngày ghi trong Bảng 10.14.1-2, cùng với liều tối đa mỗi ngày và công thức (1) để xác định hàm lượng dung môi tồn dư cho phép trong dược phẩm. Các giới hạn này được chấp nhận miễn là chứng minh được rằng dung môi tồn dư đã được giảm đến lượng thực tế tối thiểu. Các giới hạn này phải thực tế có liên quan đến độ chính xác của phép phân tích, điều kiện sản xuất, các thay đổi hợp lý của quá trình sản xuất và các giới hạn phải thực hiện các tiêu chuẩn công nghệ đương thời.

Có thể áp dụng cách 2 bằng cách cộng các lượng dung môi tồn dư trong mỗi thành phần của chế phẩm. Tổng lượng dung môi dùng trong ngày phải thấp hơn PDE.

Hãy xét một ví dụ áp dụng cách 1 và cách 2 cho dung môi acetonitril trong một dược phẩm. PDE của acetonitril là 4,1 mg/ngày. Như vậy, giới hạn tính theo cách 1 là 410 phần triệu (410 ppm). Lượng dùng tối đa mỗi ngày của dược phẩm là 5,0 g; dược phẩm chứa 2 tá dược. Thành phần dược phẩm và hàm lượng tối đa của acetonitril tồn dư thể hiện trong bảng sau đây:

| Thành phần | Lượng trong công thức bào chế | Hàm lượng acetonitril | Lượng phơi nhiễm mỗi ngày |
|---|---|---|---|
| Dược chất | 0,3 g | $800 \times 10^{-6}$ | 0,24 mg |
| Tá dược 1 | 0,9 g | $400 \times 10^{-6}$ | 0,36 mg |
| Tá dược 2 | 3,8 g | $800 \times 10^{-6}$ | 3,04 mg |
| Dược phẩm | 5,0 g | $728 \times 10^{-6}$ | 3,64 mg |

Tá dược 1 đáp ứng giới hạn tính theo cách 1.

Tá dược 2, dược chất và dược phẩm không đáp ứng giới hạn tính theo cách 1.

Tuy thế, dược phẩm tính theo cách 2 đáp ứng giới hạn 4,1 mg/ngày, và như vậy phù hợp với yêu cầu của quy định này.

Hãy xét một ví dụ khác, coi acetonitril là dung môi tồn dư. Lượng dùng tối đa mỗi ngày của một dược phẩm là 5,0 g, dược phẩm có chứa 2 tá dược. Thành phần dược phẩm và hàm lượng tối đa của acetonitril tồn dư thể hiện trong bảng sau:

| Thành phần | Lượng trong công thức chế | Hàm lượng acetonitril | Lượng phơi nhiễm mỗi ngày |
|---|---|---|---|
| Dược chất | 0,3 g | $800 \times 10^{-6}$ | 0,24 mg |
| Tá dược 1 | 0,9 g | $2000 \times 10^{-6}$ | 1,80 mg |
| Tá dược 2 | 3,8 g | $800 \times 10^{-6}$ | 3,04 mg |
| Dược phẩm | 5,0 g | $1016 \times 10^{-6}$ | 5,08 mg |

Trong ví dụ này, dược phẩm không đáp ứng giới hạn tính theo cách 1 và cả cách 2 bằng cách cộng. Nhà sản xuất phải thử nghiệm dược phẩm để xem quá trình bào chế có làm giảm mức độ tồn dư của acetonitril không. Nếu suốt quá trình bào chế, mức acetonitril không giảm tới giới hạn cho phép, khi đó nhà sản xuất phải tiến hành các bước làm giảm lượng acetonitril trong dược phẩm. Nếu tất cả các bước này không làm giảm được mức tồn dư của acetonitril, trong trường hợp đặc biệt, nhà sản xuất có thể cung cấp bản tóm tắt những cố gắng để giảm lượng dung môi tồn dư, nhằm đạt quy định này, và đưa ra lý lẽ phân tích nguy cơ/lợi ích khi dùng chế phẩm có chứa dung môi tồn dư ở mức cao này.

### *Qui trình phân tích dung môi tồn dư*

Phương pháp phân tích dung môi tồn dư thông thường là dùng kỹ thuật sắc ký như sắc ký khí. Nếu thích hợp, dùng phương pháp xác định dung môi tồn dư mô tả trong dược điển. Ngoài ra, nhà sản xuất có thể tự do chọn lựa một quy trình phân tích có hiệu lực thích hợp nhất để áp dụng riêng. Nếu chỉ hiện diện dung môi Nhóm 3 thôi, có thể dùng một phương pháp không đặc hiệu như phương pháp Xác định mất khối lượng do làm khô (Phụ lục 9.6).

Thẩm định các phương pháp xác định dung môi tồn dư phải tuân thủ các quy định của ICH (Hội nghị quốc tế về hài hòa các yêu cầu kỹ thuật để đăng ký các thuốc dùng cho người) ghi trong "Văn bản thẩm định quy trình phân tích" (*Text on validation of analytical procedures*) và "Mở rộng văn bản thẩm định quy trình phân tích" (*Extension of the ICH Text on validation of analytical procedures*).

### *Báo cáo mức dung môi tồn dư*

Nhà sản xuất dược phẩm cần nắm chắc thông tin về nồng độ dung môi tồn dư trong dược chất và tá dược để dược phẩm sản xuất ra đạt được mức của Quy định này.

Sau đây là các ví dụ về các thông tin mà nhà cung cấp tá dược hay dược chất có thể cung cấp cho nhà sản xuất dược phẩm. Nhà cung cấp có thể chọn một trường hợp thích hợp trong số các trường hợp sau đây:

Chỉ có các dung môi Nhóm 3 hiện diện. Mất khối lượng do làm khô không quá 0,5 %.

Chỉ có các dung môi Nhóm 2 (X, Y...) hiện diện. Tất cả phải thấp hơn giới hạn tính theo cách 1 (ở đây, nhà cung cấp chỉ rõ tên các dung môi Nhóm 2: X, Y...).

Chỉ có các dung môi Nhóm 2 (X, Y...) và các dung môi Nhóm 3 hiện diện. Các dung môi Nhóm 2 tồn dư phải dưới mức giới hạn tính theo cách 1 và các dung môi Nhóm 3 tồn dư không quá 0,5 %.

Nếu chắc chắn hiện diện các dung môi Nhóm 1 thì phải định tính và định lượng chúng. Dung môi chắc chắn hiện diện là những dung môi được dùng trong giai đoạn cuối của quy trình sản xuất và các dung môi khác được dùng trước đó mà không được loại bỏ hoàn toàn bằng các biện pháp hữu hiệu.

Nếu dung môi Nhóm 2 hoặc Nhóm 3 hiện diện ở mức lớn hơn giới hạn cho phép tính theo Cách 1 (Nhóm 2) hay lớn hơn 0,5 % (Nhóm 3) thì chúng phải được định tính và định lượng.

## 4. Giới hạn dung môi tồn dư

### *Dung môi phải tránh sử dụng*

Không được sử dụng các dung môi Nhóm 1 trong việc sản xuất dược chất, tá dược và dược phẩm. Chúng có độc tính không thể chấp nhận được, hoặc có tác hại đến môi trường. Khi buộc phải sử dụng chúng trong quy trình sản xuất một dược phẩm có tác dụng trị liệu vượt trội rõ rệt, phải tuân thủ giới hạn ghi trong Bảng 10.14.1-1; trừ trường hợp buộc phải chấp nhận giới hạn lớn hơn đã được giải thích chứng minh rõ. Dung môi 1,1,1-tricloroethan được xếp trong Bảng 10.14.1-1 vì là một tác nhân nguy hại cho môi trường. Giới hạn 1500 phần triệu dựa trên cơ sở thông tin về dữ liệu an toàn.

### *Dung môi phải hạn chế sử dụng*

Các dung môi trong Bảng 10.14.1-2 phải được quy định mức giới hạn có trong dược phẩm vì độc tính vốn có của chúng. Các giá trị PDE được đưa ra dao động trong khoảng 0,1 mg/ngày. Hàm lượng tồn dư trong dược phẩm dao động trong khoảng 10 phần triệu.

### *Dung môi có độc tính thấp*

Các dung môi Nhóm 3 (có trong Bảng 10.14.1-3) có thể coi như ít độc và có nguy cơ thấp đối với sức khỏe con người. Nhóm 3 bao gồm các dung môi không nguy hiểm đối với sức khỏe con người ở hàm lượng thường được chấp nhận trong dược phẩm. Tuy nhiên chưa có các nghiên cứu về độc tính trường diễn và về khả năng gây ung thư của nhiều dung môi thuộc nhóm này. Các dữ liệu hiện có cho thấy các dung môi này tỏ ra ít độc trong các nghiên cứu cấp diễn hoặc ngắn hạn và cho kết quả âm tính với những thử nghiệm độc tính trên gen. Do đó, coi như được phép dùng các dung môi này với lượng 50 mg mỗi ngày hoặc thấp hơn (tương ứng với hàm lượng 5000 × $10^{-6}$ hoặc 0,5 % tính theo cách 1) mà không cần phải thuyết minh. Có thể dùng ở mức cao hơn, miễn là thực tế các mức đó có liên quan đến khả năng sản xuất và thực hành sản xuất tốt.

Dung môi chưa có đủ thông tin về độc tính

Các dung môi trong Bảng 10.14.1-4 có thể cũng được các nhà sản xuất dược chất, tá dược hoặc dược phẩm quan tâm. Tuy nhiên, chưa có các dữ liệu đầy đủ về độc tính của chúng để làm cơ sở cho việc xác định PDE. Khi sử dụng các dung môi này trong sản xuất, nhà sản xuất phải giải trình rõ ràng sự tồn dư của các dung môi này trong sản phẩm của mình.

*Bảng 10.14.1-1*: Nhóm 1, các dung môi phải tránh sử dụng trong dược phẩm

| Dung môi | Nồng độ giới hạn (µg/g) | Độc tính |
|---|---|---|
| Benzen | 2 | Gây ung thư |
| Carbon tetraclorid | 4 | Độc và nguy hại cho môi trường |
| 1,2- Dicloroethan | 5 | Độc |
| 1,1- Dicloroethen | 8 | Độc |
| 1,1,1- Tricloroethan | 1500 | Nguy hại cho môi trường |

*Bảng 10.14.1-2*: Nhóm 2, các dung môi phải hạn chế sử dụng trong dược phẩm

| Dung môi | Liều phơi nhiễm được phép mỗi ngày (PDE) (mg/ngày) | Nồng độ giới hạn (µg/g) |
|---|---|---|
| Acetonitril | 4,1 | 410 |
| Clorobenzen | 3,6 | 360 |
| Cloroform | 0,6 | 60 |
| Cyclohexan | 38,8 | 3880 |
| 1,2- Dicloroethen | 18,7 | 1870 |
| Diclorometan | 6,0 | 600 |
| 1,2- Dimethoxyethan | 1,0 | 100 |
| N,N- Dimethylacetamid | 10,9 | 1090 |
| N,N- Dimethylformamid | 8,8 | 880 |
| 1.4- Dioxan | 3,8 | 380 |
| 2- Ethoxyethanol | 1,6 | 160 |
| Ethylenglycol | 6,2 | 620 |
| Formamid | 2,2 | 220 |
| Hexan | 2,9 | 290 |
| Methanol | 30,0 | 3000 |
| 2- Methoxyethanol | 0,5 | 50 |
| Methylbutylketon | 0,5 | 50 |
| Methylcyclohexan | 11,8 | 1180 |
| N- Methylpyrrolidon | 5,3 | 530 |
| Nitromethan | 0,5 | 50 |
| Pyridin | 2,0 | 200 |
| Sulfolan | 1,6 | 160 |
| Tetrahydrofuran | 7,2 | 720 |
| Tetralin | 1,0 | 100 |
| Toluen | 8,9 | 890 |
| 1,1,2- Tricloroethen | 0,8 | 80 |
| Xylen* | 21,7 | 2170 |

** Thường dùng hỗn hợp gồm m-xylen 60 %; p-xylen 14 %; o-xylen 9 % và ethyl benzen 17 %.*

*Bảng 10.14.1-3:* Nhóm 3, các dung môi phải được giới hạn vì GMP hoặc vì các yêu cầu chất lượng khác

| | |
|---|---|
| Acid acetic | Heptan |
| Aceton | Isobutyl acetat |
| Anisol | Isopropyl acetat |
| 1- Butanol | Methyl acetat |
| 2- Butanol | 3- Methyl-1-butanol |
| Butyl acetat | Methylethylketon |
| Tert – Butylmethyl ether | Methylisobutylketon |
| Cumen | 2- Methyl-1-propanol |
| Dimethylsulfoxid | Pentan |
| Ethanol | 1- Pentanol |
| Ethyl acetat | 1- Propanol |
| Ethyl ether | 2- Propanol |
| Ethyl format | Propyl acetat |
| Acid formic | |

*Bảng 10.14.1-4:* Các dung môi chưa có đủ thông tin về độc tính

| | |
|---|---|
| 1,1- Diethoxypropan | Methylisopropylketon |
| 1,1- Dimethoxymethan | Methyltetrahydrofuran |
| 2,2- Dimethoxypropan | Petroleum |
| Isooctan | Acid tricloracetic |
| Isopropyl ether | Acid trifluoroacetic |

**Chú thích 1:** Thuật ngữ

*Genotoxic carcinogens:* Tác nhân gây ung thư do tác động lên gen hay chromosom.

*LOEL*: Viết tắt của từ "lowest-observed effect level" (mức phát hiện gây hại thấp nhất), liều thấp nhất dùng trong một thử nghiệm hay nhóm các thử nghiệm gây sự gia tăng có ý nghĩa sinh học về tần số hoặc về mức độ nghiêm trọng của bất kỳ các tác dụng nào đó trên người hay động vật bị phơi nhiễm.

*Modifying factor*: Hệ số hiệu chỉnh, là hệ số được chuyên gia độc chất học xác định và áp dụng cho các dữ liệu định lượng sinh học để tính các thông số an toàn cho người.

*Neurotoxicity*: Nhiễm độc thần kinh

*NOEL*: Viết tắt của từ "no-observed effect level" (mức không phát hiện gây hại), liều cao nhất của chất đã dùng mà không gây sự gia tăng có ý nghĩa sinh học về tần số hoặc về mức độ nghiêm trọng của bất kỳ các tác dụng nào đó trên người hay động vật bị phơi nhiễm.

*PDE*: viết tắt của từ "Permitted daily exposure"

*Permitted daily exposure*: Lượng cao nhất có thể dùng trong một ngày của dung môi tồn dư trong dược phẩm.

*Reversible toxicity*: Độc tính phục hồi được, tức là sẽ mất đi sau khi kết thúc phơi nhiễm.

*Strongly suspected human carcinogen*: Tác nhân nghi ngờ gây ung thư trên người, một chất không có dấu hiệu dịch tễ học là có khả năng gây ung thư nhưng lại cho kết quả dương tính về độc tính trên gen và các dấu hiệu rõ ràng về khả năng gây ung thư trên loài gặm nhấm.

*Teratogenicity*: Độc tính gây quái thai, sự cố gây dị tật về cấu trúc trong quá trình phát triển thai nhi khi sử dụng một chất trong thời kỳ mang thai.

**Chú thích 2:**

***2.1 Quy chế bảo vệ môi trường đối với các dung môi hữu cơ bay hơi***

Một số dung môi thường dùng trong sản xuất dược phẩm được liệt kê như các hóa chất độc trong các chuyên luận EHC (Environmental Health Criteria) và IRIS (Integrated Risk Information System). Trong các mục tiêu của các tổ chức như "Chương trình thế giới về an toàn hóa chất" (IPCS = International Programme on Chemical Safety), "Cơ quan bảo vệ môi trường Mỹ (USEPA = United States Environmental Protection Agency) và "Cơ quan quản lý thực phẩm và dược phẩm Mỹ (USFDA = United States Food and Drug Administration) có việc xác định các mức phơi nhiễm có thể chấp nhận được. Mục đích là bảo vệ sức khỏe con người và giữ gìn sự trong sạch vẹn toàn của môi trường, chống lại các tác dụng có thể có hại của các hóa chất do phơi nhiễm lâu dài tại môi trường. Các phương pháp dùng để xác định mức tối đa phơi nhiễm an toàn thường được căn cứ trên các thử nghiệm dài hạn. Khi không có các dữ liệu từ những thử nghiệm dài hạn, có thể dùng dữ liệu từ các thử nghiệm ngắn hạn với việc cải tiến cách tiếp cận như việc sử dụng các yếu tố hệ số an toàn lớn hơn. Cách tiếp cận nói ở trên đây chủ yếu liên quan tới các phơi nhiễm dài hạn hay suốt đời, đối với các cộng đồng dân cư, trong môi trường xung quanh như không khí, thức ăn, nước uống và các môi trường khác.

***2.2. Dung môi tồn dư trong thuốc***

Các giới hạn phơi nhiễm trong Quy định này được thiết lập căn cứ vào các phương pháp và các dữ liệu về độc tính mô tả trong các tiêu chuẩn EHC và trong các chuyên luận của EHC và IRIS. Tuy nhiên, một số giả định đặc biệt về dung môi tồn dư trong việc tổng hợp và bào chế các dược phẩm phải được tính đến khi thiết lập các giới hạn phơi nhiễm. Đó là:

1/ Những người bệnh (không phải toàn thể cộng đồng) phải sử dụng thuốc để phòng hoặc chữa bệnh.

2/ Việc giả định người bệnh bị phơi nhiễm suốt đời là không cần thiết đối với đa số các dược phẩm, song có thể thích hợp như một giả thiết nghiên cứu, nhằm giảm nguy cơ đến sức khỏe con người.

3/ Các dung môi tồn dư là những thành phần không thể tránh được trong sản xuất dược phẩm và còn thường là một phần của thuốc.

4/ Các dung môi tồn dư phải không được vượt quá các mức độ khuyến cáo, trừ những trường hợp đặc biệt.

5/ Các dữ liệu từ các nghiên cứu độc chất học dùng để xác định các mức chấp nhận được cho các dung môi tồn dư phải được thiết lập bằng cách sử dụng các quy trình thích hợp, chẳng hạn các quy trình do OECD mô tả và

sử dụng cuốn sách đỏ của Tổ chức quản lý thực phẩm và dược phẩm của Mỹ (*FDA Red book*).

**Chú thích 3:** Phương pháp thiết lập các giới hạn phơi nhiễm
Phương pháp đánh giá nguy cơ của Gaylor - Kodell (Xem: Gaylor, D.W. và Kodell, R. L. - Thuật toán nội suy tuyến tính để đánh giá liều thấp của các chất độc. *J. Environ Pathology, 4, 305, 1980)* thích hợp với các dung môi gây ung thư thuộc Nhóm 1. Chỉ trong các trường hợp đã có các dữ liệu đáng tin cậy về tính gây ung thư thì phải áp dụng ngoại suy bằng cách dùng các mô hình toán học để thiết lập các giới hạn phơi nhiễm. Các giới hạn phơi nhiễm của các dung môi Nhóm 1 có thể được xác định với việc sử dụng một thông số an toàn lớn (từ 10 000 đến 100 000) đối với "mức không phát hiện gây hại" (NOEL). Việc phát hiện và định lượng các dung môi này phải được thực hiện bằng các kỹ thuật phân tích tiên tiến.
Các mức phơi nhiễm chấp thuận được của các dung môi Nhóm 2 ghi trong quy định này được thiết lập bằng cách tính các giá trị PDE theo các quy trình xác định giới hạn phơi nhiễm của các thuốc (xem *Pharmacopeial Forum 11-12/1989*) và theo phương pháp đã được Chương trình thế giới về an toàn hóa chất (IPCS) thừa nhận nhằm đánh giá nguy cơ đối với sức khỏe con người do hóa chất (xem *Environmental Health Criteria 170, WHO, 1994)*. Các phương pháp này tương tự như các phương pháp của Cơ quan bảo vệ môi trường Mỹ (USEPA) và của Cơ quan quản lý thực phẩm và dược phẩm Mỹ (USFDA) và các tổ chức khác nữa. Phương pháp được giới thiệu sơ lược ở đây nhằm cung cấp một hiểu biết tốt hơn nguồn gốc của các liều phơi nhiễm được phép mỗi ngày (PDE). Không nhất thiết phải thực hiện các phép tính toán này mà sử dụng ngay các giá trị PDE đã ghi trong các bảng trình bày ở Mục 4 của Quy định này.
Giới hạn PDE được tính từ "mức không phát hiện gây hại" (NOEL) hoặc từ "mức phát hiện gây hại thấp nhất" (LOEL) trong thử nghiệm trên súc vật như sau:

$$PDE = \frac{NOEL \times \text{thể trọng quy ước}}{F1 \times F2 \times F3 \times F4 \times F5}$$

Trong đó:
Thể trọng quy ước là khối lượng cơ thể người trưởng thành, không phân biệt giới tính, được quy ước để tính ở đây là 50 kg;
F là các hệ số hiệu chỉnh.
PDE thường được tính từ NOEL. Khi không thiết lập được NOEL, có thể dùng LOEL. Các hệ số hiệu chỉnh đề ra ở đây để chuyển đổi các dữ liệu thử nghiệm trên súc vật sang cho người, cũng tương tự như các "hệ số không chắc chắn" (Uncertainty factors) dùng trong "Tiêu chuẩn trong sạch của môi trường" (EHC) (Xem *Environmental Health Criteria 170, WHO, Geneva, 1994*) và "hệ số hiệu chỉnh" (modifying factors) hay "hệ số an toàn" (safety factors) dùng trong *Pharmacopeial Forum*. Giả định 100 % phơi nhiễm toàn thân được sử dụng trong tất cả các tính toán, bất kể dùng thuốc theo đường nào.

*Các hệ số hiệu chỉnh*
F1 là hệ số ngoại suy giữa các loài:
F1 = 2, khi ngoại suy từ thử nghiệm trên chó sang người;
F1 = 2,5, khi ngoại suy từ thử nghiệm trên thỏ sang người;
F1 = 3, khi ngoại suy từ thử nghiệm trên khỉ sang người;
F1 = 5, khi ngoại suy từ thử nghiệm trên chuột cống trắng (rat) sang người;
F1 = 10, khi ngoại suy từ thử nghiệm trên các loài động vật khác sang người;
F1 = 12, khi ngoại suy từ thử nghiệm trên chuột nhắt sang người.
F1 tính được khi so sánh tỷ lệ giữa diện tích bề mặt với khối lượng cơ thể của loài vật tham gia thử nghiệm và của người. Diện tích bề mặt (S) được tính như sau:

$$S = k.M^{0.67}$$

Trong đó:
M là khối lượng cơ thể (khối lượng cơ thể của sinh vật tham gia thử nghiệm, dùng trong công thức trên, được liệt kê trong Bảng 10.14.2.5);
k = 10
F2 là hệ số chỉ sự khác biệt giữa các cá thể;
F2 = 10, thường dùng cho tất cả các dung môi hữu cơ và dùng thống nhất trong quy định này;
F3 là một hệ số không hằng định, dùng cho các thử nghiệm phơi nhiễm ngắn hạn;
F3 = 1, cho các thử nghiệm kéo dài ít nhất bằng 1/2 đời sống của vật thí nghiệm (1 năm đối với loài gặm nhấm hoặc thỏ, 7 năm đối với chó, mèo hoặc khỉ);
F3 = 1, cho các thử nghiệm về sinh sản, kéo dài trong suốt thời gian hình thành các cơ quan phủ tạng;
F3 = 2, cho các thử nghiệm kéo dài 6 tháng, trên loài gặm nhấm hoặc 3,5 năm trên các con thú không thuộc loài gặm nhấm;
F3 = 5, cho các thử nghiệm kéo dài 3 tháng, trên loài gặm nhấm, hoặc 2 năm trên các con thú không thuộc loài gặm nhấm;
F3 = 10, cho các thử nghiệm ngắn hạn hơn.
Trong mọi trường hợp, khi thử nghiệm kéo dài trong khoảng thời gian nằm giữa 2 mốc thời gian quy định ở trên, thì ta cho F3 giá trị cao, ứng với mốc thời gian thử nghiệm ngắn. Ví dụ: F3 = 2 trong thử nghiệm kéo dài 9 tháng trên loài gặm nhấm (vì 9 tháng nằm trong mốc 1 năm và 6 tháng, do đó lấy F3 bằng F3 của mốc 6 tháng).
F4 là một hệ số áp dụng trong các trường hợp độc tính nghiêm trọng như: Gây ung thư không độc cho gen, độc tính thần kinh, độc tính gây quái thai. Trong các thử nghiệm về độc tính sinh sản, hệ số này được dùng như sau:
F4 = 1, khi gây độc trên bào thai cùng với gây độc trên mẹ;
F4 = 5, khi gây độc trên bào thai, nhưng không gây độc trên mẹ;
F4 = 5, khi gây quái thai cùng với gây độc trên mẹ;
F4 = 10, khi gây quái thai trên bào thai, nhưng không gây độc trên mẹ;
F5 là một hệ số không hằng định, áp dụng khi không thiết lập được "mức không phát hiện gây hại" (NOEL). Khi chỉ

có thể xác định được "mức gây hại thấp nhất" (LOEL), có thể cho F5 giá trị cao, có thể tới F5 = 10, tuỳ thuộc vào mức độ nghiêm trọng của độc tính.

Khối lượng cơ thể (cân nặng) quy ước cho người trưởng thành, không phân biệt giới tính ở đây là 50 kg. Khối lượng này tương đối thấp hơn khối lượng chuẩn mực (60 kg đến 70 kg) thường áp dụng trong các tính toán cùng loại (tính liều dùng thuốc) là nhằm mục đích an toàn.

Một số người bệnh có cân nặng nhẹ hơn 50 kg, những người bệnh này phải được xem xét điều chỉnh bằng cách dùng hệ số an toàn xác định PDE.

Nếu dung môi có trong một công thức dược phẩm chuyên dùng cho Nhi khoa, ta phải điều chỉnh thích hợp, vì khối lượng cơ thể của trẻ thấp.

Ví dụ áp dụng công thức tính PDE:

Hãy xét một thử nghiệm độc tính của acetonitril trên chuột nhắt, thử nghiệm này được tóm tắt trong *Pharmaeuropa Vol 9, No1, Supplement April 1997 page S 24*, "mức không phát hiện gây hại" (NOEL) là 50,7 mg/kg/ngày. PDE của acetonitril trong thử nghiệm này được tính như sau:

$$PDE = \frac{50{,}7 mg.kg^{-1}.ngày^{-1} \times 50kg}{12 \times 10 \times 5 \times 1 \times 1} = 4{,}22 \text{ mg/ngày}$$

Trong đó:

F1 = 12 là hệ số ngoại suy từ thử nghiệm trên chuột nhắt sang người;

F2 = 10 là hệ số khác biệt giữa các cá thể (thống nhất quy định là F2 = 10);

F3 = 5 khi thời gian thử nghiệm chỉ có 13 tuần (> 3 tháng);

F4 = 1 khi không thấy độc tính nghiêm trọng nào;

F5 = 1 khi "mức không phát hiện gây độc hại" (NOEL) được xác định.

Phương trình dùng cho khí lý tưởng PV = nRT được áp dụng để chuyển hàm lượng chất khí trong thử nghiệm dùng phương pháp xông (inhalation studies) từ đơn vị phần triệu thành đơn vị mg/L hay mg/m³.

Hãy xét thử nghiệm độc tính sinh sản trên chuột trắng bằng cách xông khí carbon tetraclorid (khối lượng phân tử 153,84) đã được tóm tắt trong *Pharmaeuropa Vol 9. No1. Supplement April 1997, p.S9:*

$$\frac{n}{V} = \frac{P}{RT} = \frac{300 \times 10^{-6} atm \times 153840 mg.mol^{-1}}{0{,}082 L.atm.K^{-1}.mol^{-1} \times 298K} = \frac{46{,}15 mg}{24{,}43 L}$$

Dùng công thức 1000 L = 1 m³ để suy ra hàm lượng mg/m³

*Bảng 10.14.1-5*: Các giá trị dùng tính toán trong tài liệu này

| | |
|---|---|
| Cân nặng của chuột cống trắng (Rat) | 425 g |
| Cân nặng của chuột cống trắng có thai (Pregnant rat) | 330 g |
| Cân nặng của chuột nhắt (Mouse) | 28 g |
| Cân nặng của chuột nhắt có thai (Pregnant mouse) | 30 g |
| Cân nặng của chuột lang (Guinea – pig) | 500 g |
| Cân nặng của khỉ Ấn Độ (Rhesus monkey) | 25 kg |
| Cân nặng của thỏ (có thai hoặc không có thai) | 4 kg |
| Cân nặng của chó săn nhỏ (Beagle dog) | 11,5 kg |
| Dung lượng hô hấp của chuột cống trắng (Rat respiratory volume) | 290 L/ngày |
| Dung lượng hô hấp của chuột nhắt | 43 L/ngày |
| Dung lượng hô hấp của thỏ | 1440 L/ngày |
| Dung lượng hô hấp của chuột lang | 4301 L/ngày |
| Dung lượng hô hấp của người | 28800 L/ngày |
| Dung lượng hô hấp của chó | 9000 L/ngày |
| Dung lượng hô hấp của khỉ | 1150 L/ngày |
| Lượng nước chuột nhắt dùng | 5 ml/ngày |
| Lượng nước chuột trắng dùng | 30 ml/ngày |
| Lượng thức ăn chuột trắng dùng | 30 g/ngày |

## 10.15 XÁC ĐỊNH ETHYLEN OXYD VÀ DIOXAN TỒN DƯ

Thử nghiệm này xác định ethylen oxyd và dioxan tồn dư trong các chất tan trong nước hay trong dimethylacetamid. Đối với các chất không tan hoặc tan không hoàn toàn trong các dung môi trên, việc chuẩn bị dung dịch mẫu thử và các điều kiện sắc ký khí tiêm pha hơi được qui định trong chuyên luận riêng.

Xác định bằng phương pháp sắc ký khí (Phụ lục 5.2), kỹ thuật tiêm pha hơi *(head-space gas chromatography)*.

***Phương pháp 1:*** Dùng cho chất thử hòa tan hay trộn đều được trong nước.

*Dung dịch thử:* Cân 1,00 g ($M_T$) chất thử vào một lọ nhỏ 10 ml (hoặc có thể tích thích hợp) và thêm 1,0 ml *nước*. Đóng nắp lọ và trộn để thu được dung dịch đồng nhất. Để yên ở 70 °C trong 45 min.

*Dung dịch đối chiếu (a):* Cân 1,00 g ($M_C$) chất thử vào một lọ nhỏ như trên, thêm 0,50 ml *dung dịch ethylen oxyd ($TT_3$)* và 0,50 ml *dung dịch dioxan ($TT_1$)*. Đóng nắp lọ và trộn đều để thu được một dung dịch đồng nhất. Để yên ở 70 °C trong 45 min.

*Dung dịch đối chiếu (b):* Trong lọ nhỏ thể tích 10 ml, thêm vào 0,50 ml *dung dịch ethylen oxyd ($TT_3$)*, 0,10 ml dung dịch *acetaldehyd (TT)* 0,001 % mới pha và 0,10 ml *dung dịch dioxan ($TT_1$)*. Đóng nắp lọ và trộn để thu được dung dịch đồng nhất. Để yên ở 70 °C trong 45 min.

***Phương pháp 2:*** Dùng cho các chất thử hòa tan hay trộn đều được trong dimethylacetamid.

*Dung dịch thử:* Cân 1,00 g ($M_T$) chất thử vào một lọ nhỏ 10 ml (hoặc có thể tích thích hợp) và thêm 1,0 ml *dimethylacetamid (TT)* và 0,2 ml *nước*. Đóng nắp lọ và trộn để thu được dung dịch đồng nhất. Để yên ở 90 °C trong 45 min.

*Dung dịch đối chiếu (a):* Cân 1,00 g ($M_C$) chất thử vào một lọ nhỏ như trên, thêm 1,0 ml *dimethylacetamid (TT)*, thêm 0,10 ml *dung dịch dioxan (TT)* và 0,10 ml *dung dịch*

*ethylen oxyd ($TT_2$)*. Đóng nắp lọ và trộn để thu được một dung dịch đồng nhất. Để yên ở 90 °C trong 45 min.

*Dung dịch đối chiếu (b):* Trong lọ nhỏ thể tích 10 ml, thêm vào 0,10 ml *dung dịch ethylen oxyd ($TT_2$)*, 0,10 ml dung dịch *acetaldehyd (TT)* 0,01 % mới pha và 0,10 ml *dung dịch dioxan (TT)*. Đóng nắp lọ và trộn đều để thu được dung dịch đồng nhất. Để yên ở 70 °C trong 45 min.

**Quá trình sắc ký**

*Điều kiện tiêm pha hơi*

Nhiệt độ cân bằng: 70 °C (90 °C đối với dung dịch trong dimethylacetamid).

Thời gian cân bằng: 45 min.

Nhiệt độ dòng chảy: 75 °C (150 °C đối với dung dịch trong dimethylacetamid).

Thời gian điều áp: 1 min.

Khí mang: *Heli dùng cho sắc ký khí.*

Thời gian tiêm: 12 s.

*Điều kiện sắc ký*

Cột thủy tinh hoặc thạch anh kích thước (30 m × 0,32 mm), mặt trong được phủ lớp *polydimethylsiloxan* dày 1,0 µm.

Khí mang: *Heli* (hoặc *nitrogen*) *dùng cho sắc ký khí*, tốc độ dòng khoảng 20 cm/s, tỷ lệ chia dòng 1 : 20.

Detector: ion hóa ngọn lửa.

Duy trì nhiệt độ cột ở 50 °C trong 5 min, sau đó tăng đến 180 °C với tốc độ 5 °C/min, sau đó lại tăng đến 230 °C với tốc độ 30 °C/min và giữ ở 230 °C trong 5 min. Nhiệt độ detector là 250 °C, nhiệt độ buồng tiêm là 150 °C.

Tiêm một lượng thích hợp pha hơi của dung dịch đối chiếu (b), chẳng hạn 1 ml. Điều chỉnh độ nhạy của hệ thống sao cho chiều cao các pic cho bởi ethylen oxyd và acetaldehyd trong sắc ký đồ đạt ít nhất 15 % thang đo. Thử nghiệm không có hiệu lực nếu hệ số phân giải giữa pic cho bởi acetaldehyd và pic cho bởi ethylen oxyd nhỏ hơn 2,0 và pic của dioxin và ethylene oxyd được phát hiện với tỷ lệ tín hiệu/nhiễu nhỏ hơn 5.

Tiêm lần lượt những lượng thích hợp pha hơi của dung dịch thử và dung dịch đối chiếu (a), chẳng hạn 1 ml (hoặc bằng lượng dung dịch đối chiếu (b) đã tiêm).

Tiêm lặp lại như trên thêm 2 lần nữa.

Diện tích trung bình của pic ethylen oxyd và dioxan trong sắc ký đồ cho bởi dung dịch thử không được lớn hơn một nửa (1/2) diện tích trung bình của pic tương ứng trong sắc ký đồ cho bởi dung dịch đối chiếu (a) (1 phần triệu ethylen oxyd và 50 phần triệu dioxan).

*Kiểm tra độ tin cậy*

Tính hiệu số của diện tích pic, theo từng cặp, cho bởi dung dịch thử và dung dịch đối chiếu (a), lần lượt ứng với ethylen oxyd và với dioxan. Thử nghiệm chỉ có hiệu lực nếu độ lệch chuẩn tương đối của ba giá trị khác biệt (3 hiệu số) ứng với ethylen oxyd không lớn hơn 15 % và độ lệch chuẩn tương đối của ba giá trị khác biệt (3 hiệu số) ứng với dioxan không lớn hơn 15 %.

Nếu lượng cân mẫu thử và chất đối chiếu nằm ngoài khoảng 0,995 g đến 1,005 g cần phải hiệu chỉnh kết quả cho thích hợp.

Hàm lượng ethylen oxyd tính theo phần triệu được tính bằng biểu thức:

$$A_T \times C / [(A_C \times M_T) - (A_T \times M_C)]$$

Trong đó:

$A_T$ là diện tích pic tương ứng với ethylen oxyd trong sắc ký đồ cho bởi dung dịch thử;

$A_C$ là diện tích pic tương ứng với ethylen oxyd trong sắc ký đồ cho bởi dung dịch đối chiếu (a);

$M_T$ là khối lượng chất thử trong dung dịch thử tính theo gam;

$M_C$ là khối lượng chất thử trong dung dịch đối chiếu (a) tính theo gam;

C là khối lượng ethylen oxyd cho vào dung dịch đối chiếu (a) tính theo microgram.

Và hàm lượng dioxan tính theo phần triệu được tính bằng biểu thức:

$$D_T \times C / [(D_C \times M_T) - (D_T \times M_C)]$$

Trong đó:

$D_T$ là diện tích pic tương ứng với dioxan trong sắc ký đồ cho bởi dung dịch thử;

$D_C$ là diện tích pic tương ứng với dioxan trong sắc ký đồ cho bởi dung dịch đối chiếu (a);

$M_T$ là khối lượng chất thử trong dung dịch thử tính theo gam;

$M_C$ là khối lượng chất thử trong dung dịch đối chiếu (a) tính theo gam;

C là khối lượng dioxan cho vào dung dịch đối chiếu (a) tính theo microgram.

## 10.16 ĐỊNH LƯỢNG *N,N*-DIMETHYLANILIN

Xác định bằng phương pháp sắc ký khí (Phụ lục 5.2).

**Phương pháp 1**

*Dung dịch chuẩn nội:* Hòa tan 50 mg *N,N-diethylanilin (TT)* trong 4 ml *dung dịch acid hydrocloric 0,1 M (TT)*, pha loãng bằng *nước* tới 50 ml. Pha loãng 1 ml dung dịch thu được tới 100 ml bằng *nước*.

*Dung dịch thử:* Hòa tan 0,50 g chế phẩm trong 30,0 ml *nước*, thêm 1,0 ml dung dịch chuẩn nội. Điều chỉnh nhiệt độ của dung dịch tới 26 °C đến 28 °C. Thêm 1,0 ml *dung dịch natri hydroxyd 40 % (TT)*. Lắc cho tan hoàn toàn. Thêm 2,0 ml *trimethylpentan (TT)*. Lắc 2 min, để yên cho tách lớp, dùng lớp trên.

*Dung dịch đối chiếu:* Hòa tan 50,0 mg *N,N-dimethylanilin (TT)* trong 4,0 ml *dung dịch acid hydrocloric 0,1 M (TT)*, pha loãng bằng *nước* tới 50,0 ml. Pha loãng 1 ml dung dịch thu được tới 100,0 ml bằng *nước*. Tiếp tục pha loãng 1,0 ml dung dịch thu được tới 30,0 ml bằng *nước*, thêm 1,0 ml dung dịch chuẩn nội, 1,0 ml *dung dịch natri hydroxyd 40 % (TT)*, 2,0 ml *trimethylpentan (TT)*. Lắc 2 min, để yên cho tách lớp, dùng lớp trên.

*Điều kiện sắc ký*

Cột mao quản bằng silica nung chảy, dài 25 m, đường kính trong 0,32 mm, phủ lớp polymer liên kết mạng polymethylphenylsiloxan dày 0,52 µm.

Khí mang: *Heli dùng cho sắc ký khí*, tỷ lệ chia dòng 1 : 20, áp suất đầu cột 5 kPa, lưu lượng 20 ml/min.
Detector ion hóa ngọn lửa.
Bộ chia dòng *(split-liner)* là một cột dài khoảng 1 cm, nhồi diatomit dùng cho sắc ký khí tẩm 10 % (kl/kl) polydimethylsiloxan.
Nhiệt độ: Duy trì nhiệt độ cột 150 °C trong 5 min, sau đó tăng đến 275 °C với tốc độ 20 °C/min, rồi giữ ở 275 °C trong 3 min. Nhiệt độ detector 300 °C, nhiệt độ buồng tiêm 220 °C.
Thể tích tiêm: 1 µl.
Thời gian lưu của *N,N*-dimethylanilin khoảng 3,6 min; của *N,N*-diethylanilin khoảng 5,0 min.

**Phương pháp 2**
*Dung dịch chuẩn nội:* Dung dịch *naphtalen (TT)* 0,005 % trong *cyclohexan (TT)*.
*Dung dịch thử:* Hòa tan 1,00 g chế phẩm với 5 ml *dung dịch natri hydroxyd 1 M (TT)* trong ống thủy tinh có nút mài, thêm 1,0 ml dung dịch chuẩn nội. Đậy kín, lắc mạnh trong 1 min. Ly tâm nếu cần, dùng lớp trên.
*Dung dịch đối chiếu:* Thêm 2 ml *acid hydrocloric (TT)* và 20 ml *nước* vào 50,0 mg *N,N- dimethylanilin (TT)*, lắc cho tan và pha loãng bằng *nước* tới 50,0 ml. Pha loãng 5,0 ml dung dịch này tới 250,0 ml bằng *nước*. Cho 1,0 ml dung dịch thu được vào ống thủy tinh có nút mài, thêm 5 ml *dung dịch natri hydroxyd 1 M (TT)* và 1,0 ml dung dịch chuẩn nội. Đậy kín, lắc mạnh trong 1 min, ly tâm nếu cần và dùng lớp trên.
*Điều kiện sắc ký:* Cột thủy tinh dài 2 m, đường kính trong 2 mm, được nhồi bằng diatomit silan hóa tẩm 3 % (kl/kl) polymethylphenylsiloxan.
Khí mang: *Nitrogen dùng cho sắc ký khí*, với lưu lượng 30 ml/min.
Detector ion hóa ngọn lửa.
Duy trì nhiệt độ cột ở 120 °C, nhiệt độ detector và buồng tiêm ở 150 °C.
Thể tích tiêm: 1 µl.

## 10.17 ĐỊNH LƯỢNG ACID 2-ETHYLHEXANOIC

Tiến hành phương pháp sắc ký khí (Phụ lục 5.2).
*Dung dịch chuẩn nội*: Hòa tan 100 mg *acid 3-cyclohexyl propionic (TT)* trong *cyclohexan (TT)* và pha loãng vừa đủ 100 ml với cùng dung môi.
*Dung dịch thử:* Thêm 4,0 ml *dung dịch acid hydrocloric 33 % (tt/tt)* vào 0,300 g mẫu thử. Lắc mạnh 2 lần, mỗi lần trong 1 min với 1,0 ml dung dịch chuẩn nội. Đợi tách lớp (nếu cần thiết, có thể ly tâm để tách lớp được tốt hơn), sử dụng dịch gộp của các lớp dịch chiết ở trên.
*Dung dịch đối chiếu*: Hòa tan 75,0 mg *acid 2-ethylhexanoic (TT)* trong dung dịch chuẩn nội và pha loãng vừa đủ 50,0 ml với dung dịch chuẩn nội. Thêm 4,0 ml *dung dịch acid hydrocloric 33 % (tt/tt)* vào 1,0 ml dung dịch vừa pha. Lắc mạnh trong 1 min. Đợi tách lớp (nếu cần thiết, có thể ly tâm để tách lớp được tốt hơn). Gạn lấy lớp dịch chiết ở trên. Tiếp tục thêm 1,0 ml dung dịch chuẩn nội vào lớp dịch còn lại ở dưới và lắc mạnh trong 1 min. Đợi tách lớp (nếu cần thiết, có thể ly tâm để tách lớp được tốt hơn), sử dụng dịch gộp của các lớp dịch chiết ở trên.
*Điều kiện sắc ký*:
Cột silica nung chảy có nòng rỗng, chiều dài 10 m, đường kính trong 0,53 mm, phủ lớp pha tĩnh *macrogol 20 000 2-nitroterephtalat* (có bề dày 1,0 µm);
Khí mang: *Heli dùng cho sắc ký*, với tốc độ dòng 10 ml/min;
Detector ion hóa ngọn lửa.
Chương trình nhiệt độ như sau:

| | Thời gian (min) | Nhiệt độ (°C) | Tốc độ (°C/min) | Ghi chú |
|---|---|---|---|---|
| Cột | 0 – 2 | 40 | - | Đẳng nhiệt |
| | 2 – 7,3 | 40 → 200 | 30 | Nhiệt độ tăng đều |
| | 7,3 – 10,3 | 200 | - | Đẳng nhiệt |
| Buồng tiêm | | 200 | | |
| Detector | | 300 | | |

Thể tích tiêm: 1 µl.
*Cách tiến hành*:
Tiến hành sắc ký dung dịch thử và dung dịch đối chiếu.
Phép thử chỉ có giá trị khi độ phân giải giữa pic tương ứng với acid 2-ethylhexanoic (pic đầu tiên) và pic dung dịch chuẩn nội ít nhất là 2,0.
Hàm lượng phần trăm của acid 2-ethylhexanoic được tính theo công thức sau:

$$\frac{A_T \times I_C \times m_C \times 2}{A_C \times I_T \times m_T}$$

Trong đó:
$A_T$ là diện tích pic tương ứng với acid 2-ethylhexanoic trên sắc ký đồ của dung dịch thử;
$A_C$ là diện tích pic tương ứng với acid 2-ethylhexanoic trên sắc ký đồ của dung dịch đối chiếu;
$I_T$ là diện tích pic tương ứng với chất chuẩn nội trên sắc ký đồ của dung dịch thử;
$I_C$ là diện tích pic tương ứng với chất chuẩn nội trên sắc ký đồ của dung dịch đối chiếu;
$m_T$ là lượng cân mẫu thử tính bằng gam;
$m_C$ là lượng cân acid 2-ethylhexanoic trong dung dịch đối chiếu, tính bằng gam.

## 10.18 XÁC ĐỊNH ACID ACETIC TRONG PEPTID TỔNG HỢP

Tiến hành phương pháp sắc ký lỏng (Phụ lục 5.3).
*Pha động:*
Pha động A: Hòa tan 0,7 ml *acid orthophosphoric (TT)* trong vừa đủ 1000 ml *nước*; điều chỉnh pH tới 3,0 với *dung dịch natri hydroxyd 40 % (TT)*.

Pha động B: *Methanol dùng cho sắc ký lỏng (TT).*
*Dung dịch thử:* Chuẩn bị như mô tả ở chuyên luận riêng.
*Dung dịch đối chiếu:* Pha dung dịch acid acetic 0,10 g/l từ *acid acetic băng (TT)*, sử dụng hỗn hợp 5 thể tích pha động B và 95 thể tích pha động A làm dung môi.
*Điều kiện sắc ký:*
Cột kích thước (250 mm × 4,6 mm), nhồi pha tĩnh C (5 µm).
Detector quang phổ tử ngoại đặt ở bước sóng 210 nm.
Tốc độ dòng: 1,2 ml/min.
Thể tích tiêm: 10 µl.
Chương trình dung môi như sau:

| Thời gian (min) | Pha động A (% tt/tt) | Pha động B (% tt/tt) |
|---|---|---|
| 0 - 5 | 95 | 5 |
| 5 - 10 | 95 → 50 | 5 → 50 |
| 10 - 20 | 50 | 50 |
| 20 - 22 | 50 → 95 | 50 → 5 |
| 22 - 30 | 95 | 5 |

Tiến hành sắc ký dung dịch đối chiếu và dung dịch thử. Trong các sắc ký đồ thu được, pic tương ứng với acid acetic có thời gian lưu khoảng 3 min đến 4 min. Đường nền có thể cao dần do hiện tượng rửa giải peptid.
Xác định hàm lượng acid acetic trong peptid dựa vào diện tích pic acid acetic tương ứng trong sắc ký đồ của dung dịch thử và dung dịch đối chiếu.

## 10.19 ĐỐT TRONG OXYGEN

### Thiết bị

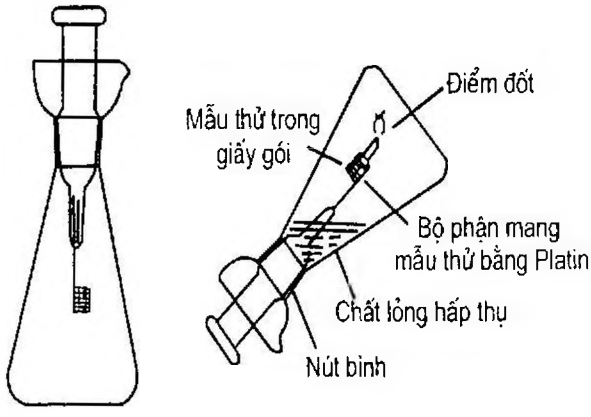
Nếu không có những qui định khác trong chuyên luận riêng, bình đốt là một bình nón bằng thủy tinh borosilicat dung tích ít nhất là 500 ml, nút thủy tinh mài có gắn một bộ phận mang mẫu thích hợp bằng platin hoặc bằng platin - iridi.

### Phương pháp

Nghiền nhỏ mẫu thử. Đặt một lượng mẫu theo qui định vào giữa một mảnh giấy lọc không tro, kích thước 40 mm × 30 mm, có một dải nhỏ kích thước 10 mm × 30 mm. Nếu giấy lọc được qui định tẩm bằng lithi carbonat thì làm ẩm vùng giữa giấy lọc bằng *dung dịch bão hòa lithi carbonat (TT)* rồi sấy khô ở 100 °C đến 105 °C trước khi dùng. Gói mẫu thử vào trong giấy và cài vào bộ phận mang mẫu.
Thêm *nước* hoặc dung dịch hấp thụ như chỉ dẫn vào trong bình. Bơm khí oxygen vào bình qua một ống mà đầu cuối của nó đặt ở phía trên với khoảng cách vừa đủ so với mặt thoáng của chất lỏng hấp thụ. Làm ẩm cổ bình bằng *nước*. Nạp đầy khí oxygen vào bình. Đốt đầu tự do của dải giấy lọc hẹp bằng một dụng cụ thích hợp và cẩn thận đậy ngay nút bình lại. Giữ chắc nút. Khi bắt đầu cháy mạnh, lật ngược bình để tạo ra một lớp ngăn cách bằng nước nhưng cần chú ý ngăn không cho những sản phẩm cháy chưa hoàn toàn rơi xuống chất lỏng. Ngay sau khi đốt cháy xong, lắc bình thật mạnh để hòa tan hoàn toàn những sản phẩm đốt. Làm lạnh. Nếu không có những chỉ dẫn khác, sau khoảng 5 min, cẩn thận tháo nút ra. Rửa nút, dây, lưới platin và thành bình bằng nước rồi tiến hành tiếp như qui định trong chuyên luận riêng.
Đối với mẫu thử là chất lỏng, cho một lượng mẫu thử vào nang làm bằng methylcelulose có cỡ thích hợp đã có chứa sẵn khoảng 15 mg bột giấy lọc không tro. Đậy nắp nang, kẹp đầu cuối của dải giấy lọc hẹp vào giữa 2 phần thân và nắp. Buộc nang vào lưới platin.
Đối với mẫu thử là thuốc mỡ, cần phải bọc trong tờ giấy không thấm mỡ trước khi bọc trong giấy lọc.

### Áp dụng cho những chế phẩm chứa iod

Đốt một lượng qui định mẫu thử bằng phương pháp đã mô tả ở trên, sử dụng chất lỏng hấp thụ là hỗn hợp 10 ml *nước* và 2 ml *dung dịch natri hydroxyd 1 M (TT)*. Khi quá trình đốt đã hoàn thành, thêm vào bình một lượng thừa *dung dịch brom trong acid acetic (TT)* (khoảng 5 ml đến 10 ml) và để yên trong 2 min. Loại brom thừa bằng cách thêm *acid formic (TT)* (0,5 ml đến 1 ml). Rửa thành bình với nước cất. Đuổi hơi brom ở trên lớp chất lỏng bằng một luồng khí động. Thêm 1 g *kali iodid (TT)* và chuẩn độ bằng *dung dịch natri thiosulfat 0,02 N (CĐ)*, dùng chỉ thị là *dung dịch hồ tinh bột (TT)* thêm vào lúc cuối của quá trình chuẩn độ.
1 ml *dung dịch natri thiosulfat 0,02 N (CĐ)* tương đương với 0,4230 mg iod.




*Hình 10.19* - Dụng cụ đốt trong oxygen

## 10.20 XÁC ĐỊNH CÁC CHẤT BẢO QUẢN KHÁNG KHUẨN

Một thành phần quan trọng của các chế phẩm thuốc tiêm đa liều là các chất làm giảm thiểu nguy cơ xâm nhập của vi khuẩn cho phần còn lại sau khi đã dùng một phần chế phẩm. Các chất này thuộc nhóm chất bảo quản kháng khuẩn. Tên và hàm lượng các chất bảo quản phải ghi trên nhãn thuốc. Các phương pháp phân tích sau đây áp dụng

cho một số chất bảo quản thông dụng nhất, nhằm kiểm tra sự có mặt của chất bảo quản với hàm lượng không được vượt quá 20 % lượng ghi trên nhãn.

Nồng độ chất bảo quản kháng khuẩn được thêm vào một thuốc tiêm đa liều hay đơn liều, một chế phẩm thuốc nhỏ tai, nhỏ mũi hay nhỏ mắt có thể bị giảm đi trong thời hạn dùng của sản phẩm. Vì thế, nhà sản xuất cần xác định mức liều thấp nhất còn tác dụng, và công thức sản xuất phải được nghiên cứu sao cho mức liều này vẫn giữ được cao hơn mức tối thiểu trong suốt thời hạn sử dụng. Tại thời điểm sản xuất, sản phẩm cần chứa một lượng chất bảo quản kháng khuẩn được công bố (trong phạm vi ± 20 % dao động cho phép trong sản xuất và kiểm nghiệm). Việc công bố về lượng trên nhãn của chất bảo quản kháng khuẩn không có nghĩa là lượng này được giữ nguyên trong thời hạn sử dụng, mà chỉ là sự khẳng định về hàm lượng được thêm vào nằm trong giới hạn của quy trình sản xuất và không vượt quá 20 %. Cách ghi hàm lượng chất bảo quản sẽ là một trị số tiếp theo là đơn vị đo, ví dụ 0,015 mg/ml hay 0,1 %.

Các chất kháng khuẩn thông dụng nhất là 2 hợp chất cơ kim thủy ngân (phenylmercuric nitrat và thimerosal), 4 ester đồng đẳng của acid p-hydroxybenzoic, phenol, benzyl alcol và clorobutanol. Phương pháp xác định 2 hợp chất cơ kim thủy ngân là phương pháp cực phổ các chất còn lại có thể xác định bằng phương pháp sắc ký khí. Ngoài ra, phương pháp thông dụng hiện nay để xác định các paraben là phương pháp sắc ký lỏng.

**Phương pháp sắc ký khí**

Quy trình chung ghi dưới đây có thể áp dụng để định lượng benzyl alcol, clorobutanol, phenol và các paraben (methyl, ethyl, propyl và butyl ester của acid p-hydroxybenzoic). Đối với các paraben nếu có mặt thì có thể xác định riêng từng chất một. Chuẩn bị *dung dịch chuẩn nội* và *dung dịch chuẩn* cho mỗi chất như chỉ dẫn dưới đây. Trừ khi có chỉ dẫn khác, chuẩn bị *dung dịch thử* từ những lượng đo chính xác dung dịch chuẩn nội và mẫu thử sao cho nồng độ của chất bảo quản cần phân tích và thành phần dung môi gần với nồng độ và thành phần dung môi của dung dịch chuẩn. Các thông số của máy sắc ký khí được khuyến cáo trong Bảng 10.20.1 kèm theo, khí mang có thể là khí heli hoặc nitrogen, detector ion hóa ngọn lửa.

***Benzyl alcol***

*Dung dịch chuẩn nội:* Hòa tan khoảng 380 mg *phenol (TT)* trong 10 ml *methanol (TT)* trong một bình định mức 200 ml. Thêm *nước* đến vạch, lắc đều.

*Dung dịch chuẩn:* Hòa tan khoảng 180 mg chất chuẩn benzyl alcol được cân chính xác, trong 20,0 ml *methanol (TT)* chứa trong một bình định mức 100 ml. Thêm dung dịch chuẩn nội đến vạch, lắc đều.

*Cách tiến hành:* Tiêm riêng biệt các thể tích bằng nhau (khoảng 5 µl) của dung dịch chuẩn và dung dịch thử vào hệ thống sắc ký, ghi lại các sắc đồ với thiết bị sắc ký đã được điều chỉnh theo các thông số ghi trong Bảng 10.20.1. Từ tỷ số diện tích pic benzyl alcol và diện tích pic phenol thu được trên sắc ký đồ của dung dịch thử và dung dịch chuẩn, nồng độ chất đối chiếu benzyl alcol trong dung dịch chuẩn, tính hàm lượng benzyl alcol ($C_7H_8O$) trong chế phẩm.

***Clorobutanol***

*Dung dịch chuẩn nội:* Hòa tan khoảng 140 mg *benzaldehyd (TT)* trong một bình định mức 100 ml. Thêm 10 ml *methanol (TT)*, lắc nhẹ để hòa tan rồi thêm *nước* cho đến vạch, lắc đều.

*Dung dịch chuẩn:* Chuyển khoảng 125 mg chất chuẩn clorobutanol được cân chính xác vào một bình định mức 25 ml. Thêm 2 ml *methanol (TT)*, lắc nhẹ để hòa tan rồi pha loãng với *nước* đến vạch, lắc đều. Lấy 5,0 ml dung dịch thu được và 5,0 ml dung dịch chuẩn nội cho vào một bình định mức 25 ml, lắc đều để thu được dung dịch có nồng độ clorobutanol khoảng 2,5 mg/ml.

*Bảng 10.20.1* - Các thông số của máy sắc ký

| Chất cần phân tích | Kích thước cột (chiều dài × đường kính trong) | Pha tĩnh và chất mang | Tốc độ dòng (ml/min) | Nhiệt độ cột (°C) |
|---|---|---|---|---|
| Benzyl alcol | 1,8 m × 3 mm | 5 % G16/S1A | 50 | 140 |
| Clorobutanol | 1,8 m × 2 mm | 5 % G16/S1A | 20 | 110 |
| Phenol | 1,2 m × 3 mm | 5 % G16/S1A | 50 | 145 |
| Các paraben | 1,8 m × 2 mm | 5 % G2/S1A | 20 | 150 |

*Ghi chú:*

G16: Polyethylen glycol có phân tử lượng khoảng 15000.

G2: Nhựa dimethylpolysiloxan.

S1A: Đất silic loại dùng cho sắc ký khí được nung bằng cách trộn diatomit với natri carbonat và nung ở nhiệt độ trên 900 °C.

*Dung dịch thử:* Pha loãng (nếu cần) một thể tích chính xác chế phẩm thử với *methanol (TT)* để thu được dung dịch chứa không quá khoảng 5,0 mg clorobutanol trong 1 ml. Trộn 3,0 ml dung dịch thu được với 3,0 ml dung dịch chuẩn nội, lắc đều.

*Kiểm tra tính phù hợp của hệ thống:*

Tiêm 1 µl dung dịch chuẩn. Tiến hành sắc ký theo các điều kiện ghi trong Bảng 10.20.1. Đặt nhiệt độ buồng tiêm ở 180 °C và nhiệt độ của detector ở 220 °C. Ghi sắc ký đồ. Thời gian lưu tương đối của pic benzaldehyd là 0,8 và của pic clorobutanol là 1,0; độ phân giải giữa pic benzaldehyd và pic clorobutanol không được nhỏ hơn 2,0; độ lệch chuẩn tương đối của diện tích pic của các lần tiêm lặp lại phải không được lớn hơn 2,0 %.

*Cách tiến hành:* Tiêm riêng biệt các thể tích bằng nhau (khoảng 1 µl) dung dịch chuẩn và dung dịch thử vào máy sắc ký. Từ tỷ số diện tích pic clorobutanol và diện tích pic benzaldehyd thu được trên sắc ký đồ của dung dịch thử và dung dịch chuẩn, nồng độ chất đối chiếu clorobutanol trong dung dịch chuẩn, tính hàm lượng clorobutanol ($C_4H_7Cl_3O$) trong chế phẩm.

***Phenol***

*Dung dịch chuẩn nội:* Hút 1,0 ml benzyl alcol chuẩn cho vào một bình định mức 500 ml, thêm *methanol (TT)* đến vạch, lắc đều.

*Dung dịch chuẩn:* Hòa tan khoảng 75 mg chất chuẩn phenol được cân chính xác, trong 7,5 ml *methanol (TT)* chứa trong một bình định mức 100 ml. Thêm 20,0 ml dung dịch chuẩn nội rồi thêm *nước* đến vạch, lắc đều.

*Cách tiến hành:* Tiêm riêng biệt các thể tích bằng nhau (khoảng 3 µl) dung dịch chuẩn và dung dịch thử vào hệ thống sắc ký, ghi lại các sắc đồ trên hệ thống sắc ký đã được điều chỉnh các thông số theo Bảng 10.20.1. Từ tỷ số diện tích pic phenol và diện tích pic benzyl alcol thu được trên sắc ký đồ của dung dịch thử và dung dịch chuẩn, nồng độ chất đối chiếu phenol trong dung dịch chuẩn, tính hàm lượng phenol ($C_6H_6O$) trong chế phẩm.

***Methylparaben và propylparaben***

*Dung dịch chuẩn nội:* Cho khoảng 200 mg *benzophenon (TT)* vào một bình định mức 250 ml, pha loãng bằng *diethylether (TT)* đến vạch, lắc đều.

*Dung dịch chuẩn:* Cân chính xác khoảng 100 mg methylparaben chuẩn và 10 mg propylparaben chuẩn vào một bình định mức 200 ml. Pha loãng bằng dung dịch chuẩn nội đến vạch, lắc đều. Hút 10,0 ml dung dịch thu được cho vào một bình nón cỡ 25 ml rồi tiến hành như chỉ dẫn ở mục Dung dịch thử bắt đầu từ "Thêm 3 ml *pyridin (TT)*...".

*Dung dịch thử:* Hút 10,0 ml mẫu thử và 10,0 ml dung dịch chuẩn nội cho vào một bình gạn nhỏ. Lắc mạnh, để cho phân lớp, rút lớp nước vào một bình gạn khác và chuyển lớp ether vào một bình thủy tinh nhỏ qua một phễu lọc có *natri sulfat khan (TT)*. Chiết lớp nước 2 lần, mỗi lần với 10 ml *diethylether (TT)* và lọc dịch chiết qua phễu có *natri sulfat khan (TT)*. Làm bay hơi dịch chiết ether dưới một luồng không khí khô cho đến khi còn khoảng 10 ml thì chuyển sang một bình nón 25 ml. Thêm 3 ml *pyridin (TT)* rồi làm bay hơi ether hoàn toàn và đun sôi trên bếp nóng cho đến khi còn khoảng 1 ml. Làm nguội, thêm 1 ml thuốc thử silan hóa thích hợp như bis(trimethylsilyl)- trifluoroacetamid, bis(trimethylsilyl) acetamid, hoặc hỗn hợp của hexamethyldisilazan và trimethylclorosilan (tỷ lệ 2:1 hoặc 3:1 theo thể tích). Trộn đều rồi để yên ít nhất 15 min.

*Cách tiến hành:* Tiêm riêng biệt các thể tích bằng nhau (2 µl) dung dịch đã được silan hóa của dung dịch chuẩn và của dung dịch thử vào hệ thống sắc ký, ghi lại các sắc đồ trên hệ thống thiết bị đã được điều chỉnh theo các thông số ghi trong Bảng 10.20.1.

Từ tỷ số diện tích pic methylparaben và diện tích pic benzophenon thu được trên sắc ký đồ của dung dịch thử và dung dịch chuẩn, nồng độ chất đối chiếu methylparaben trong dung dịch chuẩn, tính hàm lượng methylparaben ($C_8H_8O_3$) trong chế phẩm.

Cũng theo cách tương tự, từ tỷ số diện tích pic propylparaben và diện tích pic benzophenon thu được trên sắc ký đồ của dung dịch thử và dung dịch chuẩn, nồng độ chất đối chiếu propylparaben trong dung dịch chuẩn, tính hàm lượng của propylparaben ($C_{10}H_8O_3$) trong chế phẩm. Ethylparaben và butylparaben cũng có thể được định lượng bằng cách tương tự như trên.

**Phương pháp sắc ký khí sử dụng cột mao quản**

Ngoài phương pháp sắc ký khí sử dụng cột nhồi như trên, các chất benzyl alcol, clorobutanol, phenol có thể được xác định bằng phương pháp sắc ký khí sử dụng cột mao quản với các điều kiện sắc ký như sau: Cột DB1 (30 m × 0,25 mm × 0,25 µm), pha tĩnh 100 % dimethylpolysiloxan, tốc độ dòng 1,2 ml/min, nhiệt độ cột là 320 °C.

**Phương pháp sắc ký lỏng xác định methylparaben và propylparaben**

*Pha động: Nước - acetonitril* (50 : 50), điều chỉnh tỷ lệ nếu cần.

*Dung dịch thử:* Pha loãng chính xác một thể tích dung dịch chế phẩm có chứa khoảng 0,5 mg methylparaben hoặc 0,2 mg propylparaben tới vừa đủ 20,0 ml bằng pha động. Lắc đều, lọc.

*Dung dịch chuẩn:* Cân chính xác một lượng methylparaben chuẩn và propylparaben chuẩn, hoà tan trong pha động để thu được dung dịch có nồng độ methylparaben khoảng 0,025 mg/ml và nồng độ propylparaben khoảng 0,010 mg/ml.

*Điều kiện sắc ký:*

Cột kích thước (15 cm × 4,6 mm) được nhồi pha tĩnh C (5 µm).

Detector quang phổ hấp thụ tử ngoại đặt ở bước sóng 256 nm.

Thể tích tiêm: 20 µl.

Tốc độ dòng: 1 ml/min.

*Cách tiến hành:*

Kiểm tra tính phù hợp của hệ thống sắc ký: Tiến hành sắc ký đối với dung dịch chuẩn, trên sắc ký đồ, thứ tự

rửa giải lần lượt là methylparaben và propylparaben. Độ lệch chuẩn tương đối của thời gian lưu và diện tích pic methylparaben và propylparaben trong 6 lần tiêm lặp lại không được lớn hơn 2,0 %; hệ số đối xứng của các pic nhỏ hơn 2; hệ số phân giải giữa các pic lớn hơn 2,5.
Tiến hành sắc ký với dung dịch chuẩn và dung dịch thử. Tính hàm lượng của methylparaben, $C_8H_8O_3$ và propylparaben, $C_{10}H_{12}O_3$ trong chế phẩm dựa vào diện tích pic trên sắc ký đồ của dung dịch chuẩn và dung dịch thử, hàm lượng $C_8H_8O_3$ và $C_{10}H_{12}O_3$ trong methylparaben và propylparaben chuẩn.

**Phương pháp cực phổ**

***Phenylmercuric nitrat***

*Dung dịch thử:* Hút 10,0 ml mẫu thử cho vào một bình định mức 25 ml, thêm 2 ml *dung dịch kali nitrat 1 % (TT)* và 10 ml *dung dịch đệm borat kiềm pH 9,2 (TT)*, điều chỉnh đến pH 9,2 nếu cần bằng cách thêm *acid nitric 2 M (TT)*. Thêm 1,5 ml *dung dịch gelatin 0,1 % (TT)* mới pha, thêm *dung dịch đệm borat kiềm pH 9,2 (TT)* đến vạch, trộn đều.
*Dung dịch chuẩn:* Hòa tan khoảng 100 mg phenylmercuric nitrat chuẩn được cân chính xác trong *dung dịch natri hydroxyd 0,4 % (TT)* chứa trong một bình định mức 1000 ml, làm ấm nếu cần để dễ hòa tan. Thêm *dung dịch natri hydroxyd 0,4 % (TT)* đến vạch, lắc đều. Hút 10,0 ml dung dịch thu được cho vào một bình định mức 25 ml rồi tiến hành như chỉ dẫn ở mục Dung dịch thử bắt đầu từ "Thêm 2 ml *dung dịch kali nitrat 1 %....*".
*Cách tiến hành:* Hút một phần dung dịch thử cho vào bình cực phổ, đuổi không khí trong dung dịch bằng dòng khí nitrogen thổi qua trong 15 min. Đặt điện cực giọt thủy ngân của máy cực phổ thích hợp và ghi lại cực phổ đồ trong khoảng điện thế từ -0,6 V đến -1,5 V so với điện cực calomel bão hòa. Xác định cường độ dòng khuếch tán của dung dịch thử, $(i_d)_U$, là hiệu số giữa cường độ dòng tổn dư và cường độ dòng giới hạn. Theo cách tương tự, xác định đồng thời cường độ dòng khuếch tán, $(i_d)_S$, của dung dịch chuẩn. Tính hàm lượng của phenylmercuric nitrat ($C_6H_5HgNO_3$) trong mẫu thử tính bằng µg/ml theo công thức sau:

$$2,5 \times C \times \frac{(i_d)_U}{(i_d)_S}$$

Trong đó:
C là nồng độ (µg/ml) của phenylmercuric nitrat trong dung dịch chuẩn.

***Thimerosal***

*Dung dịch chuẩn:* Vào ngày sử dụng, cân chính xác khoảng 25 mg thimerosal chuẩn, chuyển vào bình định mức 250 ml, thêm nước cất đến vạch, lắc đều. Tiến hành trong điều kiện tránh ánh sáng. Hút 15,0 ml dung dịch thu được cho vào một bình định mức 25 ml, thêm 1,5 ml *dung dịch gelatin 0,1 % (TT)* rồi thêm *dung dịch kali nitrat 1 % (TT)* đến vạch, lắc đều.
*Dung dịch thử:* Hút 15,0 ml mẫu thử cho vào một bình định mức 25 ml, thêm 1,5 ml *dung dịch gelatin 0,1 % (TT)* rồi thêm *dung dịch kali nitrat 1 % (TT)* đến vạch, lắc đều.
*Cách tiến hành:* Hút một phần dung dịch thử cho vào bình cực phổ, đuổi không khí bằng cách sục dòng khí nitrogen qua dung dịch đo trong 15 min. Đặt điện cực giọt thủy ngân của máy cực phổ thích hợp và ghi lại cực phổ đồ trong khoảng điện thế từ -0,2 V đến -1,4 V so sánh với điện cực calomel bão hòa. Xác định cường độ dòng khuếch tán của dung dịch thử, $(i_d)_U$, là hiệu số giữa cường độ dòng tổn dư và cường độ dòng giới hạn. Theo cách tương tự, xác định đồng thời cường độ dòng khuếch tán, $(i_d)_S$, của dung dịch chuẩn. Tính hàm lượng (µg/ml) của thimerosal ($C_6H_9HgNaO_2S$) trong mẫu thử theo công thức sau:

$$1,667 \times C \times \frac{(i_d)_U}{(i_d)_S}$$

Trong đó:
C là nồng độ (µg/ml) của thimerosal trong dung dịch chuẩn.

## 10.21 ĐỊNH LƯỢNG ACID OMEGA-3 TRONG DẦU CÁ

Dầu cá là sản phẩm có nguồn gốc từ các loài cá thuộc họ Cá trồng (*Engraulidae*), Cá khế (*Carangidae*), Cá trích (*Clupeidae*), Cá ốt me (*Osmeridae*), *Cá Hồi (Salmonidae)*, Cá ngừ (*Scombridae*). Dầu cá có chứa acid omega-3. Acid omega-3 bao gồm acid *alpha*-linolenic (C18:3 n-3), acid moroctic (C18:4 n-3), acid eicosatetraenoic (C20:4 n-3), acid timnodonic (eicosapentaenoic) (C20:5 n-3; EPA), acid heneicosapentaenoic (C21:5 n-3), acid clupanodonic (C22:5 n-3) và acid cervonic (docosahexaenoic) (C22:6 n-3; DHA).

**EPA và DHA**

Phương pháp sắc ký khí (Phụ lục 5.2).
*Quá trình xử lý mẫu cần được tiến hành nhanh, tránh tiếp xúc với ánh sáng, các tác nhân oxy hóa, chất xúc tác quá trình oxy hóa (ví dụ: đồng, sắt) và không khí.*
Phương pháp được áp dụng để phân tích dạng methyl hoặc ethyl ester của acid (all-*Z*)-eicosa-5,8,11,14,17-pentaenoic (EPA; 20:5 n-3) và acid (all-*Z*)-docosa-4,7,10,13,16,19-hexaenoic (DHA; 22:6 n-3).

***Chuẩn nội:*** *Methyl tricosanoat (TT).*

***Dung dịch thử (a)***

A. Áp dụng với chế phẩm chứa acid omega-3 ở dạng ethyl ester: Hòa tan một lượng chế phẩm tương ứng trong Bảng 1 và khoảng 70,0 mg chuẩn nội bằng dung dịch *butylhydroxytoluen (TT)* 0,005 % trong *trimethylpentan (TT)* và pha loãng thành 10,0 ml với cùng dung môi. Có thể đun nóng nhẹ (tới 60 °C) để hòa tan chuẩn nội.

*Bảng 1* - Khối lượng mẫu chế phẩm dùng thử nghiệm

| Tổng hàm lượng EPA và DHA (%) | Khối lượng mẫu chế phẩm dùng thử nghiệm (g) |
|---|---|
| 30 - 50 | 0,4 - 0,5 |
| 50 - 70 | 0,3 |
| 70 - 90 | 0,25 |

B. Áp dụng với chế phẩm chứa acid omega-3 ở dạng triglycerid: Lấy 2,0 ml dung dịch thu được ở phép thử A vào ống thủy tinh thạch anh có nắp xoáy dung tích thích hợp, bay hơi dung môi đến khô dưới dòng khí *nitrogen (TT)*. Thêm 1,5 ml *dung dịch natri hydroxyd (TT) 2 % trong methanol (TT)*, thổi khí nitrogen, nắp kín bằng nắp đậy có có bao lớp polytetrafluoroethylen, lắc đều. Đun trên cách thủy trong 7 min, để nguội. Thêm 2 ml *dung dịch boron triclorid trong methanol (TT)*, thổi khí *nitrogen (TT)*, nắp kín, lắc nhẹ. Đun trên cách thủy trong 30 min. Để nguội tới 40 - 50°C, thêm 1 ml *trimethylpentan (TT)*, nắp kín, lắc mạnh ít nhất 30 s. Ngay lập tức, thêm 5 ml *dung dịch natri clorid bão hòa (TT)*, thổi khí *nitrogen (TT)*, nắp kín, lắc kỹ trong ít nhất 15 s, ly tâm 3000 r/min trong 5 min, hoặc để tách lớp. Chuyển lớp trimethylpentan (lớp trên) sang lọ thủy tinh khác, phần còn lại (lớp dưới) được chiết với 1 ml *trimethylpentan (TT)* thêm một lần nữa. Gộp các dịch chiết trimethylpentan. Rửa dịch chiết trimethylpentan với nước hai lần, mỗi lần 1 ml, sau đó làm khô dịch chiết trimethylpentan bằng *natri sulfat khan (TT)* được dung dịch tiêm sắc ký. Chuẩn bị 3 dung dịch thử.

***Dung dịch thử (b):*** Hòa tan 0,300 g chế phẩm bằng dung dịch *butylhydroxytoluen* (TT) 0,005 % trong *trimethylpentan* (TT) và pha loãng thành 10,0 ml bằng cùng dung môi. Tiếp tục các bước tương tự như chuẩn bị dung dịch thử (a).

***Dung dịch đối chiếu ($a_1$):*** Hòa tan khoảng 70,0 mg chuẩn nội và 90,0 mg acid eicosapentaenoic ethyl ester chuẩn trong dung dịch *butylhydroxytoluen (TT)* 0,005 % *trong trimethylpentan (TT)*, pha loãng thành 10,0 ml bằng cùng dung môi. Có thể đun nóng nhẹ (tới 60 °C) để hòa tan chuẩn nội.

***Dung dịch đối chiếu ($a_2$):*** Hòa tan khoảng 60,0 mg acid docosahexaenoic ethyl ester chuẩn và 70,0 mg chuẩn nội trong dung dịch *butylhydroxytoluen (TT)* 0,005 % trong *trimethylpentan (TT)*, pha loãng thành 10,0 ml bằng cùng dung môi. Có thể đun nóng nhẹ (tới 60 °C) để hòa tan chuẩn nội.

Chuẩn bị dung dịch đối chiếu ($a_1$) và ($a_2$) theo các bước như mô tả tại mục A của phần Dung dịch thử (a) nếu kiểm tra chế phẩm chứa acid omega-3 ở dạng ethyl este; tiếp tục theo các bước mô tả tại mục B của phần Dung dịch thử (a) nếu chế phẩm chứa acid omega-3 ở dạng triglycerid. Chuẩn bị 3 dung dịch đối chiếu đối với mỗi mẫu chế phẩm cần kiểm tra.

***Dung dịch đối chiếu (b):*** Hòa tan 0,3 g *methyl palmitat (TT)*, 0,3 g *methyl stearat (TT)*, 0,3 g *methyl arachidat (TT)* and 0,3 g *methyl behenat (TT)* trong dung dịch *butylhydroxytoluen (TT)* 0,005 % trong *trimethylpentan (TT)*, pha loãng thành 10,0 ml bằng cùng dung môi.

***Dung dịch đối chiếu (c):*** Hòa tan khoảng 55,0 mg *acid docosahexaenoic methyl ester (TT)* và khoảng 5,0 mg *acid tetracos-15-enoic methyl ester (TT)* trong dung dịch *butylhydroxytoluen (TT)* 0,005 % trong *trimethylpentan (TT)*, pha loãng thành 10,0 ml bằng cùng dung môi.

***Điều kiện sắc ký***

Cột mao quản bằng silica nung chảy, chiều dài ít nhất 25 m, đường kính 0,25 mm, được phủ lớp phim macrogol 20000 dày 0,2 µm.

Khí mang: *Hydrogen (TT)* hoặc *heli* dùng cho *sắc ký khí (TT)*.

Tốc độ dòng: 1,0 ml/min.

Detector ion hóa ngọn lửa

Thể tích tiêm: 1 µl, tiêm 2 lần.

Tỷ lệ chia dòng 1: 200. Nếu hệ thống sắc ký sử dụng chế độ không chia dòng, các dung dịch thử và đối chiếu phải được pha loãng 200 lần bằng dung dịch *butylhydroxytoluen (TT)* 0,005 % trong *trimethylpentan (TT)* trước khi tiêm sắc ký.

Chương trình nhiệt độ:

| | Thời gian (min) | Nhiệt độ (°C) |
|---|---|---|
| Cột | 0 - 2 | 170 |
| | 2 - 25,7 | 170 → 240 |
| | 25,7 - 28 | 240 |
| Buồng tiêm | | 250 |
| Detector | | 270 |

Tính phù hợp hệ thống:

Trên sắc ký đồ thu được của dung dịch đối chiếu (b), phần trăm diện tích của các pic tăng dần tương ứng với các chất sau: methyl palmitat, methyl stearat, methyl arachidat, methyl behenat. Phần trăm diện tích của pic methyl palmitat và pic methyl behenat khác nhau không quá 2,0 %.

Độ phân giải: Trên sắc ký đồ thu được của dung dịch đối chiếu (c), độ phân giải giữa pic của acid docosahexaenoat methyl ester và acid tetracos-15-enoic methyl ester không nhỏ hơn 1,2.

Trên sắc ký đồ của dung dịch thử (a), pic của methyl tricosanoat và bất kỳ pic của acid henicosapentaenoic methyl ester hoặc ethyl ester (C21:5) khi so sánh với sắc ký đồ của dung dịch thử (b) phải cho thấy sự tách biệt rõ (nếu không phải dùng hệ số hiệu chỉnh).

Tính hàm lượng phần trăm của EPA và DHA theo công thức sau:

$$A_x \times \frac{A_{x,3}}{m_{x,3}} \times \frac{m_1}{A_1} \times \frac{m_{x,r}}{A_{x,r}} \times \frac{1}{m_2} \times C \times 100$$

Trong đó:
$m_1$ là khối lượng chuẩn nội trong dung dịch thử (a), tính bằng mg;
$m_2$ là khối lượng chế phẩm trong dung dịch thử (a), tính bằng mg;
$m_{x,3}$ là khối lượng chuẩn nội trong dung dịch đối chiếu ($a_1$) (định lượng EPA) hoặc trong dung dịch đối chiếu ($a_2$) (định lượng DHA), tính bằng mg;
$m_{x,r}$ là khối lượng acid eicosapentaenoic ethyl ester chuẩn trong dung dịch đối chiếu ($a_1$) hoặc acid docosahexaenoic ethyl ester chuẩn trong dung dịch đối chiếu ($a_2$), tính bằng mg;
$A_x$ là diện tích pic của acid eicosapentaenoic ester hoặc acid docosahexaenoic ester trong sắc ký đồ của dung dịch thử (a);
$A_{x,r}$ là diện tích pic của acid eicosapentaenoic ester trong sắc ký đồ của dung dịch đối chiếu ($a_1$) hoặc acid docosahexaenoic ester trong sắc ký đồ của dung dịch đối chiếu ($a_2$);
$A_1$ là diện tích pic chuẩn nội trong sắc ký đồ của dung dịch thử (a);
$A_{x,3}$ là diện tích pic chuẩn nội trong sắc ký đồ dung của dịch đối chiếu ($a_1$) (định lượng EPA) hoặc trong sắc ký đồ của dung dịch đối chiếu ($a_2$) (định lượng DHA);
C là hệ số chuyển đổi giữa dạng ethyl ester và dạng triglycerid: C = 1,00 đối với ethyl ester; C = 0,954 đối với EPA; C = 0,957 đối với DHA.

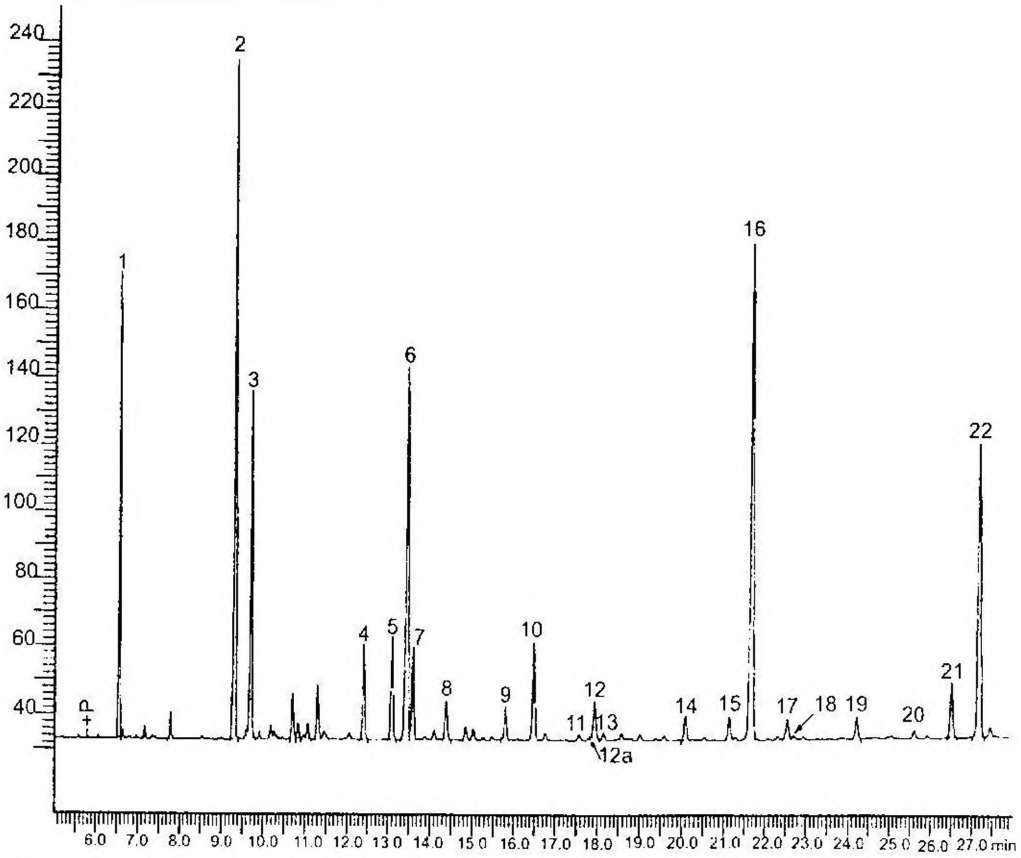
**Acid omega-3 toàn phần**

Xem sắc ký đồ của acid omega-3 toàn phần trong dầu cá trong Hình 10.21.

Từ kết quả định lượng EPA và DHA, tính hàm lượng phần trăm của acid omega-3 toàn phần theo công thức sau:

$$EPA+DHA+\frac{A_{n-3}(EPA+DHA)}{A_{EPA}+A_{DHA}}$$

Trong đó:
EPA là hàm lượng phần trăm của EPA;
DHA là hàm lượng phần trăm của DHA;
$A_{n-3}$ tổng diện tích của các pic C18:3 n-3, C18:4 n-3, C20:4 n-3, C21:5 n-3 and C22:5 n-3 ester trong sắc ký đồ của dung dịch thử (b);
$A_{EPA}$ là diện tích pic của EPA ester trong sắc ký đồ của dung dịch thử (b);
$A_{DHA}$ là diện tích pic của DHA ester trong sắc ký đồ của dung dịch thử (b).




| | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1. C14:0 | 4. C16:4 n-1 | 7. C18:1 n-7 | 10. C18:4 n-3 | 12a. C20:1 n-11 | 15. C20:4 n-3 | 18. C22:1 n-9 | 21. C22:5 n-3 |
| 2. C16:0 | 5. C18:0 | 8. C18:2 n-6 | 11. C20:0 | 13. C20:1 n-7 | 16. C20:5 n-3 | 19. C21:5 n-3 | 22. C22:6 n-3 |
| 3. C16:1 n-7 | 6. C18:1 n-9 | 9. C18:3 n-3 | 12. C20:1 n-9 | 14. C20:4 n-6 | 17. C22:1 n-11 | 20. C22:5 n-6 | |

*Hình 10.21* - Sắc ký đồ định lượng acid omega-3 toàn phần trong dầu cá

## 10.22 ĐỊNH LƯỢNG VITAMIN D

Hoạt lực của vitamin D được tính theo đơn vị quốc tế (ký hiệu IU). 1 IU vitamin D tương đương với 0,025 µg ergocalciferol hoặc cholecalciferol.

Quy trình định lượng vitamin D cần được tiến hành nhanh, hạn chế tối đa tiếp xúc với không khí và ánh sáng, tốt hơn hết là sử dụng sự che phủ của khí trơ và thủy tinh màu.

### Phương pháp 1: *Phương pháp sắc ký lỏng*

Quy trình sắc ký lỏng sau đây được áp dụng cho định lượng vitamin D dưới dạng ergocalciferol hoặc cholecalciferol trong các chế phẩm thuốc đa vitamin.

#### *Hóa chất và thuốc thử đặc biệt*

*Ether ($TT_1$): Ether (TT)* được sử dụng trong vòng 24 h sau khi mở lọ.

*Hexan khan ($TT_1$):* Được điều chế bằng sắc ký cột hấp phụ. Chuẩn bị cột sắc ký (60 cm × 8 cm) nhồi 500 g *đất silic dùng cho sắc ký (50 - 250 µm) (TT)* đã được hoạt hóa bằng cách sấy ở 150 °C trong 4 h. Cho 500 ml *hexan (TT)* qua cột và hứng dịch rửa giải vào bình nón nút mài.

*Dung dịch butyl hydroxytoluen (TT):* Hòa tan 1,0 g *butyl hydroxytoluen (TT)* trong *ether dầu hỏa tinh khiết sắc ký (TT)* vừa đủ 100 ml.

*Dung dịch kali hydroxyd ($TT_1$):* Hòa tan 50,0 g *kali hydroxyd (TT)* trong 50,0 ml *nước* vừa đun sôi, lắc đều và để nguội. Pha mới dung dịch hàng ngày.

*Dung dịch kali hydroxyd trong ethanol 96 % ($TT_1$):* Hòa tan 3 g *kali hydroxyd (TT)* trong 50 ml *nước* vừa đun sôi, thêm 10 ml *ethanol 96 % (TT)*, pha loãng thành 100 ml với nước vừa mới đun sôi, lắc đều và để nguội. Pha mới dung dịch hàng ngày.

*Dung dịch natri ascorbat (TT):* Hòa tan 3,5 g *acid ascorbic (TT)* trong 20 ml *dung dịch natri hydroxyd 1 N (TT)*. Pha mới dung dịch hàng ngày.

*Dung dịch natri sulfid ($TT_1$):* Hòa tan 12 g *natri sulfid (TT)* trong 20 ml *nước*, pha loãng thành 100 ml bằng *glycerin (TT)* và lắc đều.

#### *Phương pháp sắc ký lỏng (Phụ lục 5.3).*

*Pha động:*

Pha động A: Hỗn hợp *acetonitril - methanol - nước* (25 : 25 : 1). Lượng nước và tốc độ dòng có thể thay đổi để đáp ứng yêu cầu của độ thích hợp hệ thống.

Pha động B: Hỗn hợp *alcol n-amylic - hexan khan* (3 : 997). Tỷ lệ các thành phần và tốc độ dòng có thể thay đổi để đáp ứng yêu cầu của độ thích hợp hệ thống.

*Dung dịch chuẩn nội:* Cân chính xác 15 mg $\Delta^{4,6}$-cholestadienol chuẩn vào bình định mức dung tích 200 ml, thêm hỗn hợp *toluen - pha động B* (10 : 90) đến vạch và lắc đều.

*Dung dịch chuẩn*: Cân chính xác khoảng 25 mg ergocalciferol chuẩn hoặc cholecalciferol chuẩn vào bình định mức dung tích 50 ml, hòa tan không làm nóng trong *toluen (TT)*, pha loãng đến vạch với cùng dung môi và lắc đều. Lấy 10 ml dung dịch chuẩn gốc vào bình định mức dung tích 100 ml, pha loãng đến vạch với *toluen (TT)* và lắc đều. Pha mới dung dịch chuẩn gốc hàng ngày.

*Dung dịch thử:*

*Đối với dung dịch dầu:* Cân chính xác một lượng chế phẩm (không ít hơn 0,5 g) tương ứng với khoảng 125 µg (5000 IU) cholecalciferol hoặc ergocalciferol. Thêm 1 ml *dung dịch natri ascorbat (TT)*, 25 ml *ethanol 96 % (TT)* và 2 ml *dung dịch kali hydroxyd ($TT_1$)* và lắc đều.

*Đối với viên nang và viên nén:* Đun hồi lưu trên cách thủy không ít hơn 10 viên nang hoặc viên nén với hỗn hợp gồm 10ml *dung dịch natri ascorbat (TT)* và 2 giọt *dung dịch natri sulfid ($TT_1$)* trong 10 min, nghiền những mẩu rắn còn lại bằng đũa thủy tinh đầu tù và tiếp tục đun nóng trong 5 min. Làm mát, thêm 25 ml *ethanol 96 % (TT)*, 3 ml *dung dịch kali hydroxyd ($TT_1$)* và lắc đều.

*Đối với chế phẩm khô và chế phẩm phân tán trong nước:* Cân chính xác một lượng chế phẩm (không quá 0,5 g) tương ứng với khoảng 125 µg (5000 IU) cholecalciferol hoặc ergocalciferol. Thêm từng lượng nhỏ kèm theo lắc tròn nhẹ nhàng 25 ml *ethanol 96 % (TT)*, 5 ml *dung dịch natri ascorbat (TT)* và 3 ml *dung dịch kali hydroxyd ($TT_1$)*.

*Tiến hành xà phòng hóa và chiết:* Đun hồi lưu hỗn hợp được chuẩn bị từ chế phẩm trên cách thủy trong 30 min. Làm lạnh nhanh dưới vòi nước và chuyển hỗn hợp đã được xà phòng hóa vào bình gạn, tráng bình nón dùng để xà phòng hóa lần lượt với: 2 lần, mỗi lần 15 ml *nước*; 10 ml *ethanol 96 % (TT)*; 2 lần, mỗi lần 50 ml *ether ($TT_1$)*. Chuyển toàn bộ dịch rửa vào bình gạn trên và lắc mạnh trong 30 s, để yên tới khi cả hai lớp trong. Chuyển lớp nước vào bình gạn thứ hai, thêm hỗn hợp 10 ml *ethanol 96 % (TT)* và 50 ml *ether dầu hỏa (TT)* và lắc mạnh. Để tách lớp và chuyển lớp nước vào bình gạn thứ ba, chuyển lớp ether dầu hỏa vào bình gạn thứ nhất, tráng bình gạn thứ hai bằng *ether dầu hỏa (TT)* 2 lần, mỗi lần 10 ml, chuyển dịch rửa vào bình gạn thứ nhất. Lắc lớp nước ở bình gạn thứ ba với 50 ml *ether dầu hỏa (TT)* và chuyển lớp ether dầu hỏa vào bình gạn thứ nhất. Rửa toàn bộ dịch chiết ether - ether dầu hỏa với *dung dịch kali hydroxyd trong ethanol 96 % ($TT_1$)* 3 lần, mỗi lần 50 ml và tiếp tục rửa bằng lắc mạnh với *nước* mỗi lần 50 ml tới khi nước rửa trung tính với *phenolphthalein (TT)*. Làm kiệt những giọt nước còn lại của dịch chiết ether - ether dầu hỏa, thêm 2 miếng giấy lọc đường kính 9 cm, cắt thành dải vào bình gạn và lắc. Chuyển dịch chiết ether - ether dầu hỏa vào bình cầu đáy tròn, rửa bình gạn và giấy lọc bằng *ether dầu hỏa (TT)*. Gộp dịch rửa ether dầu hỏa với dịch chiết ether - ether dầu hỏa, thêm 5,0 ml dung dịch chuẩn nội và 100 µl *dung dịch butyl hydroxytoluen (TT)* và lắc đều. Bốc hơi đến khô bằng cất quay chân không ở nhiệt độ không quá 40 °C. Làm mát dưới vòi nước và đưa nitrogen vào đủ để phục hồi áp suất không khí. Hòa tan ngay cặn trong 5 ml hỗn hợp *methanol - acetonitril* (1 : 1) hoặc trong một thể tích chính xác của hỗn hợp *methanol - acetonitril* (1 : 1) để thu được dung dịch thử có nồng độ vitamin D là 25 µg/ml.

*Điều kiện sắc ký:*
Cột làm sạch: Cột kích thước (30 cm × 4,6 mm) được nhồi pha tĩnh B (5 µm hoặc 10 µm) sử dụng pha động A.
Cột phân tích: Cột kích thước (25 cm × 4,6 mm) được nhồi pha tĩnh A (5 µm hoặc 10 µm) sử dụng pha động B.
Tốc độ dòng: 1 ml/min.
Detector quang phổ tử ngoại đặt ở bước sóng 254 nm.

***Cách tiến hành:***
*Kiểm tra tính phù hợp của hệ thống đối với cột làm sạch:* Lấy chính xác 5,0 ml dung dịch chuẩn vào bình cầu đáy tròn nối với ống sinh hàn hồi lưu, thêm 2 hoặc 3 tinh thể *butyl hydroxytoluen (TT)*. Thay thế không khí bằng nitrogen, đun nóng trong cách thủy duy trì ở nhiệt độ 90 °C trong ánh sáng dịu dưới khí nitrogen trong 45 min để thu được dung dịch có chứa vitamin D và tiền vitamin D. Làm lạnh và thêm 10,0 ml dung dịch chuẩn nội, lắc đều và bốc hơi bằng cất quay chân không ở nhiệt độ không quá 40 °C. Làm lạnh dưới vòi nước và đưa nitrogen vào đủ để phục hồi áp suất không khí. Hòa tan ngay cặn trong 10 ml hỗn hợp *methanol - acetonitril* (1 : 1) và lắc đều.
Tiêm 500 µl dung dịch này vào cột làm sạch. Sắc ký đồ có một pic có thời gian lưu khoảng 5 min đến 9 min tương ứng với pic của hỗn hợp gồm vitamin D, tiền vitamin D và $\Delta^{4,6}$-cholestadienol được tách khỏi các chất khác. Điều chỉnh tỉ lệ nước hoặc tốc độ dòng nếu cần (xem pha động A).
*Kiểm tra tính phù hợp của hệ thống đối với cột phân tích:* Cân khoảng 100 mg *chất chuẩn thử độ thích hợp hệ thống của định lượng vitamin D* vào bình định mức dung tích 100 ml, hòa tan và pha loãng đến vạch bằng hỗn hợp *toluen - pha động B* (5 : 95) và lắc đều. Đun hồi lưu một phần dung dịch này ở 90 °C trong 45 min và làm lạnh, thu được dung dịch thử độ thích hợp hệ thống của cột phân tích.
Tiêm dung dịch thử độ thích hợp hệ thống của cột phân tích 5 lần: Thời gian lưu tương đối là khoảng 0,4 với pre-cholecalciferol, 0,5 với trans-cholecalciferol và 1,0 với cholecalciferol. Độ phân giải giữa pic trans-cholecalciferol và pre-cholecalciferol không nhỏ hơn 1,0 và độ lệch chuẩn tương đối của đáp ứng pic cholecalciferol không quá 2,0 %.
*Hiệu chuẩn hệ số đáp ứng của vitamin D:* Lấy chính xác 4,0 ml dung dịch chuẩn và 10,0 ml dung dịch chuẩn nội vào bình định mức dung tích 100 ml, pha loãng đến vạch với pha động B và lắc đều để thu được dung dịch chuẩn làm việc. Bảo quản dung dịch chuẩn làm việc ở nhiệt độ không quá 0 °C (giữ phần chưa dùng cho tiến hành định lượng).
Tiêm 200 µl dung dịch chuẩn làm việc vào cột phân tích và đo đáp ứng pic của vitamin D và $\Delta^{4,6}$-cholestadienol. Thời gian lưu tương đối của $\Delta^{4,6}$-cholestadienol là khoảng 1,3. Tính toán hệ số đáp ứng, $F_D$, bằng công thức sau:

$$F_D = \frac{C_S}{R_S \times C_R}$$

Trong đó:
$C_S$ và $C_R$ là nồng độ tương ứng của vitamin D và $\Delta^{4,6}$-cholestadienol trong dung dịch chuẩn làm việc (µg/ml).
$R_S$ là tỉ số đáp ứng pic của vitamin D đối với $\Delta^{4,6}$-cholestadienol.
*Hiệu chuẩn hệ số đáp ứng của tiền vitamin D:* Lấy chính xác 4 ml dung dịch chuẩn vào bình cầu đáy tròn nối với ống sinh hàn hồi lưu, thêm 2 hoặc 3 tinh thể *butyl hydroxytoluen (TT)*. Thay thế không khí bằng nitrogen, đun nóng trong cách thủy duy trì ở nhiệt 90 °C trong ánh sáng dịu và dưới khí nitrogen trong 45 min để thu được dung dịch có chứa vitamin D và tiền vitamin D. Làm mát và sử dụng pha động B để chuyển toàn bộ dung dịch trên vào bình định mức dung tích 100 ml có chứa 10,0 ml dung dịch chuẩn nội, pha loãng đến vạch với pha động B và lắc đều, thu được dung dịch hỗn hợp làm việc.
Tiêm 200 µl dung dịch hỗn hợp làm việc vào cột phân tích và đo đáp ứng pic của vitamin D, tiền vitamin D và $\Delta^{4,6}$-cholestadienol. Tính toán nồng độ $C'_S$ (µg/ml) của vitamin D trong dung dịch hỗn hợp làm việc (đã đun nóng) bằng công thức:

$$C'_S = F_D \times C_R \times R'_S$$

Trong đó:
$C_R$ là nồng độ của $\Delta^{4,6}$-cholestadienol (µg/ml);
$R'_S$ là tỉ số đáp ứng pic của vitamin D đối với $\Delta^{4,6}$-cholestadienol.
Tính toán nồng độ, $C'_{PRE}$ (µg/ml), của tiền vitamin D trong dung dịch hỗn hợp làm việc bằng công thức:

$$C'_{PRE} = C_S - C'_S$$

Tính toán hệ số đáp ứng, $F_{PRE}$, đối với tiền vitamin D bằng công thức:

$$F_{PRE} = \frac{F_D \times R'_S \times C'_{PRE}}{R'_{PRE} \times C'_S}$$

Trong đó:
$R'_{PRE}$ là tỉ số đáp ứng pic của tiền vitamin D đối với $\Delta^{4,6}$-cholestadienol.
(*Chú ý:* Giá trị của $F_{PRE}$ được xác định trùng lặp ở những ngày khác nhau có thể sử dụng trong cả quy trình này).
*Tiến hành sắc ký:* Tiêm 500 µl dung dịch thử vào cột làm sạch và lấy phần rửa giải trong khoảng thời gian tương ứng 0,7 đến 1,3 thời gian lưu tương đối của pic vitamin D hỗn hợp (xem phần thử độ thích hợp hệ thống của cột làm sạch) vào một bình cầu đáy tròn. Thêm 50 µl *dung dịch butyl hydroxytoluen (TT), lắc đều và bay hơi trong chân không đến khô bằng cất quay chân không ở nhiệt độ không quá* 40 °C. Làm mát dưới vòi nước và đưa nitrogen vào đủ để phục hồi áp suất không khí. Hòa tan ngay cặn trong 5,0 ml hỗn hợp *toluen - pha động B* (5 : 95). Tiêm 200 µl dung dịch này vào cột phân tích và đo đáp ứng pic của vitamin D, tiền vitamin D và $\Delta^{4,6}$-cholestadienol. Tính toán nồng độ của cholecalciferol ($C_{27}H_{44}O$) hoặc ergocalciferol ($C_{28}H_{44}O$) bằng công thức sau:

$$(R''_D \times F_D + R''_{PRE} \times F_{PRE})C''_R$$

Trong đó:
$R''_D$ là tỉ số của đáp ứng pic của vitamin D đối với $\Delta^{4,6}$-cholestadienol;
$R''_{PRE}$ là tỉ số đáp ứng pic của tiền vitamin D đối với $\Delta^{4,6}$-cholestadienol;
$C''_R$ là nồng độ của $\Delta^{4,6}$-cholestadienol trong dung dịch thử (µg/ml).

**Phương pháp 2: *Phương pháp hóa học***

Quy trình sau đây được áp dụng cho định lượng vitamin D trong các chế phẩm thuốc.

***Hóa chất và thuốc thử đặc biệt***

*Đất sét dùng cho sắc ký ($TT_1$): Đất sét dùng cho sắc ký (TT)* có hàm lượng nước từ 8,5 % đến 9,0 % (sử dụng phương pháp mất khối lượng do làm khô).

*Ether dầu hỏa ($TT_1$):* Dùng *ether dầu hỏa (TT)*, nếu cần chưng cất lại, đáp ứng thêm yêu cầu sau đây:

*Tinh khiết quang phổ*: Đo độ hấp thụ (Phụ lục 4.1) của chế phẩm ở bước sóng 300 nm, dùng không khí làm mẫu trắng, độ hấp thụ không được quá 0,070.

*Ethylen clorid ($TT_1$): Ethylen clorid (TT)* tinh chế qua cột silica gel (74 µm đến 850 µm).

*Dung dịch butyl hydroxytoluen ($TT_1$):* Hòa tan 10 mg *butyl hydroxytoluen (TT)* trong 100 ml *ethanol 96 % (TT)*. Pha mới dung dịch hàng ngày.

*Ether ($TT_2$):* Sử dụng *ether (TT)* mới cất, bỏ đi 10 % dịch cất đầu và cuối.

***Thuốc thử tạo màu***

*Dung dịch A*: Chuyển hết toàn bộ 113 g *antimony triclorid (TT)* tinh thể khô có chứa sẵn trong lọ mới chưa mở vào bình nón có chứa 400 ml *ethylen clorid ($TT_1$)*. Thêm khoảng 2 g *nhôm oxyd khan (TT)*, lắc đều và lọc qua giấy lọc vào bình định mức thủy tinh trong, dung tích 500 ml. Pha loãng thành 500 ml với *ethylen clorid ($TT_1$)* và lắc đều. Đo độ hấp thụ (Phụ lục 4.1) của dung dịch này ở bước sóng 500 nm, trong cốc đo 20 mm, dùng dung dịch *ethylen clorid ($TT_1$)* làm mẫu trắng, độ hấp thụ đo được không được quá 0,070.

*Dung dịch B*: Lắc đều trong hốt 100 ml *acetyl clorid (TT)* với 400 ml *ethylen clorid ($TT_1$)*.

*Thuốc thử tạo màu*: Lắc đều 45 ml dung dịch A và 5 ml dung dịch B. Bảo quản trong lọ kín và sử dụng được trong vòng 7 ngày, nhưng nếu thuốc thử xuất hiện màu thì bỏ đi.

***Phương pháp sắc ký cột***

*Chuẩn bị các cột sắc ký:*

– Cột thứ nhất: Chuẩn bị sắc ký cột đi xuống gồm một cột sắc ký có đường kính trong 2,5 cm và dài khoảng 25 cm và được thu nhỏ lại tới đường kính 8 mm trong khoảng cách 5 cm từ đầu cuối của ống, đặt một đĩa thủy tinh xốp có lỗ xốp lớn hoặc một miếng nhỏ bông thủy tinh ngay trên điểm thắt này. Phần thu nhỏ này có thể lắp một khóa nhựa bên trong.

Cho khoảng 125 ml *isooctan (TT)* vào một chai miệng rộng, nút xoáy, thêm 25 g *đất silic dùng cho sắc ký (TT)*, lắc đến khi tạo thành bột nhão. Thêm từng giọt và lắc đều mạnh 10 ml *polyethylen glycol 600 (TT)*. Đậy nút chai và lắc mạnh trong 2 min. Rót một nửa lượng bột nhão vào cột sắc ký và để lắng. Sau đó áp dụng hút chân không nhẹ nhàng và thêm phần còn lại của bột nhão (thêm từng phần nhỏ một), nhồi từng phần bằng một ống pit tông hình đĩa 20 mm. Khi bề mặt rắn hình thành, bỏ chân không và thêm khoảng 2 ml *isooctan (TT)*.

– Cột thứ hai: Chuẩn bị một cột gồm ba phần: (1) Phần đầu phình rộng có đường kính trong 18 mm và dài khoảng 14 cm; (2) Phần giữa có đường kính trong 6 mm và dài khoảng 25 cm và (3) Phần ống ra phía dưới được thu nhỏ lại, dạng hình phễu, dài khoảng 5 cm. Đặt một miếng bông thủy tinh nhỏ phía trên phần thu nhỏ 1 cm.

Nhồi vào phần giữa của ống 3 g *đất sét dùng cho sắc ký (TT)* với hút chân không nhẹ nhàng (khoảng 125 mm thủy ngân).

*Dung dịch chuẩn*: Cân chính xác khoảng 25 mg ergocalciferol chuẩn hoặc cholecalciferol chuẩn vào bình định mức dung tích 100 ml, hòa tan trong *isooctan (TT)*, pha loãng đến vạch bằng cùng dung môi và lắc đều. Bảo quản dung dịch này trong tủ lạnh. Khi định lượng, hút 1,0 ml dung dịch này vào bình định mức dung tích 50 ml, bốc hơi dung môi bằng dòng khí nitrogen, hòa tan cắn và pha loãng đến thể tích với *ethylen clorid ($TT_1$)* và lắc đều.

*Dung dịch thử*: Cân hoặc hút chính xác một lượng chế phẩm tương đương với không ít hơn125 µg nhưng thích hợp nhất là 250 µg ergocalciferol (10000 IU). Nếu ít hoặc không có vitamin A có mặt trong chế phẩm, thêm khoảng 1,5 mg vitamin A acetat (tương đương với 3000 IU) để tạo các dải thực nghiệm cần thiết trong phần sắc ký phía sau. Đối với viên nang hoặc viên nén, đun hồi lưu ít nhất 10 viên trong 10 ml *nước* trên cách thủy khoảng 10 min, nghiền chất rắn còn lại bằng đũa thủy tinh đầu tù và đun nóng thêm 5 min.

Thêm một thể tích *dung dịch kali hydroxid 50 % (TT)* tương ứng với 2,5 ml cho mỗi g của khối lượng chế phẩm, nhưng tổng thể tích không ít hơn 3,0 ml. Thêm 10 ml *dung dịch butyl hydroxytoluen ($TT_1$)* và 20 ml dung dịch *ethanol 96 % (TT)*. Đun hồi lưu mạnh trên cách thủy khoảng 30 min. Làm mát và chuyển hỗn hợp xà phòng hóa vào một bình gạn, rửa bình nón xà phòng hóa 3 lần, mỗi lần 10 ml *nước* và 3 lần, mỗi lần 50 ml *ether ($TT_2$)*, gộp dịch rửa vào bình gạn. Thêm khoảng 4 g *natri sulfat decahydrat (TT)* vào bình gạn và chiết bằng cách lắc trong 2 min. Nếu hình thành nhũ dịch, chiết 3 lần mỗi lần 25 ml *ether ($TT_2$)*. Gộp dịch chiết ether và rửa nhẹ nhàng với 50 ml *nước*. Rửa nhắc lại nhiều lần bằng cách lắc mạnh, mỗi lần với 50 ml *nước* đến khi dịch rửa cuối cùng không có màu hồng khi thêm *dung dịch phenolphthalein (CT)*. Chuyển dịch chiết ether đã rửa vào bình định mức dung tích 250 ml, pha loãng đến thể tích với *ether ($TT_2$)* và lắc đều. Chuyển toàn bộ dung dịch hoặc lấy một thể tích chính xác có chứa khoảng 250 µg ergocalciferol vào cốc có mỏ cao thành dung tích 400 ml có chứa 5 g *natri sulfat khan (TT)*. Khuấy trong 2 min, gạn phần dung dịch vào cốc có mỏ dung tích 400 ml khác. Rửa phần natri sulfat còn lại 3 lần, mỗi lần 25 ml *ether ($TT_2$)*, gộp dịch rửa vào phần dung dịch. Bốc hơi trên cách thủy đến khi còn khoảng 30 ml, chuyển vào một bình cầu bốc hơi đáy tròn, nhỏ. Rửa cốc 3 lần mỗi lần 10 ml *ether ($TT_2$)*, gộp dịch rửa vào bình cầu. Bốc hơi bằng cất quay chân không ở nhiệt độ không quá 40 °C hoặc bằng dòng khí nitrogen ở nhiệt độ phòng để loại bỏ hoàn toàn dung môi. Hòa tan cắn trong một lượng nhỏ *ether dầu hỏa (TT)*, chuyển vào bình định mức dung tích 10 ml, pha

loãng đến thể tích với *ether dầu hỏa (TT)*, lắc đều thu được dung dịch thử.

***Cách tiến hành:***

– Sắc ký cột thứ nhất: Ngay khi 2 ml *isooctan (TT)* thấm hết vào trong bề mặt của cột thứ nhất, hút 2 ml dung dịch thử lên bề mặt cột. Khi mặt lõm của dung dịch thử đi tới bề mặt cột, thêm lần đầu tiên của 3 lần thêm, mỗi lần 2 ml *ether dầu hỏa (TT)*, mỗi lần thêm tiếp theo khi lần thêm trước thấm hết vào trong cột. Tiếp tục thêm *ether dầu hỏa (TT)* nhiều lần, mỗi lần 5 đến 10 ml tới khi thêm được 100 ml. Nếu cần điều chỉnh tốc độ dòng từ 3 đến 6 ml/min, bằng tạo một áp suất nhẹ nhàng lên đầu cột sắc ký.

Bỏ 20 ml dịch rửa giải đầu tiên và lấy dịch còn lại. Thỉnh thoảng, kiểm tra cột dưới ánh sáng từ ngoại trong suốt quá trình sắc ký và dừng dòng chảy khi phía trên của dải huỳnh quang tương ứng với vitamin A là khoảng 5 mm từ đáy của cột. (Đèn UV có bức xạ yếu ở vùng 300 nm. Cần sử dụng đèn có khẩu độ hoặc màn hình hẹp nhằm giảm lượng bức xạ tới mức tối thiểu để phát hiện vitamin A trên cột). Chuyển dịch rửa giải vào một bình bốc hơi thích hợp và bốc hơi dung môi ether dầu hỏa hoàn toàn trong chân không ở nhiệt độ không quá 40 °C hoặc với một luồng khí nitrogen ở nhiệt độ phòng. Hòa tan cắn trong khoảng 10 ml *ether dầu hỏa (TT)*

– Sắc ký cột thứ hai: Chuyển dung dịch ether dầu hỏa thu được ở cột thứ nhất lên bề mặt cột thứ hai. Rửa bình bốc hơi với 10 ml *ether dầu hỏa (TT)* chia thành từng phần nhỏ, thêm từng phần dịch rửa vào cột thứ hai và để chảy qua cột, bỏ dịch rửa giải. Khi còn khoảng 1 ml ether dầu hỏa phía trên bề mặt cột, thêm 75 ml *toluen (TT)*, rửa giải bằng hút chân không nhẹ nhàng (khoảng 125 mm thủy ngân), thu được dịch rửa giải. Bay hơi toluen trong chân không ở nhiệt độ không quá 40 °C hoặc với một dòng khí nitrogen ở nhiệt độ phòng.

*Dung dịch định lượng:* Hòa tan cắn thu được ở phần sắc ký cột thứ hai trong một lượng nhỏ *ethylen diclorid ($TT_1$)* chuyển vào bình định mức dung tích 10 ml, pha loãng đến vạch với *ethylen diclorid ($TT_1$)* và lắc đều thu được dung dịch định lượng.

*Tạo màu:* Lấy ba ống tạo màu đường kính trong khoảng 20 mm, đánh số thứ tự 1, 2 và 3. Thêm vào mỗi ống 1 ml dung dịch thử.

| Các dung dịch | Ống 1 | Ống 2 | Ống 3 |
|---|---|---|---|
| Dung dịch thử | 1 ml | 1 ml | 1 ml |
| Dung dịch chuẩn | 1 ml | - | - |
| Ethylen clorid ($TT_1$) | - | 1 ml | - |
| Hỗn hợp *anhydrid acetic - ethylen clorid (1 : 1).* | - | - | 1 ml |
| Thuốc thử tạo màu (thêm nhanh vào mỗi ống, tốt hơn hết là bằng một pipet tự động, lắc đều) | 1 ml | 1 ml | 1 ml |

Chính xác 45 s sau khi thêm thuốc thử tạo màu, đo độ hấp thụ của ba dung dịch (Phụ lục 4.1) ở bước sóng 500 nm, dùng *ethylen clorid ($TT_1$)* làm mẫu trắng. Tương tự, 45 s sau lần đo thứ nhất, tiếp tục xác định độ hấp thụ của dung dịch 2 và 3 ở 550 nm trong cùng điều kiện. Ký hiệu các độ hấp thụ đo được là $A^1_{500}, A^2_{500}, A^3_{500}, A^2_{550}$ và $A^3_{550}$, trong đó số được viết lên trên là số của ống còn số viết phía dưới là bước sóng đo.

*Tính kết quả:*

Tính hàm lượng (µg) của vitamin D trong lượng chế phẩm bằng công thức:

$$(C_S/C)/(A_U/A_S)$$

Trong đó:

$C_S$ là nồng của vitamin D trong dung dịch chuẩn (µg/ml).

C là nồng độ của mẫu thử (tính theo g, viên nén, viên nang...) trong mỗi ml của dung dịch định lượng.

$A_U$ là giá trị của $(A^2_{500} - A^3_{500}) - 0,67(A^2_{500} - A^3_{500})$ được xác định từ các độ hấp thụ đo được của dung dịch định lượng.

$A_S$ là giá trị của $A^1_{500} - A^2_{500}$ được xác định từ các độ hấp thụ đo được của dung dịch chuẩn.

# PHỤ LỤC 11

## 11.1 GIỚI HẠN CHO PHÉP VỀ THỂ TÍCH CỦA CÁC THUỐC DẠNG LỎNG

Lượng hoạt chất có trong các thuốc dạng lỏng liên quan đến thể tích của chúng. Do thực tế sai số của các dụng cụ, trang thiết bị và việc thực hiện qui trình sản xuất mà mỗi thuốc dạng lỏng được phép có một khoảng chênh lệch nhất định về thể tích so với qui định ghi trên nhãn. Đó là giới hạn cho phép về thể tích.

Trừ các thuốc có qui định đặc biệt, các thuốc dạng lỏng có giới hạn cho phép về thể tích ghi trong Bảng 11.1.

*Bảng 11.1* - Giới hạn cho phép chênh lệch (%) về thể tích của các thuốc dạng lỏng

| Loại thuốc | | Thể tích ghi trên nhãn | Giới hạn cho phép |
|---|---|---|---|
| Thuốc tiêm đơn liều: | | | |
| - Đo thể tích thuốc từng đơn vị chế phẩm | | Mọi thể tích | + 10 % |
| - Trong trường hợp tiến hành đo thể tích thuốc từ nhiều đơn vị chế phẩm gộp lại với thuốc tiêm có thể tích ≤ 2 ml | | Tổng thể tích ghi trên nhãn của các đơn vị chế phẩm đem thử | + 15 % |
| Thuốc tiêm đa liều | | Mọi thể tích | Không dưới thể tích ghi trên nhãn |
| Thuốc tiêm truyền | | Tới 50 ml | − 10 % |
| | | Trên 50 ml | + 5 % |
| Thuốc dạng lỏng để uống (Dung dịch, Hỗn dịch, Nhũ dịch, Rượu, Sirô thuốc và Cao thuốc) | Đa liều | Mọi thể tích | Không dưới thể tích ghi trên nhãn |
| | Đơn liều | Tới 20 ml | + 10 % |
| | | Trên 20 ml đến 50 ml | + 8 % |
| | | Trên 50 ml đến 150 ml | + 6 % |
| | | Trên 150 ml | + 4 % |
| Thuốc nhỏ mắt, Thuốc nhỏ mũi, Thuốc nhỏ tai | | Mọi thể tích | Không dưới thể tích ghi trên nhãn |
| Thuốc dùng ngoài | | Mọi thể tích | Không dưới thể tích ghi trên nhãn |

CÁCH THỬ

### Các dạng thuốc không thuộc dạng thuốc tiêm, thuốc tiêm truyền

***Chế phẩm đa liều***

Lấy ngẫu nhiên 5 đơn vị chế phẩm (ống, lọ...). Xác định thể tích từng đơn vị bằng bơm tiêm chuẩn hoặc ống đong chuẩn sạch, khô, có độ chính xác phù hợp. Thể tích mỗi đơn vị phải không dưới thể tích ghi trên nhãn. Nếu có một đơn vị không đạt phải tiến hành kiểm tra lần thứ hai giống như lần đầu. Chế phẩm đạt yêu cầu nếu trong lần thử này không có đơn vị nào có thể tích dưới thể tích ghi trên nhãn.

***Chế phẩm đơn liều***

Lấy ngẫu nhiên 10 đơn vị chế phẩm. Xác định thể tích từng đơn vị bằng bơm tiêm chuẩn hoặc ống đong chuẩn sạch, khô, có độ chính xác phù hợp. Thể tích mỗi đơn vị phải nằm trong khoảng từ thể tích ghi trên nhãn đến giới hạn cho phép (Bảng 11.1). Nếu có một đơn vị không đạt phải tiến hành kiểm tra lần thứ hai giống như lần đầu. Chế phẩm đạt yêu cầu nếu trong lần thử này không có đơn vị nào có thể tích nằm ngoài giới hạn cho phép.

### Các dạng thuốc tiêm, thuốc tiêm truyền

***Thuốc tiêm đơn liều***

Thuốc tiêm có thể tích lớn hơn hoặc bằng 10 ml: Lấy 1 đơn vị chế phẩm để thử.

Thuốc tiêm có thể tích lớn hơn 3 ml và nhỏ hơn 10 ml: Lấy 3 đơn vị chế phẩm để thử.

Thuốc tiêm có thể tích nhỏ hơn hoặc bằng 3 ml: Lấy 5 đơn vị chế phẩm để thử.

Thuốc tiêm đem đo thể tích phải để cân bằng với nhiệt độ phòng và được phân tán đồng nhất. Dùng bơm tiêm khô, sạch, có dung tích không lớn hơn 3 lần so với thể tích cần đo, có gắn kim tiêm số 21 (21 gauge) và dài không quá 2,5 cm. Lấy toàn bộ thuốc của từng ống vào bơm tiêm, đẩy hết không khí trong bơm tiêm và kim tiêm ra ngoài. Chuyển lượng thuốc có trong bơm tiêm (để lại không bơm hết lượng thuốc còn trong kim) vào ống đong khô, sạch, có vạch chia phù hợp và được chuẩn hóa, ống đong có dung tích sao cho thể tích được đo chiếm tối thiểu 40 % thang đo của ống đong. Cũng có thể xác định thể tích (ml) thuốc tiêm bằng cách xác định khối lượng của lượng thuốc trong ống tiêm (g) rồi chia cho tỷ trọng (g/ml) của chế phẩm.

Đối với thuốc tiêm có thể tích nhỏ hơn hoặc bằng 2 ml, có thể lấy lượng thuốc từ một số lượng đơn vị chế phẩm vừa đủ và gộp lại để có được thể tích đáp ứng cho phép đo, sử dụng các bơm tiêm khô, riêng biệt cho mỗi ống. Đối với thuốc tiêm có thể tích lớn hơn hoặc bằng 10 ml, có thể xác định thể tích bằng cách chuyển thẳng lượng thuốc trong đơn vị chế phẩm vào ống đong hoặc cốc đã cân bì.

Chế phẩm dạng hỗn dịch hoặc nhũ tương phải được lắc đều trước khi rút ra để đo thể tích hoặc trước khi đo tỷ trọng. Chế phẩm nhớt hay ở dạng dầu có thể làm ấm theo hướng dẫn sử dụng ghi trên nhãn, nếu cần, và lắc kỹ ngay trước khi lấy ra để đo. Đo thể tích chế phẩm sau khi đã để nguội xuống 20 °C đến 25 °C.

Nếu tiến hành đo thể tích trên từng đơn vị chế phẩm, thể tích trong mỗi đơn vị phải nằm trong khoảng từ thể tích ghi trên nhãn đến giới hạn cho phép. Trong trường hợp đo mẫu gộp với thuốc tiêm có thể tích ≤ 2 ml, thể tích đo được phải nằm trong khoảng tổng thể tích ghi trên nhãn của các đơn vị chế phẩm lấy đem đo đến giới hạn cho phép.

***Thuốc tiêm đa liều***

Đối với thuốc tiêm đa liều mà trên nhãn có ghi số lượng liều và thể tích của từng liều, lấy một đơn vị chế phẩm, tiến hành lấy ra từng liều như với thuốc tiêm đơn liều, sử dụng các bơm tiêm riêng rẽ. Số lượng bơm tiêm dùng cho phép thử tương ứng với số liều ghi trên nhãn. Thể tích của mỗi liều không nhỏ hơn thể tích đơn vị liều ghi trên nhãn.

***Thuốc tiêm truyền***

Lấy 1 đơn vị chế phẩm. Chuyển toàn bộ lượng thuốc có trong đơn vị chế phẩm vào một ống đong khô, sạch có độ chính xác phù hợp và có dung tích sao cho thể tích được đo chiếm tối thiểu 40 % thang đo của ống đong. Thể tích đo được phải nằm trong khoảng từ thể tích ghi trên nhãn đến giới hạn cho phép.

## 11.2 PHÉP THỬ ĐỘ ĐỒNG ĐỀU HÀM LƯỢNG

Phép thử độ đồng đều hàm lượng của các chế phẩm đơn liều dựa trên cơ sở định lượng hàm lượng hoạt chất của từng đơn vị, để xác định mỗi hàm lượng riêng lẻ có nằm trong giới hạn cho phép so với hàm lượng trung bình hay không.

Phép thử này không áp dụng cho chế phẩm đa liều, thuốc truyền tĩnh mạch không phân liều, chế phẩm chứa vitamin, nguyên tố vi lượng và các trường hợp khác được phép miễn trừ.

Trừ khi có chỉ dẫn khác trong chuyên luận riêng, phép thử độ đồng đều hàm lượng được tiến hành trên 10 đơn vị riêng lẻ lấy ngẫu nhiên. Kết quả được đánh giá theo phương pháp sau:

**Phương pháp 1**

***Áp dụng cho thuốc nang, thuốc bột không dùng pha tiêm, thuốc cốm, thuốc đạn, thuốc trứng***

Chế phẩm đạt yêu cầu phép thử, nếu có không quá một đơn vị có hàm lượng nằm ngoài giới hạn từ 85 % đến 115 % và không có đơn vị nào có hàm lượng nằm ngoài giới hạn từ 75 % đến 125 % của hàm lượng trung bình.

Chế phẩm không đạt yêu cầu phép thử, nếu có quá ba đơn vị có hàm lượng nằm ngoài giới hạn từ 85 % đến 115 %, hoặc có một hay nhiều đơn vị có hàm lượng nằm ngoài giới hạn từ 75 % đến 125 % của hàm lượng trung bình.

Nếu hai hoặc ba đơn vị có hàm lượng nằm ngoài giới hạn từ 85 % đến 115 %, nhưng ở trong giới hạn từ 75 % đến 125 % của hàm lượng trung bình, thử lại trên 20 đơn vị khác lấy ngẫu nhiên. Chế phẩm đạt yêu cầu phép thử, nếu có không quá ba trong tổng số 30 đơn vị đem thử có hàm lượng nằm ngoài giới hạn từ 85 % đến 115 % và không có đơn vị nào có hàm lượng nằm ngoài giới hạn từ 75 % đến 125 % của hàm lượng trung bình.

**Phương pháp 2**

***Áp dụng cho thuốc viên nén, thuốc bột pha tiêm, hỗn dịch để tiêm***

Chế phẩm đạt yêu cầu phép thử, nếu hàm lượng của từng đơn vị nằm trong giới hạn từ 85 % đến 115 % của hàm lượng trung bình.

Chế phẩm không đạt yêu cầu phép thử, nếu có quá một đơn vị có hàm lượng nằm ngoài giới hạn từ 85 % đến 115 %, hoặc có một đơn vị có hàm lượng nằm ngoài giới hạn từ 75 % đến 125 % của hàm lượng trung bình.

Nếu có một đơn vị có hàm lượng nằm ngoài giới hạn từ 85 % đến 115 % của hàm lượng trung bình, thử lại trên 20 đơn vị khác lấy ngẫu nhiên. Chế phẩm đạt yêu cầu phép thử, nếu có không quá một trong tổng số 30 đơn vị đem thử có hàm lượng nằm ngoài giới hạn từ 85 % đến 115 % và không có đơn vị nào có hàm lượng nằm ngoài giới hạn từ 75 % đến 125 % của hàm lượng trung bình.

**Phương pháp 3**

***Áp dụng cho thuốc dán (hấp thu qua da)***

Chế phẩm đạt yêu cầu phép thử, nếu hàm lượng trung bình của 10 đơn vị nằm trong giới hạn từ 90 % đến 110 % hàm lượng ghi trên nhãn và hàm lượng của từng đơn vị phải nằm trong giới hạn từ 75 % đến 125 % của hàm lượng trung bình.

## 11.3 PHÉP THỬ ĐỘ ĐỒNG ĐỀU KHỐI LƯỢNG

Phép thử độ đồng đều khối lượng dùng để xác định độ đồng đều phân liều của chế phẩm, khi không có yêu cầu thử độ đồng đều hàm lượng. Tiến hành theo phương pháp sau:

**Phương pháp 1**

*Áp dụng cho thuốc viên nén, thuốc đạn, thuốc trứng, thuốc dán*

Cân riêng biệt 20 đơn vị lấy ngẫu nhiên, tính khối lượng trung bình. Không được có quá hai đơn vị có khối lượng nằm ngoài giới hạn chênh lệch so với khối lượng trung bình quy định trong Bảng 11.3.1 và không được có đơn vị nào có khối lượng vượt gấp đôi giới hạn đó.

**Phương pháp 2**

*Áp dụng cho thuốc nang, thuốc bột (đơn liều), thuốc cốm (không bao, đơn liều)*

Cân khối lượng của một nang hay một gói (thuốc bột, thuốc cốm). Với viên nang cứng, tháo rời hai nửa vỏ nang, dùng bông lau sạch vỏ và cân khối lượng của vỏ. Với viên nang mềm, cắt mở nang, bóp hết thuốc ra, dùng ether hoặc dung môi hữu cơ thích hợp rửa vỏ nang, để khô tự nhiên cho đến khi hết mùi dung môi, cân khối lượng của vỏ nang. Với gói, cắt mở gói, lấy hết thuốc ra, dùng bông lau

*Bảng 11.3.1* - Bảng quy định độ đồng đều khối lượng cho chế phẩm đơn liều

| Dạng bào chế | Khối lượng trung bình (KLTB) | % chênh lệch so với KLTB |
|---|---|---|
| Viên nén<br>Viên bao phim | Nhỏ hơn hoặc bằng 80 mg | 10 |
| | Lớn hơn 80 mg và nhỏ hơn 250 mg | 7,5 |
| | Bằng hoặc lớn hơn 250 mg | 5 |
| Thuốc nang; Thuốc bột (đơn liều); Thuốc cốm (không bao, đơn liều) | Nhỏ hơn 300 mg | 10 |
| | Bằng hoặc lớn hơn 300 mg | 7,5 |
| Thuốc bột để pha tiêm* (đơn liều) | Lớn hơn 40 mg | 10 |
| Viên nén bao đường | Tất cả các loại | 10 |
| Thuốc đạn<br>Thuốc trứng<br>Cao dán | Tất cả các loại | 5 |

* Đối với thuốc bột để pha tiêm, khi khối lượng trung bình bằng hay nhỏ hơn 40 mg, chế phẩm không phải thử độ đồng đều khối lượng, nhưng phải thử độ đồng đều hàm lượng.

sạch bột thuốc bám ở mặt trong, cân khối lượng vỏ gói. Khối lượng thuốc trong nang hay gói là hiệu số giữa khối lượng nang thuốc hay gói và khối lượng vỏ nang hay vỏ gói. Tiến hành tương tự với 19 đơn vị khác lấy ngẫu nhiên. Tính khối lượng trung bình của thuốc trong nang hay gói. Kết quả được đánh giá dựa vào Bảng 11.3.1 giống như Phương pháp 1.

**Phương pháp 3**

*Áp dụng cho thuốc bột để pha tiêm.*

Loại bỏ hết nhãn, rửa sạch và làm khô bên ngoài. Loại bỏ hết các nút nếu có, cân ngay khối lượng cả vỏ và thuốc. Lấy hết thuốc ra, dùng bông lau sạch, nếu cần rửa với nước, sau đó với *ethanol 96 % (TT)*, sấy ở 100 °C đến 105 °C trong 1 h. Nếu vỏ không chịu được nhiệt độ này, làm khô ở nhiệt độ thích hợp tới khối lượng không đổi, để nguội trong bình hút ẩm và cân. Hiệu số giữa hai lần cân là khối lượng của thuốc. Tiến hành tương tự với 19 đơn vị khác lấy ngẫu nhiên. Tính khối lượng trung bình của thuốc. Kết quả được đánh giá dựa vào Bảng 11.3.1 giống như Phương pháp 1.

**Phương pháp 4**

*Áp dụng cho thuốc bột (đa liều), thuốc cốm (đa liều), thuốc mỡ, cao xoa, cao động vật.*

Cân khối lượng của một đơn vị đóng gói nhỏ nhất. Mở đồ chứa (gói, hộp, lọ...), lấy hết thuốc ra, cắt mở đồ chứa nếu cần để dễ dàng dùng bông lau sạch thuốc bám ở mặt trong, cân khối lượng của đồ chứa. Hiệu số giữa hai lần cân là khối lượng của thuốc. Tiến hành tương tự với bốn đơn vị khác lấy ngẫu nhiên. Tất cả các đơn vị phải có khối lượng nằm trong giới hạn chênh lệch so với khối lượng ghi trên nhãn quy định trong Bảng 11.3.2. Nếu có một đơn vị có khối lượng nằm ngoài giới hạn đó, tiến hành thử lại với năm đơn vị khác lấy ngẫu nhiên. Không được có quá một đơn vị trong tổng số 10 đơn vị đem thử có khối lượng nằm ngoài giới hạn qui định.

*Bảng 11.3.2* - Bảng quy định độ đồng đều khối lượng cho chế phẩm đa liều

| Dạng bào chế | Khối lượng ghi trên nhãn (KLN) | % chênh lệch so với KLN |
|---|---|---|
| Thuốc bột (đa liều) | Nhỏ hơn hoặc bằng 0,50 g | 10 |
| | Lớn hơn 0,50 g và bằng 1,50 g | 7 |
| | Lớn hơn 1,50 g và bằng 6,00 g | 5 |
| | Lớn hơn 6,00 g | 3 |
| Thuốc cốm (đa liều) | Tất cả các loại | 5 |
| Thuốc kem, mỡ, bột nhão, gel, Cao xoa | Nhỏ hơn hoặc bằng 10,0 g | 15 |
| | Lớn hơn 10,0 g và bằng 20,0 g | 10 |
| | Lớn hơn 20,0 g và bằng 50,0 g | 8 |
| | Lớn hơn 50,0 | 5 |
| Cao động vật | Nhỏ hơn hoặc bằng 100,0 g | 5 |
| | Lớn hơn 100,0 g và bằng 200,0 g | 3 |
| | Lớn hơn 200,0 g | 2 |

## 11.4 PHÉP THỬ ĐỘ HÒA TAN CỦA DẠNG THUỐC RẮN PHÂN LIỀU

Phép thử này nhằm xác định sự phù hợp của chế phẩm đối với yêu cầu qui định về độ hòa tan dược chất của các dạng thuốc rắn phân liều dùng đường uống. Trong chuyên luận, một đơn vị được hiểu là 1 viên nén, 1 nang hoặc 1 lượng chế phẩm được chỉ rõ.

**Thiết bị**

***Thiết bị kiểu giỏ quay** (Thiết bị kiểu 1)*

Hệ thống thiết bị này bao gồm những bộ phận sau:

Một bình hình trụ dung tích 1 L có đáy hình bán cầu bằng thủy tinh hoặc bằng vật liệu trơ và trong suốt khác, miệng viền rộng có nắp đậy với những lỗ thích hợp (để cắm nhiệt

kế....). Chiều cao của bình từ 160 mm đến 210 mm, đường kính trong từ 98 mm đến 106 mm. Vật liệu chế tạo bình phải không hấp phụ, không phản ứng hoặc tương tác với mẫu thử;

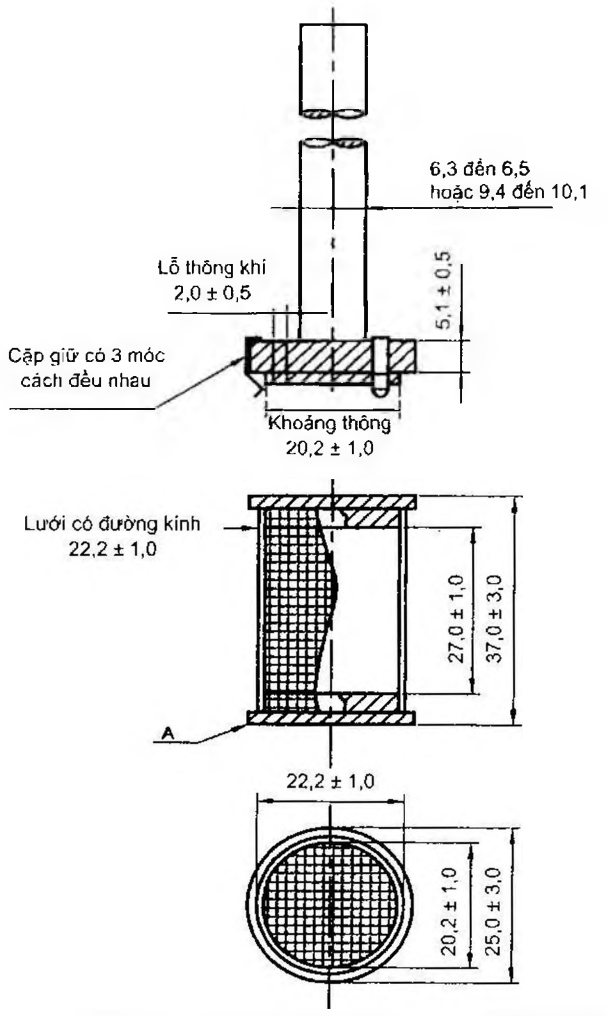
Một trục quay và một giỏ hình trụ như mô tả ở Hình 11.4.1 Các bộ phận trục và giỏ quay của thiết bị được chế tạo bằng thép không gỉ (SUS316) hoặc bằng một vật liệu trơ khác. Giỏ quay có thể được mạ một lớp vàng dày khoảng 2,5 µm. Đơn vị được đặt trong giỏ khô khi bắt đầu mỗi phép thử. Khoảng cách giữa đáy bình và đáy của giỏ luôn luôn giữ trong khoảng (25 ± 2) mm suốt quá trình thử. Trục quay được định vị sao cho trục của nó không bị lệch quá 2 mm so với trục xuyên tâm thẳng đứng của bình ở bất kỳ điểm nào;

Một động cơ có bộ phận điều tốc để duy trì tốc độ quay trong dung sai ± 4 % của tốc độ qui định. Động cơ được kết nối với một trục quay và khi vận hành thì quay nhẹ nhàng, không tạo nên sóng nước ảnh hưởng tới kết quả;

Bình được ngâm chìm một phần trong một bể cách thủy có kích thước phù hợp hoặc có thể được điều nhiệt bằng thiết bị thích hợp khác như áo nước. Bể cách thủy hay áo nước cho phép duy trì nhiệt độ bên trong bình môi trường hòa tan ở (37 ± 0,5) °C trong quá trình thử cũng như giữ cho môi trường trong bình chuyển động ổn định và nhẹ nhàng. Bất kỳ bộ phận nào của thiết bị, bao gồm cả bàn thí nghiệm hay nơi đặt thiết bị, đều không được có rung động, lắc lư đáng kể; chấp nhận những lay động rất nhẹ gây ra bởi bộ phận khuấy quay. Thiết bị được chế tạo sao cho có thể quan sát dễ dàng mẫu thử và bộ phận quay trong khi vận hành.

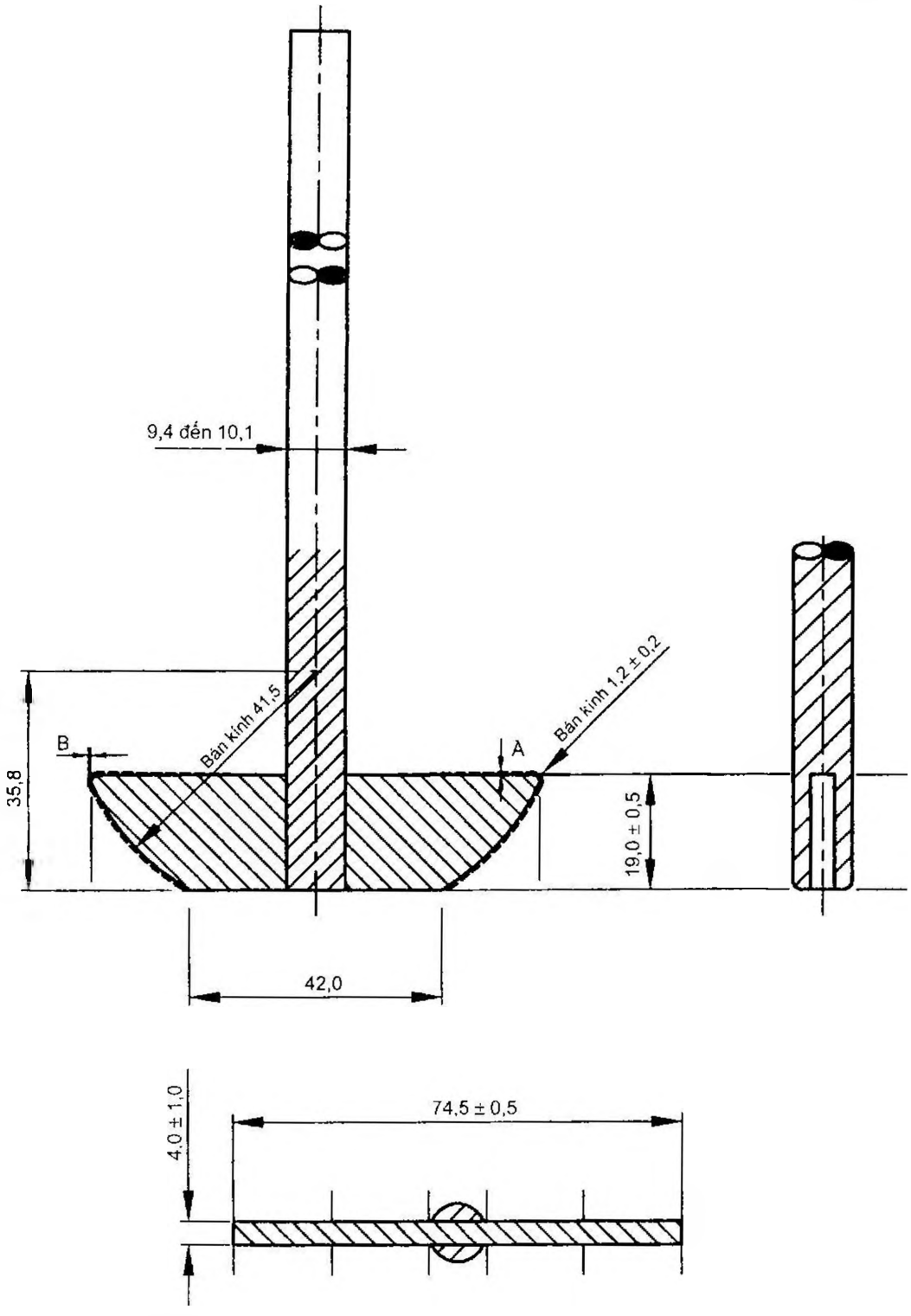
***Thiết bị kiểu cánh khuấy*** *(Thiết bị kiểu 2)*

Thiết bị kiểu cánh khuấy giống như thiết bị kiểu 1 ngoại trừ có dùng một bộ phận khuấy, bao gồm một cánh khuấy và một trục mang nó. Trục quay được định vị sao cho trục của nó không bị lệch quá 2 mm so với trục xuyên tâm thẳng đứng của bình ở bất kỳ điểm nào. Trục này quay nhẹ nhàng, không tạo nên sóng nước ảnh hưởng tới kết quả. Đường thẳng đứng xuyên tâm của cánh khuấy cũng đi qua trục của trục quay và lắp sao cho đáy của cánh khuấy ngang bằng với đáy của trục. Cánh khuấy được mô tả trên Hình 11.4.2. Khoảng cách giữa đáy cánh khuấy và đáy bình luôn được duy trì ở 25 mm ± 2 mm trong quá trình vận hành phép thử. Trục quay và cánh khuấy được làm bằng kim loại hay vật liệu trơ thích hợp, được gắn kết thành một khối chắc chắn. Một kiểu thiết kế khác gồm 2 phần tháo lắp được cũng có thể được sử dụng miễn là 2 phần này gắn kết chắc chắn trong quá trình vận hành. Cánh khuấy và trục quay có thể được phủ một lớp mạ thích hợp để đảm bảo bề mặt hoàn toàn trơ. Đơn vị thử thường được đặt xuống đáy bình trước khi bắt đầu cho cánh khuấy quay. Có thể dùng bộ phận giữ mẫu thử, làm bằng vật liệu trơ, được mô tả trên Hình 11.4.2a, để giữ cho mẫu thử không bị nổi lên. Những bộ phận giữ mẫu thử kiểu khác cũng có thể sử dụng miễn là được thẩm định đạt yêu cầu. Nếu trong chuyên luận có chỉ định dùng bộ phận giữ mẫu thử và không có qui định khác, thì dùng bộ phận giữ mẫu thử như trong Hình 11.4.2a.




1. Lưới có mép được hàn; đường kính sợi lưới từ 0,25 đến 0,31 mm
Độ rộng mắt lưới từ 0,36 - 0,44 mm
2. Khi lắp giỏ quay vào trục quay và vận hành thì độ lệnh tối đa tại "A" là 1,0 mm

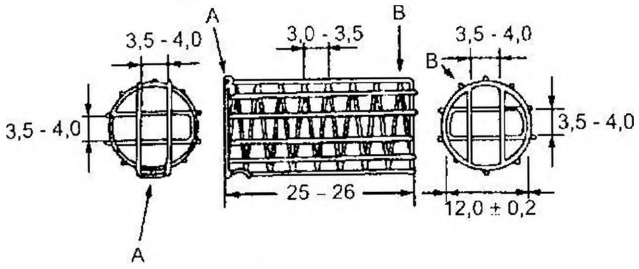
*Hình 11.4.1* - Thiết bị thử độ hòa tan kiểu giỏ quay (kiểu 1)
*(Kích thước tính bằng mm)*




Lưu ý:

1. Kích thước A và B không thay đổi quá 0,5 mm khi quay
2. Dung sai ± 1,0 mm trừ khi có quy định khác

*Hình 11.4.2* - Thiết bị thử độ hòa tan kiểu cánh khuấy (kiểu 2)
*(Kích thước tính bằng mm)*




*Hình 11.4.2a* - Một kiểu bộ phận giữ mẫu thử
*(Kích thước tính bằng mm)*

***Thiết bị kiểu buồng dòng chảy*** *(Thiết bị kiểu 3)*

Thiết bị này bao gồm 1 bình chứa và 1 bơm để bơm môi trường hòa tan; 1 buồng cho môi trường hòa tan chảy qua; 1 bể cách thủy để duy trì môi trường hòa tan ở (37 ± 0,5) °C. Dùng buồng dòng chảy có kích cỡ như qui định trong chuyên luận riêng.

Bơm đẩy môi trường hòa tan đi lên qua buồng dòng chảy. Sức đẩy của bơm ở trong khoảng từ 4 đến 16 ml/min với các tốc độ dòng tiêu chuẩn là 4, 8 và 16 ml/min. Nó phải chuyển tải được một dòng chảy hằng định (dao động ± 5 % tốc độ dòng qui định); giản đồ dòng phải ở dạng hình sin với tần số xung là (120 + 10) xung/phút. Loại bơm được khử xung cũng có thể được dùng. Qui trình thử độ hòa tan dùng buồng dòng chảy được qui định thông số đặc trưng về tốc độ dòng và tần số xung nếu có.

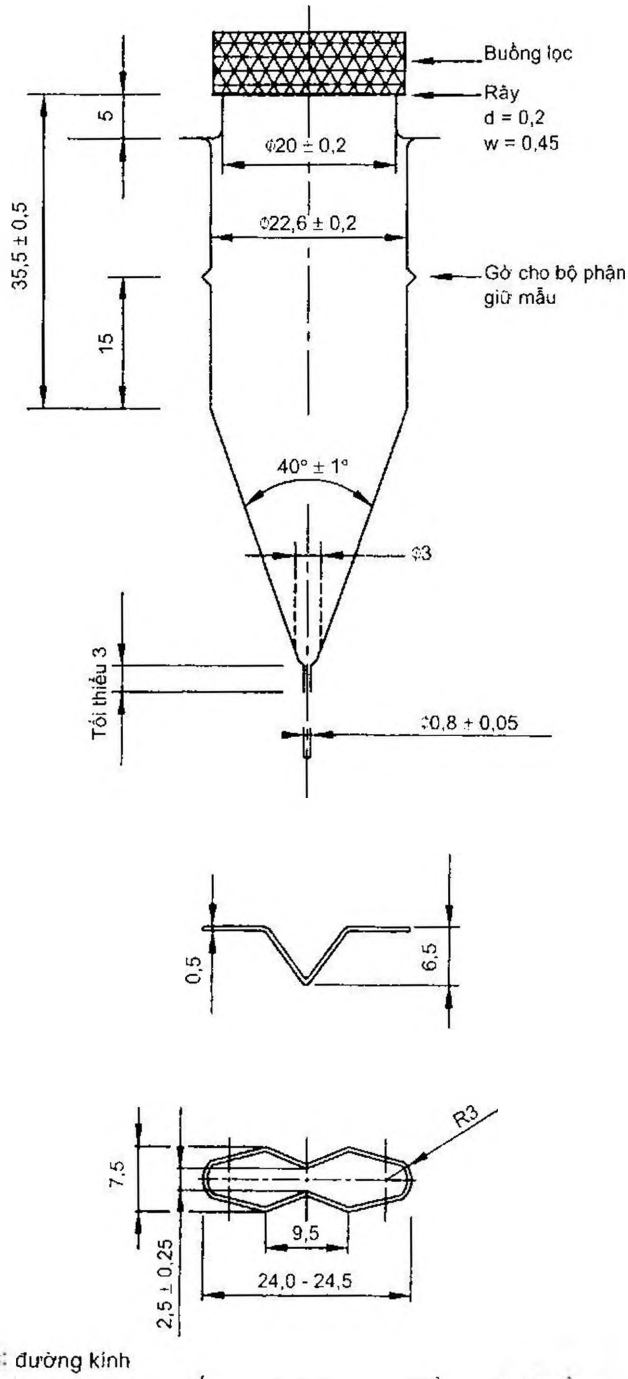
Buồng dòng chảy (xem Hình 11.4.3 và 11.4.4) được chế tạo bằng vật liệu trơ, trong suốt, lắp đặt thẳng đứng với hệ thống lọc (được qui định trong chuyên luận riêng) có khả năng ngăn ngừa những tiểu phân không hòa tan thoát ra từ mặt trên của buồng; đường kính buồng tiêu chuẩn là 12 mm và 22,6 mm; phần hình nón ngược phía dưới thường chứa đầy những hạt bi thủy tinh nhỏ có đường kính 1 mm, trong đó có 1 hạt đường kính 5 mm được định vị ở đáy để ngăn chất lỏng đi vào ống; một bộ phận giữ mẫu thử (xem Hình 11.4.3 và 11.4.4) được dùng để định vị các dạng phân liều đặc biệt. Buồng được nhúng chìm trong bể cách thủy, và được ổn nhiệt ở (37 ± 0,5) °C.

Thiết bị có 2 vòng khuyên để cặp giữ buồng dòng chảy với toàn hệ thống. Bơm được đặt tách riêng khỏi bộ phận hòa tan để giữ cho bộ phận này khỏi rung do bơm chạy. Vị trí của bơm không nên ở mức cao hơn bình chứa môi trường hòa tan. Các đoạn ống nối phải càng ngắn càng tốt. Dùng loại ống bằng vật liệu trơ thích hợp như polytetrafluoroethylen, có đường kính trong khoảng 1,6 mm và các đầu nối được viền nhẵn.

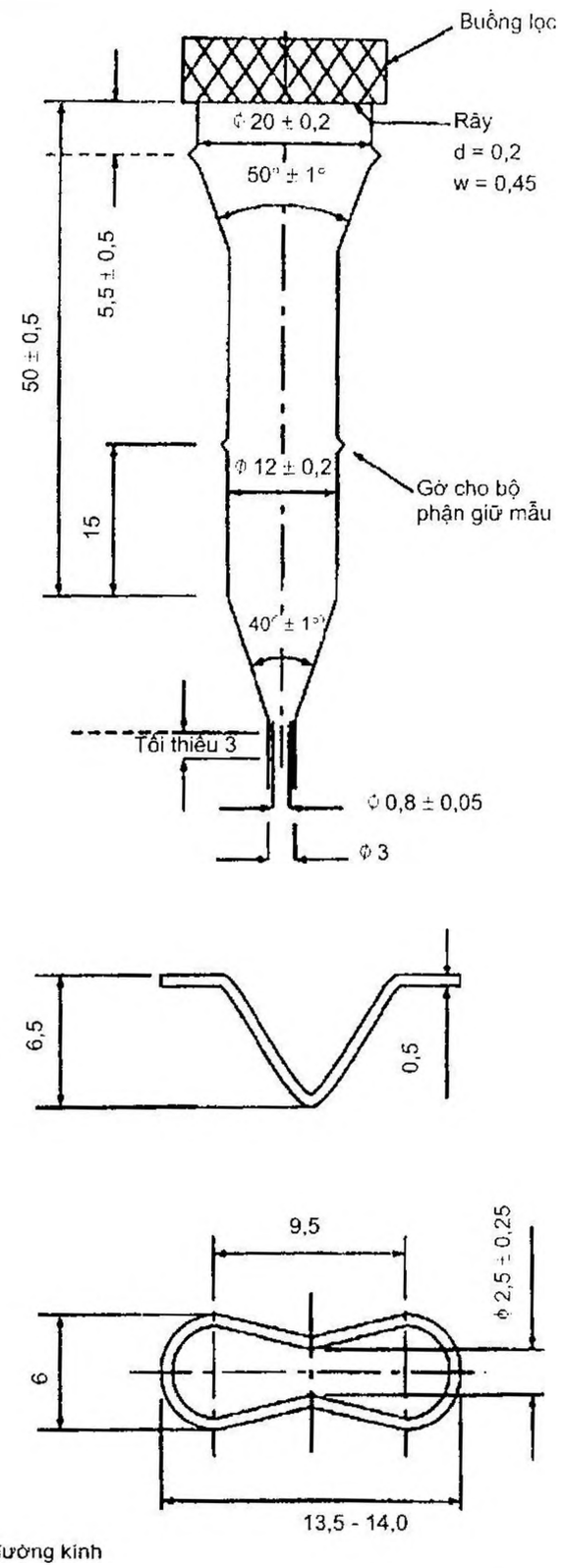
**Đánh giá tính phù hợp của thiết bị**

Việc xác định tính phù hợp của hệ thống thiết bị thử độ hòa tan phải bao gồm đáp ứng yêu cầu về kích thước và khoảng sai số được nêu ở trên. Những thông số quan trọng nhất của phép thử như nhiệt độ và thể tích môi trường hòa tan, tốc độ quay (Phương pháp giỏ quay và Phương pháp cánh khuấy) hay tốc độ dòng của môi trường hòa tan (Phương pháp buồng dòng chảy) cần phải theo dõi định kỳ trong quá trình thử.

Cần phải định kỳ hiệu chuẩn thiết bị thử độ hòa tan.




*Hình 11.4.3* - Thiết bị thử độ hòa tan kiểu 3, loại buồng lớn (phía trên), bộ phận giữ mẫu thử (phía dưới)
*(Kích thước tính bằng mm)*




Φ: đường kính

*Hình 11.4.4* - Thiết bị thử độ hòa tan kiểu 3, loại buồng nhỏ (phía trên), bộ phận giữ mẫu thử (phía dưới) *(Kích thước tính bằng mm)*

**Phương pháp tiến hành**

***a. Phương pháp giỏ quay hoặc phương pháp cánh khuấy***

*Dạng thuốc giải phóng tức thời*

Cách tiến hành: Cho một thể tích xác định môi trường hòa tan (± 1 %) vào trong bình hòa tan, lắp ghép thiết bị, cân bằng nhiệt độ môi trường hòa tan ở (37 ± 0,5) °C rồi lấy nhiệt kế ra. Cho 1 đơn vị vào thiết bị, chú ý loại bọt khí khỏi bề mặt của mẫu thử. Cho vận hành thiết bị ngay ở tốc độ được qui định. Trong khoảng thời gian qui định, hay ở mỗi thời điểm qui định, lấy một phần mẫu môi trường hòa tan ở vùng giữa bề mặt môi trường hòa tan và mặt trên của giỏ quay hay mặt trên của cánh khuấy, cách thành bình ít nhất 10 mm để thử. Nếu phép thử qui định phải lấy mẫu nhiều lần, cần cấp bù một thể tích môi trường hòa tan mới ở 37 °C bằng thể tích dịch mẫu thử đã lấy đi, hoặc nếu không cần thiết phải cấp bù môi trường hòa tan thì tiến hành hiệu chỉnh sự thay đổi thể tích trong tính toán kết quả. Đậy nắp bình hòa tan trong suốt quá trình thử và kiểm tra nhiệt độ của môi trường hòa tan ở các thời điểm thích hợp.

Mẫu thử được lọc ngay sau khi lấy trừ khi đã chứng minh được việc lọc dịch thử là không cần thiết. Cần dùng màng lọc trơ, không hấp phụ dược chất hoặc không chứa những chất bị chiết ra gây trở ngại cho việc phân tích. Tiến hành xác định lượng dược chất được hoà tan theo phương pháp qui định. Lặp lại phép thử với những đơn vị thử khác.

Nếu dùng thiết bị tự động lấy mẫu hoặc thiết bị có thay đổi khác thì cần phải chứng tỏ rằng thiết bị này cho kết quả tương đương với kết quả thu được từ thiết bị chuẩn đã được mô tả trên đây.

Môi trường hòa tan: Sử dụng một loại môi trường hòa tan thích hợp. Đong, đo thể tích môi trường qui định trong điều kiện nhiệt độ từ 20 °C đến 25 °C. Nếu môi trường hòa tan là một dung dịch đệm, cần điều chỉnh pH sao cho ở trong khoảng pH qui định ± 0,05 đơn vị. Các chất khí hòa tan có thể tạo thành bọt khí làm thay đổi kết quả phép thử. Để tránh ảnh hưởng này, cần loại khí trước khi sử dụng.

Thời gian: Nếu qui định một thời điểm lấy mẫu kiểm tra, phép thử có thể kết thúc trong khoảng thời gian ngắn hơn nếu lượng dược chất hòa tan tối thiểu đã được đáp ứng. Mẫu thử được lấy ra chỉ ở những thời điểm qui định, thời điểm lấy mẫu được phép sai số ± 2 %.

*Dạng thuốc giải phóng kéo dài*

Cách tiến hành: Tiến hành như mô tả trong mục Dạng thuốc giải phóng tức thời.

Môi trường hòa tan: Tiến hành như mô tả trong mục Dạng thuốc giải phóng tức thời.

Thời gian: Thường có 3 thời điểm lấy mẫu kiểm tra, được biểu thị bằng giờ.

*Dạng thuốc giải phóng muộn*

Cách tiến hành: Theo phương pháp A hoặc phương pháp B dưới đây.

- Phương pháp A

Giai đoạn acid: Cho 750 ml *dung dịch acid hydrocloric 0,1 M* vào bình hòa tan, lắp ráp thiết bị. Ổn định nhiệt độ môi trường hòa tan ở (37 ± 0,5) °C. Cho 1 đơn vị vào bình, đậy nắp bình rồi vận hành thiết bị với vận tốc được qui định trong chuyên luận riêng. Sau 2 h vận hành ở môi trường

*dung dịch acid hydrocloric 0,1 M*, lấy một một phần môi trường hoà tan để thử rồi tiến hành ngay *Giai đoạn đệm* tiếp theo. Xác định lượng dược chất được hoà tan bằng phương pháp thích hợp.

Giai đoạn đệm: Cần hoàn thành việc thêm dung dịch đệm và điều chỉnh pH trong thời gian không quá 5 min. Trong khi thiết bị vẫn đang vận hành ở vận tốc qui định, thêm vào bình hòa tan 250 ml *dung dịch trinatri phosphat 0,20 M* đã được ổn nhiệt ở (37 ± 0,5) °C. Điều chỉnh pH môi trường hòa tan đến 6,8 ± 0,05 nếu cần thiết, bằng *acid hydrocloric 2 M (TT)* hoặc bằng *dung dịch natri hydroxyd 2 M (TT)*. Tiếp tục vận hành thiết bị 45 min nữa hoặc một khoảng thời gian theo quy định. Hết thời gian này, lấy một phần môi trường hòa tan để xác định lượng dược chất được hòa tan bằng phương pháp thích hợp.

– Phương pháp B

Giai đoạn acid: Cho 1000 ml *dung dịch acid hydrocloric 0,1 M* vào bình hòa tan, lắp ráp thiết bị. Ổn định nhiệt độ môi trường hòa tan ở (37 ± 0,5) °C. Cho 1 đơn vị vào bình, đậy nắp bình rồi vận hành thiết bị với vận tốc được qui định trong chuyên luận riêng. Sau 2 h vận hành ở môi trường *dung dịch acid hydrocloric 0,1 M*, lấy một phần môi trường hoà tan để thử rồi tiến hành ngay *Giai đoạn đệm* tiếp theo. Xác định lượng dược chất hòa tan bằng phương pháp thích hợp.

Giai đoạn đệm: Dùng môi trường là dung dịch đệm đã được ổn nhiệt trước ở 37 °C ± 0,5 °C. Rút hết dung dịch acid từ bình hòa tan đi rồi thêm 1000 ml *đệm phosphat pH 6,8* được pha bằng cách trộn đều *dung dịch acid hydrocloric 0,1 M* với *dung dịch trinatri phosphat 0,20 M* theo tỉ lệ 3 : 1 và điều chỉnh pH môi trường hòa tan đến 6,8 ± 0,05 nếu cần thiết, bằng *dung dịch acid hydrocloric 2 M (TT)* hoặc bằng *dung dịch natri hydroxyd 2 M (TT)*. Cũng có thể thực hiện việc này bằng cách nhấc bình chứa acid ra khỏi máy, thay bằng một bình hòa tan khác chứa dung dịch đệm rồi chuyển đơn vị thử từ bình chứa acid sang bình dung dịch đệm. Tiếp tục vận hành thiết bị 45 min nữa hoặc một khoảng thời gian theo qui định. Hết thời gian này, lấy một lượng môi trường hòa tan để xác định lượng dược chất hoà tan theo phương pháp thích hợp.

Môi trường hòa tan: Tiến hành loại khí như mô tả trong mục Dạng thuốc giải phóng tức thời.

Thời gian: Các thời điểm lấy mẫu được phép sai số ± 2 %, trừ khi có qui định khác.

***b. Phương pháp buồng dòng chảy***

*Dạng thuốc giải phóng tức thời*

Cách tiến hành: Cho các viên bi thủy tinh vào buồng thử như chỉ dẫn trong chuyên luận riêng. Đặt 1 đơn vị lên trên lớp viên bi, hoặc nếu có chỉ dẫn trong chuyên luận riêng thì đơn vị thử được đặt trên bộ phận giữ mẫu. Lắp đầu phễu lọc và cố định các bộ phận của thiết bị với nhau bằng kẹp giữ thích hợp. Bơm môi trường hòa tan đã được làm ấm đến (37 ± 0,5) °C đi qua đáy của buồng để có được tốc độ dòng theo quy định và được đo với độ chính xác 5 %. Thu các phần dịch hòa tan tại mỗi thời điểm qui định. Tiến hành định lượng như hướng dẫn. Lặp lại phép thử với những đơn vị khác.

Môi trường hòa tan: Tiến hành như chỉ dẫn trong mục Dạng thuốc giải phóng tức thời của Phương pháp giỏ quay và Phương pháp cánh khuấy.

Thời gian: Tiến hành như chỉ dẫn trong mục Dạng thuốc giải phóng tức thời của Phương pháp giỏ quay và Phương pháp cánh khuấy.

*Dạng thuốc giải phóng kéo dài*

Cách tiến hành: Tiến hành như mô tả trong mục Dạng thuốc giải phóng tức thời của Phương pháp buồng dòng chảy.

Môi trường hòa tan: Tiến hành như mô tả trong mục Dạng thuốc giải phóng tức thời của Phương pháp buồng dòng chảy.

Thời gian: Thường có 3 thời điểm lấy mẫu, được biểu thị bằng giờ.

*Dạng thuốc giải phóng muộn*

Cách tiến hành: Tiến hành như mô tả trong mục Dạng thuốc giải phóng tức thời của Phương pháp buồng dòng chảy.

Môi trường hòa tan: Tiến hành như mô tả trong mục Dạng thuốc giải phóng tức thời của Phương pháp buồng dòng chảy.

Thời gian: Các thời điểm lấy mẫu được phép sai số ± 2 %, trừ khi có qui định khác.

**Đánh giá kết quả**

***a. Dạng thuốc giải phóng tức thời***

Nếu không có chỉ dẫn gì khác, mẫu thử đạt tiêu chuẩn khi lượng dược chất hòa tan từ các đơn vị đem thử đáp ứng yêu cầu ghi trong Bảng 11.4.1. Phép thử phải trải qua bước tiếp theo nếu kết quả không đạt ở bước trước đó.

Giá trị Q, là lượng dược chất hòa tan theo qui định, được biểu thị bằng phần trăm so với lượng ghi trên nhãn; các giá trị 5 %, 15 % và 25 % cũng là phần trăm của lượng dược chất ghi trên nhãn.

*Bảng 11.4.1* - Tiêu chuẩn chấp nhận khi thử độ hoà tan đối với dạng thuốc giải phóng tức thời

| Bước | Số đơn vị thử | Tiêu chuẩn chấp nhận |
|---|---|---|
| $S_1$ | 6 | Lượng dược chất hòa tan từ mỗi đơn vị không thấp hơn Q + 5 % |
| $S_2$ | 6 | Lượng dược chất hòa tan trung bình của 12 đơn vị thử ($S_1$ + $S_2$) bằng hoặc lớn hơn Q và không có viên nào có lượng dược chất hòa tan thấp hơn Q – 15 % |
| $S_3$ | 12 | Lượng dược chất hòa tan trung bình của 24 đơn vị thử ($S_1$ + $S_2$ + $S_3$) bằng hoặc lớn hơn Q, không quá 2 đơn vị có lượng dược chất hòa tan thấp hơn Q – 15 % và không có đơn vị nào có lượng dược chất hòa tan thấp hơn Q – 25 % |

***b. Dạng thuốc giải phóng kéo dài***

Nếu không có chỉ dẫn gì khác, mẫu thử đạt tiêu chuẩn khi lượng dược chất hòa tan từ các đơn vị đem thử đáp ứng yêu cầu ghi trong Bảng 11.4.2. Phép thử phải trải qua bước tiếp theo nếu kết quả không đạt ở bước trước đó. Giới hạn lượng dược chất hòa tan ở từng thời điểm được biểu thị bằng phần trăm so với lượng ghi trên nhãn. Các giới hạn này gắn với mỗi giá trị $Q_i$, là lượng dược chất được hòa tan ở mỗi một khoảng thời gian nhất định. Các giá trị 10 %, 20 % ghi trong Bảng 11.4.2 cũng là hàm lượng phần trăm của lượng dược chất ghi trên nhãn. Nếu có qui định từ 2 khoảng thời gian hay nhiều hơn, tiêu chuẩn chấp nhận được áp dụng cho từng khoảng thời gian.

*Bảng 11.4.2* - Tiêu chuẩn chấp nhận khi thử độ hoà tan đối với dạng thuốc giải phóng kéo dài

| Bước | Số đơn vị thử | Tiêu chuẩn chấp nhận |
|---|---|---|
| $L_1$ | 6 | Không có đơn vị nào có lượng dược chất hòa tan nằm ngoài mỗi một trong các khoảng qui định và không có đơn vị nào có lượng dược chất hòa tan thấp hơn lượng dược chất hòa tan qui định tại thời điểm thử cuối cùng. |
| $L_2$ | 6 | Lượng dược chất hòa tan trung bình của 12 đơn vị ($L_1 + L_2$) phải nằm trong mỗi khoảng qui định tương ứng và không được thấp hơn lượng dược chất hòa tan qui định ở thời điểm thử cuối cùng; không có đơn vị nào có lượng dược chất hòa tan vượt ra ngoài quá 10 % ở mỗi khoảng qui định tương ứng; không có đơn vị nào có lượng dược chất hòa tan thấp hơn quá 10 % lượng dược chất hòa tan qui định tại thời điểm thử cuối cùng. |
| $L_3$ | 12 | Lượng dược chất hòa tan trung bình của 24 đơn vị ($L_1 + L_2 + L_3$) phải nằm trong mỗi khoảng qui định tương ứng và không được thấp hơn lượng dược chất hòa tan qui định ở thời điểm cuối cùng; không quá 2 trong 24 đơn vị có lượng dược chất hòa tan vượt ra ngoài quá 10 % ở mỗi khoảng qui định tương ứng; không quá 2 trong 24 đơn vị có lượng dược chất hòa tan thấp hơn quá 10 % lượng dược chất hòa tan qui định tại thời điểm thử cuối cùng; không có một đơn vị nào có lượng dược chất hòa tan vượt ra ngoài quá 20 ở mỗi khoảng qui định tương ứng và thấp hơn quá 20 % lượng dược chất hòa tan qui định tại thời điểm thử cuối cùng. |

***c. Dạng thuốc giải phóng muộn***

*Giai đoạn acid:* Nếu không có chỉ dẫn gì khác trong chuyên luận riêng, mẫu thử đạt yêu cầu ở giai đoạn này nếu lượng dược chất hòa tan tính bằng phần trăm so với lượng ghi trên nhãn của các đơn vị được thử đáp ứng yêu cầu ghi trong Bảng 11.4.3. Phép thử phải trải qua bước tiếp theo nếu kết quả không đạt ở bước trước đó.

*Bảng 11.4.3* - Tiêu chuẩn chấp nhận khi thử độ hoà tan đối với dạng thuốc giải phóng muộn

| Bước | Số đơn vị thử | Tiêu chuẩn chấp nhận |
|---|---|---|
| $A_1$ | 6 | Không có đơn vị nào có lượng dược chất hòa tan quá 10 % |
| $A_2$ | 6 | Lượng dược chất hòa tan trung bình của 12 đơn vị thử ($A_1 + A_2$) không lớn hơn 10 % và không có viên nào có lượng dược chất hòa tan quá 25 % |
| $A_3$ | 12 | Lượng dược chất hòa tan trung bình của 24 đơn vị thử ($A_1 + A_2 + A_3$) không lớn hơn 10 %, không có đơn vị nào có lượng dược chất hòa tan quá 25 % |

*Giai đoạn đệm:* Nếu không có chỉ dẫn gì khác trong chuyên luận riêng, mẫu thử đạt yêu cầu khi lượng dược chất hòa tan từ các đơn vị đáp ứng yêu cầu ghi trong Bảng 11.4.4. Phép thử phải trải qua bước tiếp theo nếu kết quả không đạt ở bước trước đó. Giá trị Q trong Bảng 11.4.4 là 75 % lượng dược chất ghi trên nhãn được hòa tan, trừ khi có qui định khác trong chuyên luận riêng. Trị giá của Q là tổng lượng dược chất được hòa tan, biểu thị bằng phần trăm, của cả hai giai đoạn acid và đệm. Các giá trị 5 %, 15 % và 25 % trong Bảng 11.4.4 cũng là phần trăm của lượng dược chất ghi trên nhãn.

*Bảng 11.4.4* - Tiêu chuẩn chấp nhận khi thử độ hoà tan đối với dạng thuốc giải phóng muộn

| Bước | Số đơn vị thử | Tiêu chuẩn chấp nhận |
|---|---|---|
| $B_1$ | 6 | Không có đơn vị nào có lượng dược chất hòa tan thấp hơn Q + 5 % |
| $B_2$ | 6 | Lượng dược chất hòa tan trung bình của 12 đơn vị thử ($B_1 + B_2$) bằng hoặc lớn hơn Q và không có viên nào có lượng dược chất hòa tan thấp hơn Q - 15 % |
| $B_3$ | 12 | Lượng dược chất hòa tan trung bình của 24 đơn vị thử ($B_1 + B_2 + B_3$) bằng hoặc lớn hơn Q, không quá 2 đơn vị có lượng dược chất hòa tan thấp hơn Q - 15 %, và không có đơn vị nào có lượng dược chất hòa tan thấp hơn Q - 25 % |

**Một số quy định đối với phép thử độ hòa tan của viên nén và nang**

Đối với viên nén hoặc nang giải phóng tức thời, nếu không có quy định trong chuyên luận riêng thì thời gian thử là 45 min. Lấy 6 đơn vị thử, lượng dược chất hòa tan từ mỗi đơn vị so với lượng ghi trên nhãn không được thấp hơn 70 %. Nếu có 1 đơn vị không đạt yêu cầu thì lặp lại phép thử với 6 đơn vị khác, lần này cả 6 đơn vị đều phải đạt.

Khi có quy định cho hai đơn vị thử hoặc nhiều hơn vào một bình thử, cũng tiến hành thử sáu lần như vậy. Trong mỗi lần thử, nếu không có chỉ dẫn khác trong chuyên luận riêng, lượng dược chất được hòa tan tính theo mỗi đơn vị không được ít hơn 70 % lượng dược chất ghi trên nhãn. Không được phép thử lại.

Trong trường hợp vỏ nang thuốc có ảnh hưởng đến kết quả phân tích, lấy ít nhất 6 nang thuốc, loại bỏ hết phần thuốc trong nang, hòa tan vỏ nang rỗng trong một thể tích môi trường hòa tan qui định. Tiến hành phân tích bằng phương pháp như đối với dung dịch mẫu thử được qui định trong chuyên luận riêng, sau đó tính hệ số hiệu chỉnh. Hệ số hiệu chỉnh này không được lớn hơn 25 % lượng ghi trên nhãn.

MỘT SỐ HƯỚNG DẪN CHO PHÉP THỬ ĐỘ HÒA TAN CỦA DẠNG THUỐC RẮN PHÂN LIỀU

Trong việc xác định độ hòa tan dược chất của các dạng thuốc rắn phân liều cần xác định rõ các điểm sau đây:

– Loại thiết bị được sử dụng; trong trường hợp dùng thiết bị kiểu buồng dòng chảy, cần nói rõ loại buồng lớn hay buồng nhỏ;

– Thành phần, thể tích và nhiệt độ của môi trường hòa tan;

– Tốc độ quay hoặc tốc độ dòng của môi trường hòa tan;

– Thời gian, phương pháp và lượng dung dịch hòa tan lấy để thử hoặc các điều kiện để theo dõi liên tục;

– Phương pháp xác định lượng dược chất hòa tan trong mẫu thử;

– Tiêu chuẩn chấp nhận.

Việc lựa chọn loại thiết bị hòa tan được dùng tùy thuộc vào các tính chất hóa lý của dạng bào chế thuốc. Khi một lượng lớn môi trường hòa tan được chỉ định sử dụng để đảm bảo điều kiện "sink", hoặc khi sự thay đổi pH môi trường hòa tan trong quá trình thử là cần thiết, thiết bị kiểu buồng dòng chảy thường được ưu tiên sử dụng.

**Các điều kiện thử**

Việc dùng thiết bị kiểu giỏ quay hay thiết bị kiểu cánh khuấy, nói chung là dựa trên nguyên tắc vận hành ở điều kiện "sink", có nghĩa là ở điều kiện đó, dược chất đã hòa tan vào dung dịch không có hiệu ứng đáng kể làm thay đổi độ hòa tan của phần dược chất còn lại. Thông thường, điều kiện "sink" có được khi thể tích môi trường hòa tan ít nhất bằng từ 3 đến 10 lần thể tích cần để bão hòa lượng hoạt chất.

Nói chung, nước thường được dùng làm dung môi để chuẩn bị môi trường hòa tan. Các thành phần của môi trường hòa tan được lựa chọn trên cơ sở đặc điểm hóa lý của dược chất và các tá dược sao cho các điều kiện môi trường này gần giống với điều kiện môi trường mà thuốc tiếp xúc sau khi uống. Điều cần đặc biệt quan tâm là pH và lực ion của môi trường hòa tan.

pH của môi trường hòa tan thường ở trong khoảng từ 1 đến 8. Trong những trường hợp cần thiết được biện giải thỏa đáng, có thể dùng môi trường hòa tan ở pH cao hơn. Đối với những giá trị pH thấp hơn ở vùng acid thì thường dùng dung dịch acid hydrocloric 0,1 M. Một số môi trường hòa tan được khuyến cáo sử dụng được mô tả ở phần sau.

Nước được dùng làm môi trường hòa tan chỉ khi đã chứng minh được là sự thay đổi pH không ảnh hưởng đến đặc tính hòa tan của hoạt chất.

Trong những trường hợp đặc biệt, môi trường hòa tan có thể chứa enzym, chất hoạt động bề mặt và một số chất vô cơ hay hữu cơ khác. Để thử những chế phẩm chứa dược chất khó tan trong nước, có thể cần phải làm thay đổi môi trường hòa tan. Trong những trường hợp này, nên thêm vào môi trường hòa tan chất hoạt động bề mặt ở nồng độ thấp và tránh dùng các dung môi hữu cơ.

Không khí hòa tan trong môi trường hòa tan có thể ảnh hưởng tới kết quả của phép thử. Ảnh hưởng này càng rõ rệt đối với thiết bị buồng dòng chảy, vì thế, việc loại khí khỏi môi trường hòa tan là cần thiết nhằm tránh sự tạo thành bong bóng khí trong buồng dòng chảy. Phương pháp loại khí thích hợp như sau: Khuấy nhẹ và làm ấm môi trường lên khoảng 41 °C, lọc ngay dưới chân không, dùng màng lọc có kích thước lỗ lọc 0,45 µm hay bé hơn, đồng thời khuấy mạnh và tiếp tục khuấy trong chân không khoảng 5 min. Các kỹ thuật loại khí khác cũng có thể được sử dụng.

Khi dùng thiết bị kiểu giỏ quay hoặc kiểu cánh khuấy, thể tích môi trường hòa tan thường là 500 ml đến 1000 ml. Tốc độ khuấy thường được chọn là từ 50 r/min đến 100 r/min; tốc độ này không được vượt quá 150 r/min.

Đối với thiết bị buồng dòng chảy, tốc độ dòng của môi trường hòa tan thường đặt giữa 4 ml/min và 50 ml/min.

**Môi trường hòa tan**

Những môi trường sau (xem Bảng 11.4.5) có thể được sử dụng làm môi trường hòa tan.

*Bảng 11.4.5* - Những ví dụ về môi trường hòa tan

| pH | Môi trường hòa tan |
|---|---|
| pH 1,0 | HCl |
| pH 1,2 | NaCl, HCl |
| pH 1,5 | NaCl, HCl |
| pH 4,5 | Đệm acetat hoặc đệm phosphat |
| pH 5,5 và 5,8 | Đệm acetat hoặc đệm phosphat |
| pH 6,8 | Đệm phosphat |
| pH 7,2 và 7,5 | Đệm phosphat |

Thành phần và cách pha chế các môi trường này được chỉ ra dưới đây:

***Môi trường acid hydrocloric***

*Dung dịch acid hydrocloric 0,2 M (TT).*

*Dung dịch natri clorid 0,2 M:* Hòa tan 11,69 g *natri clorid (TT)* trong *nước* rồi pha loãng với *nước* đến đủ 1000,0 ml.

Để pha chế các môi trường có pH khác nhau, lấy 250 ml *dung dịch natri clorid 0,2 M* cho vào một bình định mức 1000 ml, thêm một thể tích *dung dịch acid hydrocloric 0,2 M (TT)* như ghi trong Bảng 11.4.6 rồi thêm *nước* vừa đủ đến vạch.

*Bảng 11.4.6* - Môi trường acid hydrocloric

| pH | HCl (ml) |
|---|---|
| 1,2 | 425,0 |
| 1,3 | 336,0 |
| 1,4 | 266,0 |
| 1,5 | 207,0 |
| 1,6 | 162,0 |
| 1,7 | 130,0 |
| 1,8 | 102.0 |
| 1,9 | 81,0 |
| 2,0 | 65,0 |
| 2,1 | 51,0 |
| 2,2 | 39,0 |

Cũng có thể thay thế *natri clorid (TT)* bằng *kali clorid (TT)* trong pha chế các môi trường acid hydrocloric.

***Các dung dịch đệm acetat***

*Dung dịch acid acetic 2 M:* Hòa trộn 120,0 g *acid acetic băng (TT)* với *nước* vừa đủ 1000,0 ml.

*Dung dịch đệm acetat pH 4,5:* Hòa tan 2,99 g *natri acetat (TT)* trong *nước*. Thêm 14,0 ml *dung dịch acid acetic 2 M* rồi pha loãng với *nước* vừa đủ 1000,0 ml.

*Dung dịch đệm acetat pH 5,5:* Hòa tan 5,98 g *natri acetat (TT)* trong *nước*. Thêm 3,0 ml *dung dịch acid acetic 2 M* rồi pha loãng với *nước* vừa đủ 1000,0 ml.

*Dung dịch đệm acetat pH 4,8:* Hòa tan 6,23 g *natri acetat (TT)* trong *nước*. Thêm 2,1 ml *dung dịch acid acetic 2 M* rồi pha loãng với *nước* vừa đủ 1000,0 ml.

***Các dung dịch đệm phosphat***

Để pha chế đệm phosphat với các pH khác nhau như trong Bảng 11.4.7, lấy 250 ml *dung dịch kali dihydrophosphat 0,2 M (TT)* cho vào một bình định mức 1000 ml, thêm một thể tích *dung dịch natri hydroxyd 0,2 M (TT)* ghi trong bảng rồi pha loãng với nước cho đủ 1000,0 ml.

*Bảng 11.4.7* - Thành phần các đệm phosphat

| pH | 5,8 | 6,0 | 6,2 | 6,4 | 6,6 | 6,9 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| NaOH (ml) | 18,0 | 28.0 | 40,5 | 58,0 | 82,0 | 112.0 |
| pH | 7,0 | 7,2 | 7,4 | 7,6 | 7,8 | 8,0 |
| NaOH (ml) | 145.5 | 173,5 | 195,5 | 212,0 | 222,5 | 230,5 |

***Các dung dịch đệm phosphat khác***

*Dung dịch đệm phosphat pH 4,5:* Hòa tan 13,61 g *kali dihydrophosphat (TT)* trong 750 ml *nước*. Điều chỉnh pH nếu cần bằng *dung dịch natri hydroxyd 0,1 M (TT)* hoặc bằng *acid hydrocloric 0,1 M (TT)*. Pha loãng với *nước* đủ 1000,0 ml.

*Dung dịch đệm phosphat pH 5,5 (TT).*

*Dung dịch đệm phosphat pH 6,8 (TT).*

*Đệm phosphat pH 7,2 (TT).*

*Dung dịch đệm phosphat 0,33 M pH 7,5 (TT).*

***Dịch ruột giả pH 6,8***

Hòa trộn 250 ml dung dịch chứa 6,8 g *kali dihydrophosphat (TT)*, 77 ml *dung dịch natri hydroxyd 0,2 M (TT)* và 500 ml *nước*. Thêm 10 g *bột tuyến tụy (TT)*, trộn đều và điều chỉnh pH nếu cần. Pha loãng với *nước* đủ 1000,0 ml.

***Dịch dạ dày giả***

Hòa trộn tan 2,0 g *natri clorid (TT)* và 3,2 g *bột pepsin (TT)* trong *nước*. Thêm 80 ml *acid hydrocloric 1 M (TT)* rồi pha loãng với *nước* vừa đủ 1000 ml. Bột pepsin có thể không cần, nếu có yêu cầu.

**Tăng dần pH**

Đối với phép thử độ hòa tan với pH tăng dần, có thể áp dụng một trong các trình tự sau:

| Thời gian (h) | 0 - 1 | 1 - 2 | 2 - 3 | 3 - 4 | 4 - 5 | 5 - 6 | 6 - 7 | 7 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| pH | 1.0 | | | | | | | |
| pH | 1,2 | | | | 6,8 | | | |
| pH | 1,2 | 2,5 | 4,5 | | 7,0 | | 7,5 | |
| pH | 1,5 | | 4,5 | | | 7,2 | | |

Để đạt được sự thay đổi pH, có thể thực hiện một trong các cách sau:

Thay thế một dung dịch đệm bằng một dung dịch đệm khác (thay toàn bộ);

Rút bỏ chỉ một nửa thể tích môi trường hòa tan mỗi lần (phương pháp thay thế một nửa) rồi bù vào bằng dung dịch đệm có pH cao hơn; ví dụ: pH khởi đầu là 1,2 và dung dịch đệm thay thế là đệm phosphat pH 7,5;

Thêm vào dung dịch khởi đầu ở pH 1,5 một lượng bột hỗn hợp chứa *tris(hydroxymethyl)aminomethan (TT)* và *natri acetat khan (TT)* để thu được dung dịch pH 4,5 và một lượng lần thứ 2 để thu được dung dịch pH 7,2 như mô tả dưới đây:

*Dung dịch acid hydrocloric pH 1,5:* Hòa tan 2 g *natri clorid (TT)* trong *nước* thêm 31,6 ml *dung dịch acid hydrocloric 1 M (TT)* rồi pha loãng với *nước* vừa đủ 1000 ml;

*Dung dịch đệm pH 4,5:* Trộn đều 2,28 g *tris(hydroxymethyl) aminomethan (TT)* và 1,77 g *natri acetat khan (TT)*. Hòa tan hỗn hợp này trong *dung dịch acid hydrocloric pH 1,5* ở trên;

*Dung dịch đệm pH 7,2:* Trộn đều 2,28 g *tris(hydroxymethyl) aminomethan (TT)* và 1,77 g *natri acetat khan (TT)*. Hòa tan hỗn hợp này trong *dung dịch đệm pH 4,5* ở trên.
Thiết bị buồng dòng chảy có thể được dùng thử độ hòa tan trong môi trường thay đổi liên tục pH.

**Đánh giá và thẩm định**
Do bản chất của phép thử độ hòa tan, chất lượng thiết kế là yếu tố đánh giá quan trọng đối với thiết bị thử độ hòa tan *in vitro*. Bất kỳ một sai lệch nào như rung động hay lắc lư quá mức do phần cơ khí không hoàn hảo đều cần phải được loại trừ.
Việc đánh giá thiết bị thử độ hòa tan cần xem xét các kích thước và dung sai của thiết bị. Những thông số quan trọng nhất của phép thử như nhiệt độ và thể tích môi trường hòa tan, tốc độ quay hay tốc độ dòng, lượng mẫu thử cần lấy và qui trình thử cần phải định kỳ theo dõi đánh giá trong các khoảng thời gian sử dụng thiết bị.
Thiết bị thử độ hòa tan có thể được theo dõi đánh giá bằng cách thử một sản phẩm đối chiếu nhạy cảm với các điều kiện thủy động học. Những phép thử này có thể được thực hiện định kỳ hoặc liên tục để so sánh với các phòng kiểm nghiệm khác.
Trong quá trình thử, cần phải quan sát và kiểm tra một cách chặt chẽ. Điều này đặc biệt quan trọng khi cần biện giải bất kỳ một kết quả nào lọt ra ngoài khoảng mong đợi.
Việc kiểm định hệ thống thử độ hòa tan tự động đối với bộ phận lấy mẫu và bộ phận phân tích, hoặc việc pha chế môi trường hòa tan và vận hành phép thử, cần phải xem xét độ chính xác, độ đúng và sự tránh nhiễm tạp do pha loãng, chuyển vận, làm sạch và các qui trình điều chế dung môi hay chuẩn bị mẫu.

**Yêu cầu về độ hòa tan đối với các dạng thuốc uống**
Yêu cầu về độ hòa tan được biểu thị bằng giá trị Q, là phần trăm lượng dược chất hòa tan so với lượng ghi trên nhãn trong khoảng thời gian qui định.
*Dạng thuốc giải phóng tức thời (dạng quy ước)*
Trong hầu hết các trường hợp, khi thử trong các điều kiện đã được khảo sát và chứng minh là phù hợp, tiêu chuẩn chấp nhận ở bước $S_1$ là ít nhất 80 % lượng dược chất được giải phóng trong khoảng thời gian quy định, thông thường là 45 min hoặc ít hơn. Điều này tương ứng với giá trị Q bằng 75 %, đối chiếu với Bảng 11.4.1, ở bước $S_1$, mỗi một giá trị của 6 đơn vị thử không được ít hơn Q + 5 % tức là không ít hơn 80 %.
Thông thường, tiêu chuẩn chấp nhận tại một thời điểm là đủ để chứng minh rằng phần lớn dược chất đã được giải phóng, tuy vậy trong một số trường hợp cần phải đánh giá thêm một thời điểm hoặc nhiều hơn để chứng minh chế phẩm đáp ứng yêu cầu về độ hòa tan.
*Dạng thuốc giải phóng kéo dài*
Tiêu chuẩn độ hòa tan đối với dạng thuốc thuốc giải phóng kéo dài thường bao gồm từ 3 thời điểm thử trở lên. Thời điểm thử đầu tiên nhằm kiểm tra sự giải phóng dược chất nhanh không được định trước (sự "bùng" liều). Vì thế thông thường yêu cầu lượng dược chất được giải phóng tại thời điểm này nằm trong khoảng 20 % đến 30 %. Thời điểm thứ hai xác định cách thức hòa tan của chế phẩm và thường khoảng 50 % lượng dược chất được giải phóng. Thời điểm thử cuối cùng nhằm đảm bảo rằng sự giải phóng dược chất gần như hoàn tất, có nghĩa là trên 80 % lượng dược chất đã được giải phóng.
*Dạng thuốc giải phóng muộn*
Dạng thuốc giải phóng muộn có thể giải phóng dược chất theo nhiều phân đoạn cách quãng hay giải phóng toàn bộ một lần tùy theo thiết kế công thức bào chế khi được thử trong môi trường hòa tan khác nhau, ví dụ trong các điều kiện pH tăng dần. Tiêu chuẩn độ hòa tan, vì thế, phải được xác định cho từng trường hợp một.
Những dạng thuốc kháng dịch vị yêu cầu ít nhất 2 thời điểm thử theo trình tự trước sau và 2 tiêu chuẩn khác nhau trong một phép thử song song. Trong phép thử theo trình tự, thời điểm thử thứ nhất có một giới hạn trên và được thử sau 1 h hoặc sau 2 h trong môi trường acid, còn điểm thử sau tại khoảng thời gian định trước trong một dung dịch đệm thích hợp (thường là pH 6,8).
Trong hầu hết các trường hợp, tiêu chuẩn chấp nhận ở bước $B_1$ là ít nhất 80 % lượng dược chất được giải phóng. Điều này tương ứng với giá trị Q bằng 75 %, đối chiếu với Bảng 11.4.4, ở bước $B_1$, mỗi một giá trị của 6 đơn vị thử không được ít hơn Q + 5 % tức là không ít hơn 80 %.

## 11.5 PHÉP THỬ ĐỘ RÃ CỦA THUỐC ĐẠN VÀ THUỐC TRỨNG

Phép thử này xác định thuốc đạn và thuốc trứng có rã hoặc mềm đi hay không trong khoảng thời gian qui định, khi được đặt trong môi trường lỏng ở những điều kiện thử nghiệm chỉ định.

**Thiết bị**
a) Ống trong suốt bằng thủy tinh hay chất dẻo, cao 60 mm với đường kính bên trong 52 mm, thành dày thích hợp (Hình 11.5.1).
b) Bộ phận kim loại gồm hai đĩa kim loại không gỉ, mỗi đĩa có 39 lỗ tròn đường kính 4 mm và được phân bố như chỉ dẫn trong Hình 11.5.1. Đường kính của đĩa gần tương đương với đường kính bên trong của ống bao. Hai đĩa cách nhau khoảng 30 mm. Bộ phận kim loại được treo bằng ba móc kẹp cách đều nhau, gắn vào thành ngoài ống bao như chỉ dẫn trong Hình 11.5.1.
Khi thử độ rã của viên nén đặt âm đạo, bộ phận kim loại được gắn ở dưới với đầu móc kẹp hướng lên trên như mô tả trong Hình 11.5.2.

**Cách thử**
***Thuốc đạn***
Đặt một viên lên đĩa dưới của bộ phận kim loại, đưa bộ phận này vào ống bao và gắn chặt vào thành ống. Nếu không có chỉ dẫn khác, đặt thiết bị thử vào một bồn chứa ít

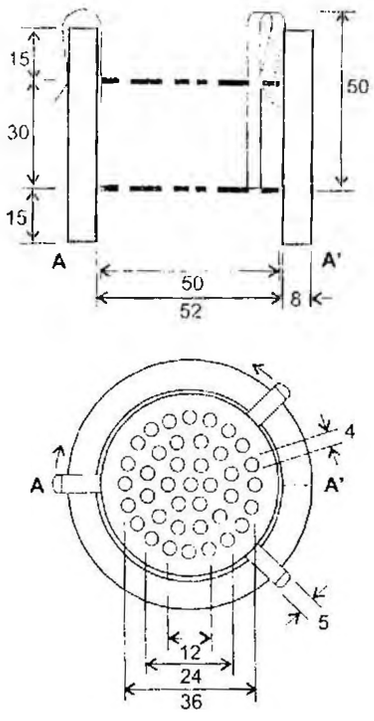
nhất 4 L nước ấm (36 °C đến 37 °C) có gắn dụng cụ khuấy chậm và giữ thiết bị thử ở vị trí thẳng đứng, ngập 90 mm so với mặt nước. Xoay ngược thiết bị thử 10 min một lần, tránh không để nhô lên khỏi mặt nước.
Lặp lại toàn bộ thử nghiệm với hai viên khác.
Thuốc được coi là rã, khi đáp ứng một trong những yêu cầu sau:
a) Tan hoàn toàn.
b) Phân tách ra các thành phần tạo thành, rồi tập trung trên bề mặt (các chất mỡ nóng chảy), chìm xuống đáy (bột không tan) hay hòa tan trong nước (các thành phần hòa tan), hoặc có thể phân tán theo một hay vài cách nêu trên.
c) Trở nên mềm, có thể biến dạng đáng kể, không nhất thiết bị phân tách hoàn toàn ra các thành phần tạo thành, nhưng không có nhân rắn chịu được sức ép của đũa thủy tinh.
Nếu không có quy định khác trong chuyên luận riêng, thời gian rã không quá 30 min đối với các thuốc đạn có tá dược thân mỡ và không quá 60 min đối với thuốc đạn tan trong nước.

***Nang đặt trực tràng***
Tiến hành như mô tả trong phần Thuốc đạn. Thuốc được coi là rã, khi vỏ gelatin vỡ ra, giải phóng các chất chứa bên trong.
Thời gian rã không được quá 30 min.

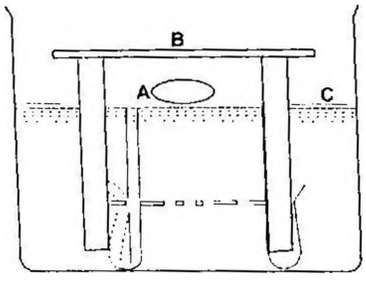
***Thuốc trứng***
Tiến hành và đánh giá như mô tả trong phần Thuốc đạn.
Nếu không có quy định khác trong chuyên luận riêng, thời gian rã không quá 60 min.

***Nang đặt âm đạo***
Tiến hành như mô tả trong phần Thuốc đạn và đánh giá như mô tả trong phần *Nang đặt trực tràng*.

***Viên nén đặt âm đạo***
Đặt thiết bị thử vào bồn có đường kính phù hợp, chứa nước ấm (36 °C đến 37 °C). Thêm dần nước ấm (36 °C đến 37 °C) cho đến khi mặt lỗ của đĩa kim loại vừa được phủ bằng một lớp nước. Đặt viên thuốc lên đĩa trên và đậy thiết bị bằng tấm kính để giữ các điều kiện ẩm thích hợp. Lặp lại toàn bộ thử nghiệm với hai viên khác.
Thuốc được coi là rã, khi đáp ứng một trong những yêu cầu sau:
a) Không còn cắn trên đĩa.
b) Nếu cắn vẫn còn, đấy chỉ là khối mềm hay rỗng xốp, không có nhân rắn chịu được sức ép của đũa thủy tinh.
Nếu không có quy định khác trong chuyên luận riêng, thời gian rã không quá 30 min.




*Hình 11.5.1* - Thiết bị thử độ rã của thuốc đạn và thuốc trứng
*(Kích thước tính bằng mm)*




A - Viên nén đặt âm đạo; B - Tấm kính; C - Mặt nước.

*Hình 11.5.2* - Thiết bị thử độ rã của viên nén đặt âm đạo

## 11.6 PHÉP THỬ ĐỘ RÃ CỦA VIÊN NÉN VÀ NANG

Phép thử này xác định viên nén hay nang có rã hay không trong khoảng thời gian quy định, khi được đặt trong môi trường lỏng ở những điều kiện thử nghiệm chỉ định.
Trong phép thử này, chế phẩm rã không có nghĩa là hòa tan hoàn toàn đơn vị chế phẩm hay thành phần hoạt chất.
Thuốc được coi là rã, khi đáp ứng một trong những yêu cầu sau:
a) Không còn cắn trên mặt lưới, trừ những mảnh vỏ bao không tan của viên nén hoặc vỏ nang trên mặt lưới; hoặc dính vào mặt dưới của đĩa, nếu sử dụng đĩa.
b) Nếu còn cắn, đấy là khối mềm không có nhân khô.

Sử dụng thiết bị A cho viên nén và nang cỡ bình thường (không dài quá 18 mm). Sử dụng thiết bị B cho viên nén và nang cỡ lớn.

**Thiết bị A: Áp dụng cho viên nén và nang cỡ bình thường**

***Thiết bị***

Thiết bị A thử độ rã viên nén và nang gồm:

a) Giá đỡ ống thử.

b) Cốc đáy bằng dung tích 1 L, chiều cao (149 ± 11) mm, và đường kính trong (109 ± 9) mm để chứa môi trường thử.

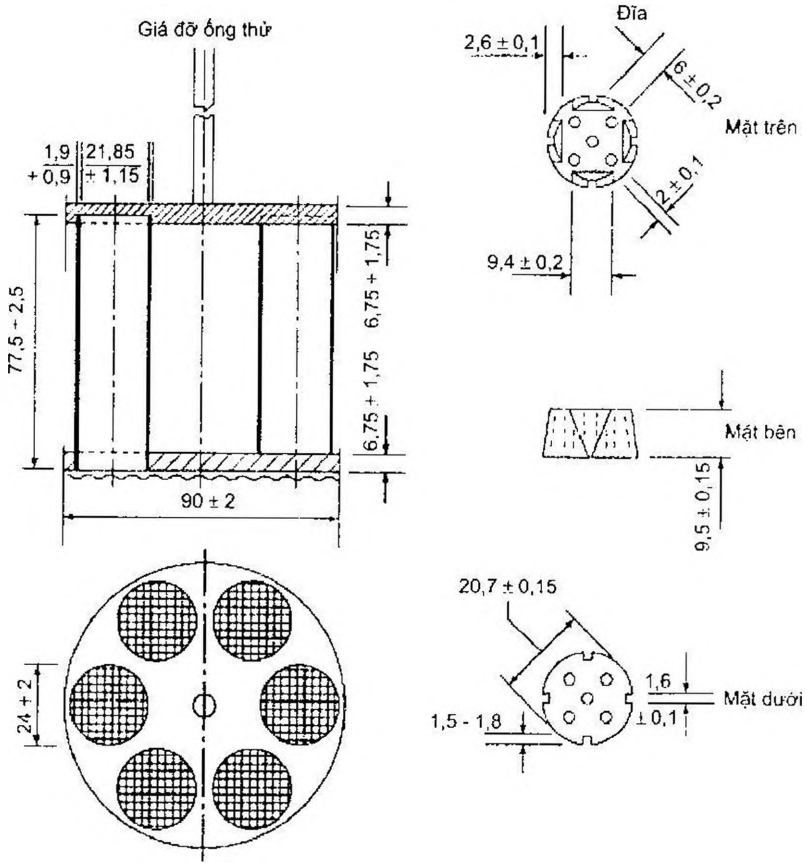
c) Bộ phận điều nhiệt để làm nóng môi trường thử trong khoảng 35 °C đến 39 °C.

d) Bộ phận cơ chuyển động lên xuống cho giá đỡ ống thử ở tần số hằng định trong khoảng 29 r/min đến 32 r/min, với biên độ (55 ± 2) mm. Thể tích môi trường thử trong cốc phải đủ, để khi giá đỡ ống thử ở vị trí cao nhất, lưới kim loại phải ngập sâu ít nhất 15 mm so với bề mặt chất lỏng, còn khi ở vị trí thấp nhất, lưới kim loại phải cách đáy cốc ít nhất 25 mm và miệng các ống thử vẫn ở trên bề mặt chất lỏng. Thời gian để giá đỡ ống thử đi lên phải bằng với thời gian giá đỡ ống thử đi xuống và sự thay đổi của hướng chuyển động phải nhẹ nhàng không được đột ngột. Giá đỡ ống thử phải chuyển động thẳng đứng theo trục của nó, không được dao động ngang hoặc di chuyển ra khỏi trục thẳng đứng.

*Giá đỡ ống thử*: Giá đỡ ống thử bao gồm 6 ống trong suốt hở đầu, các ống dài (77,5 ± 2,5) mm, có đường kính trong (21,85 ± 1,15) mm và thành ống dày (1,9 ± 0,9) mm. Các ống được giữ ở vị trí thẳng đứng bởi hai đĩa, có đường kính (90 ± 2) mm và dày (6,75 ± 1,75) mm; có 6 lỗ, mỗi lỗ có đường kính (24 ± 2) mm, cách đều tâm đĩa và cách đều các lỗ còn lại. Gắn vào mặt dưới của đĩa bên dưới là một lưới kim loại, dệt hình vuông, có kích thước lỗ lưới (2,0 ± 0,2) mm và đường kính dây kim loại là (0,615 ± 0,045) mm. Các bộ phận được lắp ráp và được giữ chắc chắn bằng 3 ốc vít đi qua 2 đĩa. Giá đỡ ống thử được treo phù hợp vào bộ phận chuyển động tại một điểm trên trục của nó.

Thiết kế của giá đỡ ống thử có thể thay đổi, nhưng tiêu chuẩn của ống thủy tinh và lưới kim loại phải đúng quy định. Giỏ phải có kích thước như quy định ở Hình 11.6.1.

*Đĩa*: Chỉ được sử dụng đĩa nếu có chỉ dẫn hoặc được cho phép trong chuyên luận riêng hoặc chuyên luận chung tương ứng. Mỗi ống thử của giá đỡ ống thử có một đĩa hình trụ, đường kính (20,7 ± 0,15) mm và dày (9,5 ± 0,15) mm. Đĩa được làm bằng chất dẻo trong suốt có tỷ trọng riêng 1,18 đến 1,20. Đĩa có 5 lỗ song song theo trục đĩa và xuyên qua đĩa, 1 lỗ ở chính giữa, 4 lỗ còn lại nằm cách đều nhau trên vòng tròn bán kính (6 ± 0,2) mm tính từ tâm, các lỗ có đường kính (2 ± 0,1) mm. Có 4 rãnh hình thang, cân xứng, trên thành của đĩa, gần như vuông góc với bề mặt




*Hình 11.6.1* - Thiết bị thử độ rã của viên nén và nang cỡ bình thường
*(Kích thước tính bằng mm)*

đĩa, bề mặt song song của nó trùng với hai mặt của đĩa và song song với trục nối 2 lỗ cạnh nhau, cách trục đĩa 6 mm. Cạnh đáy nhỏ của hình thang trên đáy của đĩa, có chiều dài (1,6 ± 0,1) mm và trung tâm của cạnh có độ sâu 1,5 đến 1,8 mm tính từ chu vi của đĩa. Cạnh đáy lớn của hình thang ở trên đỉnh của đĩa có chiều dài (9,4 ± 0,2) mm và trung tâm của cạnh có độ sâu (2,6 ± 0,1) mm tính từ chu vi của đĩa. Tất cả các mặt của đĩa phải phẳng.

Nếu sử dụng đĩa như chỉ dẫn, cho mỗi đĩa vào 1 ống và vận hành thiết bị. Đĩa phải đáp ứng kích thước như quy định ở Hình 11.6.1.

Việc sử dụng đĩa cải tiến có hệ thống phát hiện tự động có thể được sử dụng theo chỉ dẫn hoặc cho phép. Đĩa này phải đáp ứng yêu cầu về tỷ trọng và kích thước theo chuyên luận này.

***Phương pháp thử***

Nếu không có chỉ dẫn khác trong chuyên luận riêng, cho vào mỗi ống thử một viên nén hoặc nang. Nếu có chỉ dẫn trong chuyên luận chung tương ứng, cho một đĩa vào mỗi ống. Treo giá đỡ ống thử trong cốc có chứa môi trường theo chỉ dẫn được duy trì ở (37 ± 2) °C và vận hành thiết bị theo thời gian quy định. Lấy giá đỡ ống thử ra khỏi chất lỏng và quan sát chế phẩm thử. Mẫu thử đạt yêu cầu nếu tất cả 6 viên đều rã. Nếu có 1 đến 2 viên không rã, lặp lại phép thử với 12 viên khác. Mẫu thử đạt yêu cầu nếu không dưới 16 trong số 18 viên thử rã.

**Thiết bị B: Áp dụng cho viên nén và nang cỡ lớn**

***Thiết bị***

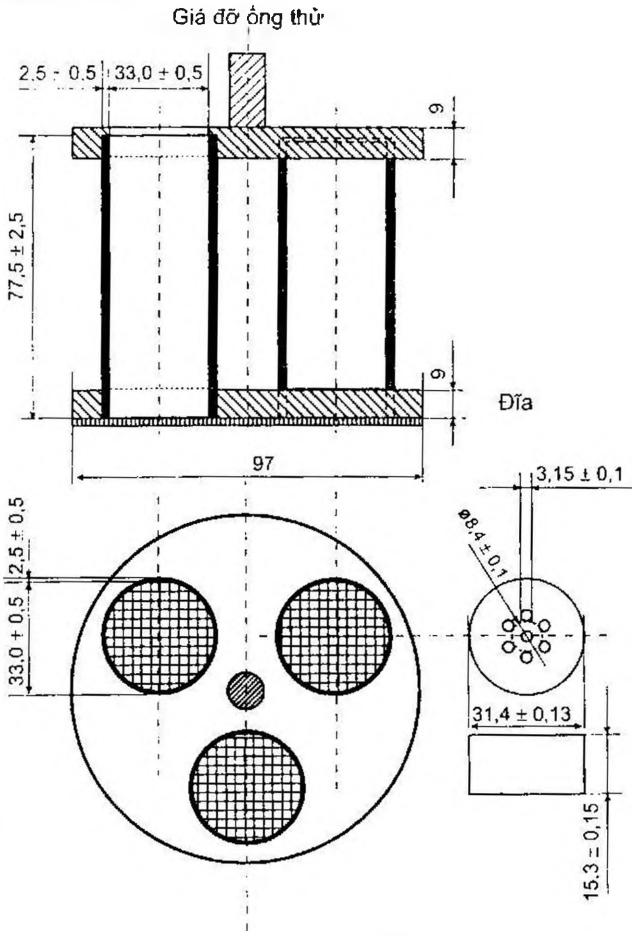
Thiết bị B có cấu tạo tương tự như thiết bị A, nhưng khác về cấu tạo của giá đỡ ống thử và đĩa.

*Giá đỡ ống thử*: Giá đỡ ống thử bao gồm 3 ống trong suốt hở đầu, các ống dài (77,5 ± 2,5) mm, có đường kính trong (33,0 ± 0,5) mm và thành ống dày (2,5 ± 0,5) mm. Các ống được giữ ở vị trí thẳng đứng bởi hai đĩa nhựa, có đường kính 97 mm và dày 7 mm; có 3 lỗ. Các lỗ cách đều tâm đĩa và cách đều các lỗ còn lại. Gắn vào mặt dưới của đĩa bên dưới là một lưới kim loại, dệt hình vuông, bằng dây kim loại có đường kính (0,63 ± 0,03) mm và có kích thước lỗ lưới (2,0 ± 0,2) mm. Hai đĩa được cố định cách nhau 77,5 mm bằng 3 thanh kim loại chốt thẳng đứng ở ngoại biên. Một thanh kim loại được gắn chặt vào tâm đĩa nhựa phía trên, sao cho giá đỡ ống thử lắp ráp được với bộ phận cơ có khả năng vận hành giá đỡ chuyển động lên xuống nhẹ nhàng ở tần số hằng định trong khoảng 29 đến 32 r/min, với biên độ (55 ± 2) mm.

Thiết kế của giá đỡ ống thử có thể thay đổi, nhưng tiêu chuẩn của ống thủy tinh và lưới kim loại phải đúng quy định. Giá phải có kích thước như quy định ở Hình 11.6.2.

*Đĩa*: Chỉ được sử dụng đĩa nếu có chỉ dẫn hoặc được cho phép trong chuyên luận riêng hoặc chuyên luận chung tương ứng. Mỗi ống thử của giá đỡ ống thử có một đĩa hình trụ, đường kính (31,4 ± 0,13) mm và dày (15,3 ± 0,15) mm. Đĩa được làm bằng chất dẻo trong suốt có tỷ trọng riêng 1,18 đến 1,20. Đĩa có 7 lỗ song song theo trục đĩa và xuyên qua đĩa, các lỗ có đường kính (3,15 ± 0,1) mm, 1 lỗ ở chính giữa và 6 lỗ còn lại nằm cách đều nhau trên vòng tròn bán kính 4,2 mm tính từ tâm đĩa.

Nếu sử dụng đĩa như chỉ dẫn, cho mỗi đĩa vào 1 ống và vận hành thiết bị. Đĩa phải đáp ứng kích thước như quy định ở Hình 11.6.2.




ø: đường kính

*Hình 11.6.2* - Thiết bị thử độ rã của viên nén và nang cỡ lớn *(Kích thước tính bằng mm)*

***Phương pháp thử***

Nếu không có chỉ dẫn khác trong chuyên luận riêng, tiến hành thử với 6 viên nén hoặc nang trên 2 giá đỡ ống thử lắp song song hoặc lặp lại phép thử trên 1 giá đỡ ống thử. Cho vào mỗi ống thử một viên nén hoặc nang. Nếu có chỉ dẫn trong chuyên luận chung tương ứng, cho một đĩa vào mỗi ống. Treo giá đỡ ống thử trong cốc có chứa môi trường theo chỉ dẫn được duy trì ở (37 ± 2) °C và vận hành thiết bị theo thời gian quy định. Lấy giá đỡ ống thử ra khỏi chất lỏng và quan sát chế phẩm thử. Mẫu thử đạt yêu cầu nếu tất cả 6 viên đều rã.

## 11.7 PHÉP THỬ ĐỘ RÃ CỦA VIÊN BAO TAN TRONG RUỘT

### Thiết bị

Sử dụng thiết bị mô tả trong Phụ lục 11.6. Phép thử độ rã của viên nén và nang.

### Phương pháp thử

Cho một viên vào mỗi ống thử, không dùng đĩa, treo giá đỡ ống thử trong cốc chứa *dung dịch acid hydrocloric 0,1 N (TT)*, nếu không có chỉ dẫn khác trong chuyên luận riêng, vận hành thiết bị trong 120 min. Lấy giá đỡ ống thử ra khỏi chất lỏng. Trừ các mảnh vỏ bao, không một viên nào bị rã hay có dấu hiệu bị rạn nứt khiến hoạt chất bị hoà tan.

Thay chất lỏng trong cốc bằng *đệm phosphat hỗn hợp pH 6,8 (TT)*, cho đĩa vào ống và vận hành thiết bị trong 60 min. Lấy giá đỡ ống thử ra khỏi chất lỏng. Nếu mẫu thử không đạt yêu cầu do viên bị dính vào đĩa, lặp lại phép thử với 6 viên khác và không dùng đĩa. Mẫu thử đạt yêu cầu nếu tất cả sáu viên đều rã.

## 11.8 XÁC ĐỊNH GIỚI HẠN TIỂU PHÂN

### A. Xác định giới hạn tiểu phân không nhìn thấy bằng mắt thường

Tiểu phân trong thuốc tiêm và thuốc tiêm truyền là các hạt nhỏ không hòa tan, linh động, không phải là bọt khí, có nguồn gốc ngẫu nhiên từ bên ngoài.

Để xác định giới hạn tiểu phân có hai phương pháp mô tả dưới đây, Phương pháp 1 (dùng thiết bị đếm tiểu phân) và Phương pháp 2 (dùng kính hiển vi). Khi kiểm tra tiểu phân không nhìn thấy bằng mắt thường của thuốc tiêm và thuốc tiêm truyền, thường áp dụng Phương pháp 1. Tuy nhiên, đối với một số chế phẩm, phải áp dụng cả hai phương pháp để đánh giá.

Không phải tất cả các thuốc tiêm và thuốc tiêm truyền đều có thể kiểm tra được giới hạn tiểu phân không nhìn thấy bằng mắt thường bằng một trong hai phương pháp, hay cả hai phương pháp. Các chế phẩm không thật trong, hay có độ nhớt tăng cao, hoặc tạo bọt khí khi đổ vào thiết bị đếm tiểu phân, tiến hành thử theo Phương pháp 2. Nếu độ nhớt của chế phẩm quá cao, cản trở phương pháp kiểm tra, pha loãng với dung môi thích hợp để có thể tiến hành được thử nghiệm. Kết quả kiểm tra một đơn vị riêng lẻ hay nhóm các đơn vị chế phẩm không có giá trị đương nhiên đối với các đơn vị không được kiểm tra. Bởi vậy, cần xây dựng kế hoạch lấy mẫu đủ số lượng thống kê, để từ kết quả kiểm tra có thể đánh giá được giới hạn tiểu phân của cả nhóm lớn các đơn vị chế phẩm.

### Phương pháp 1: Dùng thiết bị đếm tiểu phân

#### *Quy định chung*

Tiến hành thử nghiệm trong các điều kiện hạn chế được nhiễm tiểu phân, tốt nhất là trong tủ lọc khí vô khuẩn.

Rửa thật cẩn thận dụng cụ thủy tinh và dụng cụ lọc (trừ màng lọc) bằng dung dịch tẩy rửa ấm, tráng lại bằng nước cho sạch hết chất tẩy. Ngay trước khi dùng, tráng lại các dụng cụ từ trên xuống dưới, bên ngoài, sau đó là bên trong với *nước không có tiểu phân (TT)*.

Tránh tạo bọt khí trong chế phẩm đem thử, đặc biệt là khi rót vào dụng cụ để tiến hành đếm tiểu phân.

Để kiểm tra môi trường có thích hợp cho thử nghiệm, dụng cụ thủy tinh có đủ sạch và nước sử dụng có hết tiểu phân hay không, tiến hành phép thử sau:

Kiểm tra giới hạn tiểu phân của 5 mẫu *nước không có tiểu phân (TT)*, mỗi mẫu 5 ml, theo phương pháp mô tả ở dưới. Nếu trong cả 25 ml nước thử có trên 25 tiểu phân kích thước bằng 10 µm hay lớn hơn, phải tiến hành lại các bước chuẩn bị cho đến khi môi trường, dụng cụ thủy tinh và nước thích hợp cho thử nghiệm.

#### *Dụng cụ*

Sử dụng thiết bị thích hợp hoạt động theo nguyên tắc cản ánh sáng, cho phép tự động xác định kích thước tiểu phân và số lượng tiểu phân theo kích thước đã chọn.

Chuẩn hóa thiết bị bằng các hạt cầu chuẩn kích thước 10 µm đến 25 µm. Phân tán hạt chuẩn trong *nước không có tiểu phân (TT)*. Tránh kết tụ tiểu phân trong quá trình phân tán.

#### *Cách tiến hành*

Trộn đều chế phẩm bằng cách lộn đi, lộn lại nhẹ nhàng dụng cụ chứa (đồ đựng) 20 lần liên tiếp. Nếu cần, tháo bỏ phần bảo vệ ngoài nắp đậy. Dùng tia *nước không có tiểu phân (TT)* rửa bề mặt nắp và cổ dụng cụ chứa (đồ đựng), mở nắp cẩn thận, tránh nhiễm tiểu phân từ bên ngoài. Loại bọt khí bằng cách để yên 2 min hoặc siêu âm.

Đối với thuốc tiêm và thuốc tiêm truyền có thể tích từ 25 ml trở lên, tiến hành thử với từng đơn vị. Đối với thuốc tiêm và thuốc tiêm truyền có thể tích nhỏ hơn 25 ml, gộp dung dịch của ít nhất 10 đơn vị trong một cốc sạch cho đủ 25 ml. Khi có chỉ dẫn đặc biệt, lấy dung dịch từ một số đơn vị thích hợp, pha loãng thành 25 ml với *nước không có tiểu phân (TT)* hoặc với dung môi thích hợp không có tiểu phân, khi *nước không có tiểu phân (TT)* không thích hợp. Thuốc bột để pha tiêm được hòa tan trong *nước không có tiểu phân (TT)* hoặc dung môi thích hợp không có tiểu phân, khi *nước không có tiểu phân (TT)* không thích hợp.

Số mẫu thử phải đủ lượng thống kê. Đối với thuốc tiêm và thuốc tiêm truyền có thể tích từ 25 ml trở lên, số mẫu thử có thể nhỏ hơn 10, phụ thuộc vào kế hoạch lấy mẫu đã đề ra.

Lấy 4 mẫu thử, mỗi mẫu không dưới 5 ml, đưa vào máy đếm tiểu phân theo kích thước bằng 10 µm hay lớn hơn và bằng 25 µm hay lớn hơn.

Loại bỏ kết quả của mẫu đầu tiên. Tính số lượng tiểu phân trung bình của chế phẩm đã thử.

#### *Đánh giá kết quả*

Đối với thuốc tiêm và thuốc tiêm truyền có thể tích lớn hơn 100 ml: Chế phẩm đạt yêu cầu phép thử, nếu trung bình trong mỗi ml có không quá 25 tiểu phân kích thước bằng 10 µm hay lớn hơn và không quá 3 tiểu phân kích thước bằng hay lớn hơn 25 µm.

Đối với thuốc tiêm và thuốc tiêm truyền có thể tích nhỏ hơn hoặc bằng 100 ml: Chế phẩm đạt yêu cầu phép thử, nếu

trung bình trong mỗi đơn vị đã kiểm tra có không quá 6000 tiểu phân kích thước bằng 10 µm hay lớn hơn và không quá 600 tiểu phân kích thước bằng 25 µm hay lớn hơn.
Nếu số lượng tiểu phân trung bình vượt quá giới hạn, kiểm tra chế phẩm bằng Phương pháp 2.

**Phương pháp 2: Dùng kính hiển vi**

***Quy định chung***

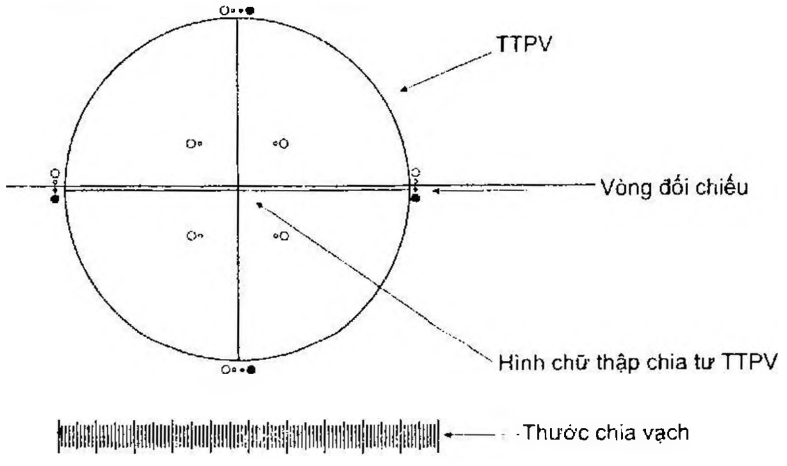
Tiến hành thử nghiệm trong các điều kiện hạn chế được nhiễm tiểu phân, tốt nhất là trong tủ lọc khí vô khuẩn.
Rửa thật cẩn thận dụng cụ thủy tinh và dụng cụ lọc (trừ màng lọc) bằng dung dịch tẩy rửa ấm, tráng lại bằng nước cho sạch hết chất tẩy. Ngay trước khi dùng, tráng lại các dụng cụ từ trên xuống dưới, bên ngoài, sau đó là bên trong với *nước không có tiểu phân (TT)*.
Để kiểm tra môi trường có thích hợp cho thử nghiệm, dụng cụ thủy tinh và màng lọc có đủ sạch, nước sử dụng có hết tiểu phân hay không, tiến hành phép thử sau:
Kiểm tra giới hạn tiểu phân của 50 ml *nước không có tiểu phân (TT)* theo phương pháp mô tả ở dưới. Nếu có quá 20 tiểu phân kích thước bằng 10 µm hay lớn hơn hoặc có quá 5 tiểu phân kích thước bằng 25 µm hay lớn hơn trên màng lọc, phải tiến hành lại các bước chuẩn bị cho đến khi môi trường, dụng cụ thủy tinh, màng lọc và nước thích hợp cho thử nghiệm.

***Dụng cụ***

Sử dụng kính hiển vi thích hợp, bộ lọc để lưu giữ các tiểu phân và màng lọc để kiểm tra.
Kính hiển vi có độ phóng đại (100 ± 10) lần, được trang bị một trắc vi thị kính hiệu chỉnh bằng một trắc vi vật kính, một bàn soi có khả năng cố định và xoay quanh toàn bộ diện tích lọc của màng lọc, hai nguồn chiếu thích hợp cấp ánh sáng phản xạ bổ sung cho ánh sáng chếch.
Trắc vi thị kính (Hình 11.8.1) bao gồm một vòng tròn lớn có hình chữ thập chia tư, các vòng đối chiếu trong suốt hay màu đen đường kính 10 µm và 25 µm ở độ phóng đại 100 lần, một thước chia vạch 10 µm đã được kiểm định theo chuẩn quốc gia hoặc quốc tế với sai số tương đối cho phép ± 2 %. Vòng tròn lớn được gọi là thị trường phân vạch (TTPV).
Trong hai nguồn chiếu sáng, một nguồn cấp trường sáng phản xạ từ trong kính hiển vi và nguồn bên ngoài bổ trợ hội tụ, có khả năng điều chỉnh để rọi sáng khúc xạ chếch ở góc 10° đến 20°.
Bộ lọc để lưu giữ các tiểu phân bao gồm màng lọc thích hợp và đế lọc bằng thủy tinh hoặc vật liệu khác thích hợp, nối với máy hút chân không.
Màng lọc kích thước thích hợp màu đen hoặc xám sẫm, với lỗ xốp bằng 1,0 µm hoặc nhỏ hơn.

***Cách tiến hành***

Trộn đều chế phẩm bằng cách lộn đi, lộn lại nhẹ nhàng dụng cụ chứa 20 lần liên tiếp. Nếu cần, tháo bỏ phần bảo vệ ngoài nắp đậy. Dùng tia *nước không có tiểu phân (TT)* rửa bề mặt nắp và cổ bình chứa, mở nắp cẩn thận, tránh nhiễm tiểu phân từ bên ngoài.
Đối với thuốc tiêm và thuốc tiêm truyền có thể tích từ 25 ml trở lên, tiến hành thử với từng đơn vị. Đối với thuốc tiêm và thuốc tiêm truyền có thể tích nhỏ hơn 25 ml, gộp dung dịch của ít nhất 10 đơn vị trong một cốc sạch cho đủ 25 ml. Khi có chỉ dẫn đặc biệt, lấy dung dịch từ một số đơn vị thích hợp, pha loãng thành 25 ml với *nước không có tiểu phân (TT)* hoặc với dung môi thích hợp không có tiểu phân, khi *nước không có tiểu phân (TT)* không thích hợp.
Thuốc bột để pha tiêm được hòa tan trong *nước không có tiểu phân (TT)* hoặc dung môi thích hợp không có tiểu phân, khi *nước không có tiểu phân (TT)* không thích hợp.
Số mẫu thử phải đủ lượng thống kê. Đối với thuốc tiêm và thuốc tiêm truyền có thể tích từ 25 ml trở lên, số mẫu thử có thể nhỏ hơn 10, phụ thuộc vào kế hoạch lấy mẫu đã đề ra.
Dùng vài ml *nước không có tiểu phân (TT)* làm ẩm bên trong đế lọc đã gắn màng lọc. Chuyển toàn bộ dung dịch thử đã chuẩn bị, hay dung dịch trong một đơn vị, vào phễu lọc và hút chân không. Nếu cần, đổ từng lượng nhỏ vào phễu cho đến khi toàn bộ thể tích dung dịch thử được lọc.




*Hình 11.8.1* - Trắc vi thị kính

Sau lần đổ cuối cùng, bắt đầu dùng tia *nước không có tiểu phân (TT)* rửa thành bên trong dễ lọc. Hút chân không cho tới khi bề mặt màng lọc không còn chất lỏng. Đặt màng lọc vào hộp lồng Petri và để khô tự nhiên bằng cách mở hé nắp hộp. Sau khi màng lọc khô, đặt hộp lồng Petri lên bàn soi của kính hiển vi và soi toàn bộ màng lọc dưới ánh sáng phản xạ từ nguồn chiếu. Đếm số tiểu phân bằng 10 µm hay lớn hơn và số tiểu phân bằng 25 µm hay lớn hơn. Hoặc, có thể đếm trên một phần của màng lọc, rồi tính số lượng trên cả màng lọc. Tính số lượng tiểu phân trung bình cho chế phẩm đem thử.

Quá trình phân loại tiểu phân được tiến hành bằng cách so sánh mỗi tiểu phân với các vòng đối chiếu 10 µm và 25 µm. Đường kính bên trong của các vòng đối chiếu trong suốt dùng để phân loại tiểu phân màu trắng và trong suốt, còn tiểu phân thẫm màu được phân loại bằng đường kính ngoài của các vòng đối chiếu màu đen.

Khi tiến hành kiểm tra theo Phương pháp 2, không phân loại hay liệt kê các chất vô định hình, nửa lỏng hoặc các chất không rõ ràng về hình thái khác, chúng có biểu hiện biến màu hay đổi màu trên màng lọc. Những chất này nhỏ, không biểu hiện rõ ràng, dạng sền sệt hay như có màng. Trong trường hợp này cần kiểm tra bổ sung bằng Phương pháp 1.

***Đánh giá kết quả***

Đối với thuốc tiêm và thuốc tiêm truyền có thể tích lớn hơn 100 ml: Chế phẩm đạt yêu cầu phép thử, nếu trung bình trong mỗi ml có không quá 12 tiểu phân kích thước bằng 10 µm hay lớn hơn và không quá 2 tiểu phân kích thước bằng 25 µm hay lớn hơn.

Đối với thuốc tiêm và thuốc tiêm truyền có thể tích nhỏ hơn hoặc bằng 100 ml: Chế phẩm đạt yêu cầu phép thử, nếu trung bình trong mỗi đơn vị đã kiểm tra có không quá 3000 tiểu phân kích thước bằng 10 µm hay lớn hơn và không quá 300 tiểu phân kích thước bằng 25 µm hay lớn hơn.

**B. Xác định độ trong (Xác định tiểu phân nhìn thấy bằng mắt thường)**

Tiểu phân trong thuốc tiêm và thuốc tiêm truyền là các hạt nhỏ không hòa tan, linh động, không phải là bọt khí, có nguồn gốc ngẫu nhiên từ bên ngoài.

Phép thử này là qui trình đơn giản để đánh giá độ trong của thuốc tiêm và thuốc tiêm truyền.

***Dụng cụ***

Thiết bị (Hình 11.8.2) là một bộ dụng cụ để soi bao gồm:

Bảng màu đen bề mặt mờ, kích thước thích hợp, gắn thẳng đứng.

Bảng màu trắng không lóa (không bóng), kích thước thích hợp, gắn thẳng đứng bên cạnh bảng màu đen.

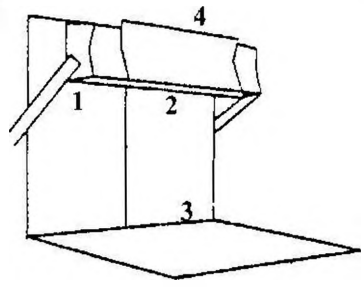
Hộp đèn có thể điều chỉnh với nguồn ánh sáng trắng được che chắn thích hợp và bộ khuếch tán ánh sáng thích hợp (như nguồn sáng bao gồm hai đèn huỳnh quang 13 W, mỗi ống dài 525 mm). Cường độ chiếu sáng tại vùng soi phải duy trì từ 2000 lux đến 3750 lux. Có thể phải sử dụng cường độ cao hơn đối với đồ chứa là thủy tinh màu hoặc plastic.

***Cách tiến hành***

Nếu không có chỉ dẫn khác trong chuyên luận riêng, lấy ngẫu nhiên 20 đơn vị. Loại bỏ mọi nhãn mác dán vào đồ chứa, rửa sạch và làm khô bên ngoài. Lắc nhẹ hay lộn đi, lộn lại chậm từng đơn vị, tránh không tạo thành bọt khí và quan sát khoảng 5 s trước bảng màu trắng. Tiến hành lặp lại trước bảng màu đen.

***Đánh giá kết quả***

Nếu có không quá một đơn vị có tiểu phân nhìn thấy bằng mắt thường, tiến hành kiểm tra lại với 20 đơn vị khác lấy ngẫu nhiên. Chế phẩm đạt yêu cầu phép thử, nếu có không quá một đơn vị trong số 40 đơn vị đem thử có tiểu phân nhìn thấy bằng mắt thường.




1. Bảng màu đen bề mặt mờ
2, 3. Bảng màu trắng không lóa
4. Hộp đèn có thể điều chỉnh

*Hình 11.8.2* - Dụng cụ để soi độ trong

## 11.9 PHÉP THỬ ĐỘ ĐỒNG ĐỀU ĐƠN VỊ LIỀU

Để đảm bảo tính đồng nhất của các đơn vị liều, mỗi đơn vị trong một lô phải chứa một lượng dược chất nằm trong khoảng giới hạn hẹp gần với giá trị hàm lượng ghi trên nhãn. Đơn vị liều là một đơn vị chế phẩm thuốc có chứa một lượng dược chất tương ứng với một liều đơn hoặc một phần của liều đơn.

Nếu không có qui định khác, phép thử này không áp dụng cho chế phẩm đơn liều dạng hỗn dịch, nhũ dịch hoặc gel dùng ngoài da. Các chế phẩm chứa vitamin và các nguyên tố vi lượng không cần xác định độ đồng đều đơn vị liều theo phương pháp đồng đều hàm lượng.

Thuật ngữ đồng đều đơn vị liều dùng để chỉ mức độ đồng nhất về lượng dược chất giữa các đơn vị liều. Vì vậy, nếu không có chỉ dẫn khác, phép thử này áp dụng cho từng dược chất có mặt trong chế phẩm.

Phép thử có thể thực hiện bằng 1 trong 2 phương pháp: Phương pháp đồng đều hàm lượng và phương pháp chênh lệch khối lượng.

Phương pháp đồng đều hàm lượng dựa trên cơ sở định lượng hàm lượng dược chất của từng đơn vị để xác định mỗi hàm lượng riêng lẻ có nằm trong giới hạn cho phép hay không. Phương pháp này có thể được áp dụng trong mọi trường hợp.

Phương pháp chênh lệch khối lượng được áp dụng trong các trường hợp sau:
Dung dịch thuốc đóng liều đơn và dung dịch trong nang mềm
Dạng thuốc rắn (bao gồm bột, cốm, thuốc rắn vô khuẩn) đóng liều đơn chứa một dược chất mà không có thêm bất kỳ dược chất khác hay tá dược.
Dạng thuốc rắn (bao gồm thuốc rắn vô khuẩn) đóng liều đơn, có hoặc không chứa thêm dược chất khác hay tá dược, được pha chế từ các dung dịch hòa tan hoàn toàn, được đông khô trong đồ đựng cấp 1 và trên nhãn có ghi phương pháp pha chế.
Dạng thuốc nang cứng, viên nén không bao hoặc bao phim chứa từ 25 mg dược chất hoặc dược chất chiếm từ 25 % khối lượng đơn vị (trường hợp nang cứng là khối lượng thuốc trong nang) trở lên, trường hợp dược chất khác chứa trong chế phẩm với hàm lượng thấp hơn thì đáp ứng yêu cầu đồng đều hàm lượng.
Phương pháp đồng đều hàm lượng áp dụng đối với tất cả các chế phẩm đơn liều khác không đáp ứng các điều kiện trên của phương pháp chênh lệch khối lượng.

**Phương pháp đồng đều hàm lượng**

Lấy không ít hơn 30 đơn vị, tiến hành theo hướng dẫn dưới đây cho từng dạng bào chế. Nếu quy trình tiến hành định lượng chế phẩm khác với phép thử đồng đều hàm lượng, có thể cần phải xác định hệ số hiệu chỉnh cho phương pháp đồng đều hàm lượng.

***Dạng bào chế rắn:*** Tiến hành định lượng riêng rẽ 10 đơn vị bằng phương pháp thích hợp. Tính giá trị chấp nhận (Xem bảng 11.9.2).

***Dạng bào chế lỏng:*** Tiến hành định lượng riêng rẽ 10 đơn vị bằng phương pháp thích hợp. Khi tiến hành định lượng, trộn đều chế phẩm trong điều kiện bình thường. Biểu diễn kết quả tính theo đơn vị liều. Tính giá trị chấp nhận (Xem bảng 11.9.2).

***Tính giá trị chấp nhận:***

Giá trị chấp nhận (AV) được tính theo công thức sau:

$$|M - \bar{X}| + ks$$

Các ký hiệu trong công thức được giải thích trong Bảng 11.9.2.

**Phương pháp chênh lệch khối lượng**

Phương pháp chênh lệch khối lượng được áp dụng căn cứ trên giả định dược chất được phân tán đồng đều trong thuốc. Tiến hành định lượng dược chất bằng phương pháp thích hợp trên một lượng mẫu nhất định. Kết quả thu được là hàm lượng phần trăm dược chất ($A$) tính theo nhãn. Lấy không ít hơn 30 đơn vị và tiến hành theo hướng dẫn dưới đây cho từng dạng bào chế.

***Viên nén không bao hoặc bao phim:*** Lấy 10 viên, cân chính xác từng viên. Tính hàm lượng phần trăm dược chất có trong từng viên dựa vào kết quả định lượng và khối lượng viên. Tính giá trị chấp nhận.

***Nang cứng:*** Cân chính xác 10 nang riêng biệt, đánh dấu để nhận biết từng nang, lấy toàn bộ thuốc trong nang ra bằng cách thích hợp. Cân chính xác từng vỏ nang rỗng, tính khối lượng thuốc trong mỗi nang bằng cách lấy khối lượng nang ban đầu trừ đi khối lượng vỏ nang rỗng tương ứng. Tính hàm lượng phần trăm dược chất trong mỗi nang dựa vào kết quả định lượng và khối lượng thuốc trong nang. Tính giá trị chấp nhận.

***Nang mềm:*** Cân chính xác 10 nang riêng biệt, lành lặn, đánh dấu để nhận biết từng nang. Dùng dao hoặc kéo khô, sạch để mở nang, loại bỏ toàn bộ thuốc trong nang và làm sạch bằng dung môi thích hợp. Để vỏ nang bay hết dung môi ở nhiệt độ phòng trong 30 min, chú ý tránh hiện tượng hút ẩm hay bay hơi nước của vỏ nang. Cân từng vỏ nang và tính khối lượng thuốc trong nang. Tính hàm lượng phần trăm dược chất trong mỗi nang dựa vào kết quả định lượng và khối lượng thuốc trong nang. Tính giá trị chấp nhận.

*Bảng 11.9.1* - Qui định điều kiện áp dụng phương pháp đồng đều hàm lượng (CU) và chênh lệch khối lượng (MV) đối với các dạng bào chế

| Dạng bào chế | Phân loại | | Liều và tỷ lệ dược chất | |
|---|---|---|---|---|
| | | | ≥ 25 mg và ≥ 25 % | < 25 mg và < 25 % |
| Viên nén | Không bao | | MV | CU |
| | Bao | Bao phim | MV | CU |
| | | Loại khác | CU | CU |
| Nang | Cứng | | MV | CU |
| | Mềm | Hỗn dịch, nhũ dịch, gel | CU | CU |
| | | Dung dịch | MV | MV |
| Chế phẩm dạng rắn đóng liều đơn | Một thành phần | | MV | MV |
| | Nhiều thành phần | Bột đông khô từ dung dịch | MV | MV |
| | | Loại khác | CU | CU |
| Dung dịch đóng liều đơn | | | MV | MV |
| Các dạng khác | | | CU | CU |

*Bảng 11.9.2* - Các yêu cầu để đánh giá kết quả

| Ký hiệu | Định nghĩa | Các điều kiện | Giá trị |
|---|---|---|---|
| $\overline{X}$ | Hàm lượng trung bình ($x_1$, $x_2$,... $x_n$) biểu thị ra phần trăm hàm lượng trên nhãn | - | - |
| $x_1, x_2, ..., x_n$ | Hàm lượng phần trăm dược chất theo nhãn của từng đơn vị | - | - |
| $n$ | Số đơn vị thử | - | - |
| $k$ | Hằng số chấp nhận | n = 10<br>n = 30 | 2,4<br>2,0 |
| $s$ | Độ lệch chuẩn của mẫu | - | $\left[\frac{\sum_{i=1}^{n}(x_i-\overline{X})^2}{n-1}\right]^{1/2}$ |
| RSD | Độ lệch chuẩn tương đối | - | $\frac{100s}{\overline{X}}$ |
| $M$ (TH1)<br>Áp dụng với<br>T ≤ 101,5 | Giá trị đối chiếu | $98,5\ \% \le \overline{X} \le 101,5\ \%$<br>$\overline{X} < 98,5\ \%$<br>$\overline{X} > 101,5\ \%$ | $M = \overline{X}$<br>$(AV = ks)$<br>$M = 98,5\ \%$<br>$(AV = 98,5\ \% - \overline{X} + ks)$<br>$M = 101,5\ \%$<br>$(AV = \overline{X} - 101,5\ \% + ks)$ |
| $M$ (TH2)<br>Áp dụng với<br>T > 101,5 | Giá trị đối chiếu | $98,5\ \% \le \overline{X} \le T$<br>$\overline{X} < 98,5\ \%$<br>$\overline{X} > T$ | $M = \overline{X}$<br>$(AV = ks)$<br>$M = 98,5\ \%$<br>$(AV = 98,5\% - \overline{X} + ks)$<br>$M = T\ \%$<br>$AV = (\overline{X} - T + ks)$ |
| Giá trị chấp nhận<br>*(AV)* | - | - | Công thức tổng quát:<br>$\lvert M - \overline{X} \rvert + ks$<br>Cách tính trong từng trường hợp cụ thể nêu ở trên |
| $L_1$ | Giá trị chấp nhận tối đa | - | $L_1$ = 15,0 nếu không có qui định khác |
| $L_2$ | Khoảng lệch tối đa được phép cho mỗi đơn vị thử so với giá trị M | Giới hạn dưới, không đơn vị nào có kết quả nhỏ hơn 0,75M<br>Giới hạn trên, không có đơn vị nào có kết quả lớn hơn 1,25M (tính dựa trên giá trị $L_2$ = 25,0) | $L_2$ = 25,0 nếu không có qui định khác |
| $T$ | Hàm lượng phần trăm dược chất theo nhãn mà mẫu thử phải đạt được vào thời điểm sản xuất. Nếu không có qui định trong chuyên luận riêng T = 100 %. | - | - |

***Dạng bào chế rắn không phải viên nén hay nang cứng:*** Tiến hành như với nang cứng. Tính giá trị chấp nhận.

***Dạng bào chế lỏng:*** Lấy 10 đơn vị, cân chính xác từng lượng thuốc lỏng lấy từ mỗi đơn vị trong điều kiện bình thường. Nếu cần, tính thể tích tương đương sau khi đã xác định được tỷ trọng. Tính hàm lượng phần trăm dược chất trong mỗi đơn vị dựa vào kết quả định lượng và lượng thuốc của từng đơn vị. Tính giá trị chấp nhận.

***Tính giá trị chấp nhận***

Tính giá trị chấp nhận (*AV*) như đối với phương pháp đồng đều hàm lượng, thay các giá trị hàm lượng của từng đơn vị bằng giá trị hàm lượng tính theo công thức dưới đây: $x_1, x_2, ..., x_n$ là hàm lượng dược chất của từng đơn vị thử. Trong đó:

$$x_i = w_i \times \frac{A}{W}$$

$w_1, w_2, ..., w_n$ là khối lượng của từng đơn vị thử.

$A$ là hàm lượng phần trăm dược chất tính theo nhãn, xác định bằng phương pháp thích hợp (phần định lượng).

$W$ là khối lượng trung bình của các đơn vị thử dùng trong phần định lượng.

**Đánh giá kết quả**

Nếu không có chỉ dẫn khác, áp dụng các yêu cầu sau để đánh giá kết quả.

***Đối với dạng thuốc rắn và lỏng:*** Chế phẩm đạt yêu cầu phép thử đồng đều đơn vị liều nếu giá trị chấp nhận tính trên 10 đơn vị đầu tiên nhỏ hơn hoặc bằng $L_1$ %. Nếu giá trị chấp nhận lớn hơn $L_1$ % thử tiếp 20 đơn vị khác và tính giá trị chấp nhận của cả 30 đơn vị. Chế phẩm đạt yêu cầu nếu giá trị chấp nhận nhỏ hơn hoặc bằng $L_1$ % và không có đơn vị nào có hàm lượng nhỏ hơn $(1 - L_2 \times 0{,}01)M$ hay lớn hơn $(1 + L_2 \times 0{,}01)M$. Nếu không có quy định khác $L_1 = 15$ và $L_2 = 25$.

## 11.10 PHÉP THỬ ĐỘ GIẢI PHÓNG DƯỢC CHẤT CỦA THUỐC DÁN THẤM QUA DA

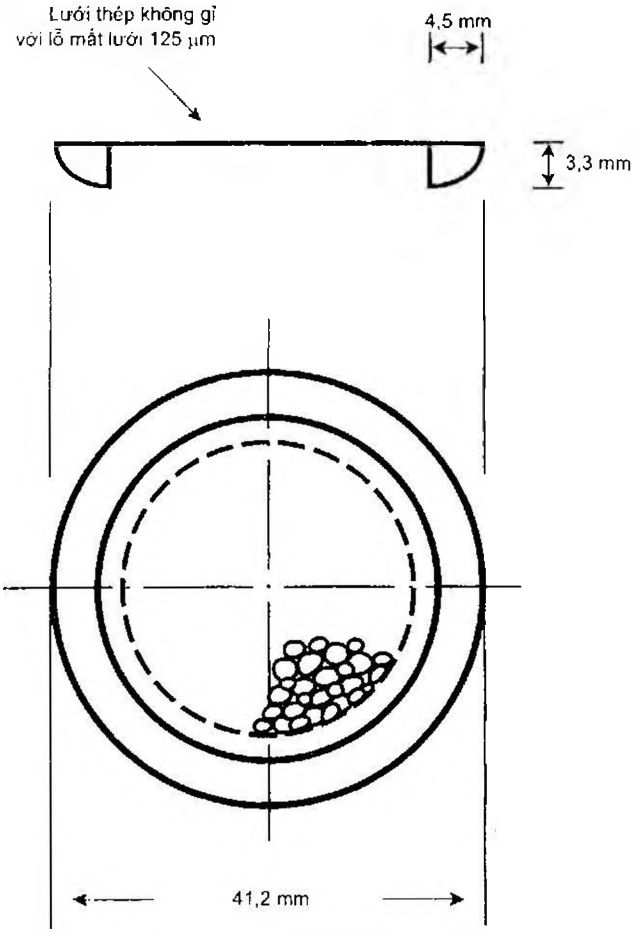
Phép thử này được dùng để xác định mức độ hòa tan các thành phần dược chất của dạng thuốc dán thấm qua da.

**Phương pháp dùng thiết bị có đĩa lưới inox**

***Thiết bị***: Dùng thiết bị thử độ hòa tan kiểu cánh khuấy như mô tả trong chuyên luận *Phép thử độ hòa tan của dạng thuốc rắn phân liều* (Phụ lục 11.4) có bổ sung thêm một bộ phận đĩa lưới inox hình tròn với lỗ mắt lưới 125 µm (Hình 11.9.1).

Bộ phận đĩa lưới inox giữ mẫu thử ở đáy của bình hòa tan và được thiết kế sao cho giảm thiểu thể tích chết giữa đĩa lưới inox và đáy bình. Bộ phận này cũng giữ cho miếng dán thử được căng phẳng, có mặt giải phóng thuốc ngửa lên trên và song song với đáy cánh khuấy. Phải luôn duy trì khoảng cách (25 ± 2) mm giữa đáy cánh khuấy và bề mặt đĩa lưới inox trong quá trình thử (Hình 11.9.2).

Nhiệt độ được giữ ổn định ở (32 ± 0,5) °C. Bình hòa tan có thể được đậy nắp để hạn chế bay hơi dung môi trong thời gian thử.



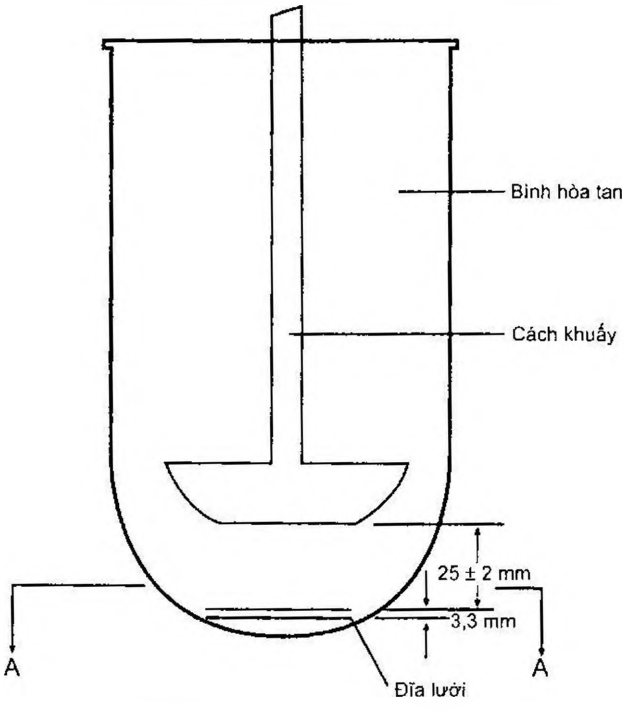

*Hình 11.10.1* - Bộ phận đĩa lưới inox

***Cách tiến hành***

Cho một thể tích môi trường hòa tan như chỉ dẫn vào bình hòa tan và làm ổn nhiệt môi trường ở nhiệt độ quy định. Đặt miếng thuốc dán cần thử lên đĩa lưới inox, giữ sao cho bề mặt giải phóng thuốc càng phẳng càng tốt. Miếng thuốc dán có thể gắn vào đĩa inox bằng keo dính hoặc bằng một dải băng dính hai mặt. Keo dính hoặc băng dính đều phải được thử trước chứng tỏ không gây trở ngại cho phép định lượng và không hấp phụ hoạt chất thuốc. Ấn nhẹ miếng thuốc dán có bề mặt giải phóng thuốc ngửa lên trên lên mặt của đĩa lưới inox đã có chất dính. Miếng dán thử chỉ nằm trên phần lưới inox, không được phủ trùm lên vành đĩa. Để làm được điều này, khi chế phẩm thuốc đồng nhất và được trải đều lên cốt của thuốc dán, có thể đo chính xác và cắt lấy những mảnh thuốc dán có kích thước thích hợp để thử. Đặt bộ phận đĩa inox đã gắn miếng thuốc dán thử nằm ngang trên đáy bình hòa tan sao cho mặt giải phóng dược

chất ngừa lên trên. Cho vận hành ngay cánh khuấy quay ở tốc độ quy định, chẳng hạn 100 r/min. Sau từng khoảng thời gian được định trước, rút mẫu thử ở vùng giữa của bề mặt môi trường hòa tan và mặt trên của cánh khuấy, và ở chỗ cách thành bình không dưới 1 cm.

Tiến hành định lượng mỗi mẫu dung dịch thử theo phương pháp được chỉ dẫn ở chuyên luận riêng, hiệu chỉnh sự giảm thể tích môi trường hòa tan nếu thấy cần thiết. Lặp lại phép thử với những miếng dán khác.




*Hình 11.10.2* - Cánh khuấy và đĩa lưới inox

***Đánh giá kết quả***

Mẫu thử đạt yêu cầu thử độ hòa tan nếu lượng dược chất giải phóng từ miếng thuốc dán thử, biểu thị bằng khối lượng tính trên 1 đơn vị diện tích bề mặt trong 1 đơn vị thời gian (ví dụ: $\mu g/cm^2/h$), phải nằm trong giới hạn quy định ở từng thời điểm lấy mẫu xác định.

**Phương pháp dùng thiết bị ống trụ quay**

***Thiết bị***

Dùng thiết bị thử độ hòa tan kiểu cánh khuấy như mô tả trong chuyên luận *Phép thử độ hòa tan của các dạng thuốc rắn phân liều* (Phụ lục 11.4), thay thế trục và cánh khuấy bằng một bộ phận khuấy hình ống trụ (Hình 11.9.3).

Mẫu thuốc dán đem thử được dính lên trên ống trụ khi bắt đầu mỗi phép thử. Khoảng cách giữa đáy bình hòa tan và ống trụ được duy trì ở (25 ± 2) mm trong suốt quá trình thử. Nhiệt độ được giữ ổn định ở (32 ± 0,5) °C. Bình hòa tan có thể được đậy nắp để hạn chế bay hơi dung môi trong thời gian thử.

***Cách tiến hành***

Cho một thể tích môi trường hòa tan như chỉ dẫn vào bình hòa tan và làm ổn nhiệt ở nhiệt độ quy định. Bỏ lớp bảo vệ miếng thuốc dán đem thử. Đặt mặt dính của miếng thuốc dán lên một màng có lỗ bằng vật liệu trơ thích hợp, màng này có kích thước lớn hơn miếng dán ít nhất 1 cm mỗi cạnh. Đặt màng mỏng có miếng thuốc dán thử lên trên một bề mặt sạch, để cho màng mỏng tiếp xúc với bề mặt này. Tiếp theo, tiến hành dán mẫu thử lên ống trụ bằng một trong hai cách sau đây:

Dùng một chất keo dính thích hợp bôi lên bờ cạnh của màng mỏng và nếu cần thiết bôi lên cả mặt sau của miếng thuốc dán thử.

Dùng một băng dính hai mặt dính vào thành ngoài của ống trụ.

Ép nhẹ mặt không có chất dính của miếng thuốc dán lên ống trụ sao cho bề mặt giải phóng thuốc tiếp xúc với môi trường hòa tan và trục dọc của dải thuốc dán bao vòng quanh ống trụ.

Keo dính hay băng dính đem dùng đều phải được thử trước chứng tỏ là không gây trở ngại cho phép định lượng và không hấp phụ dược chất.

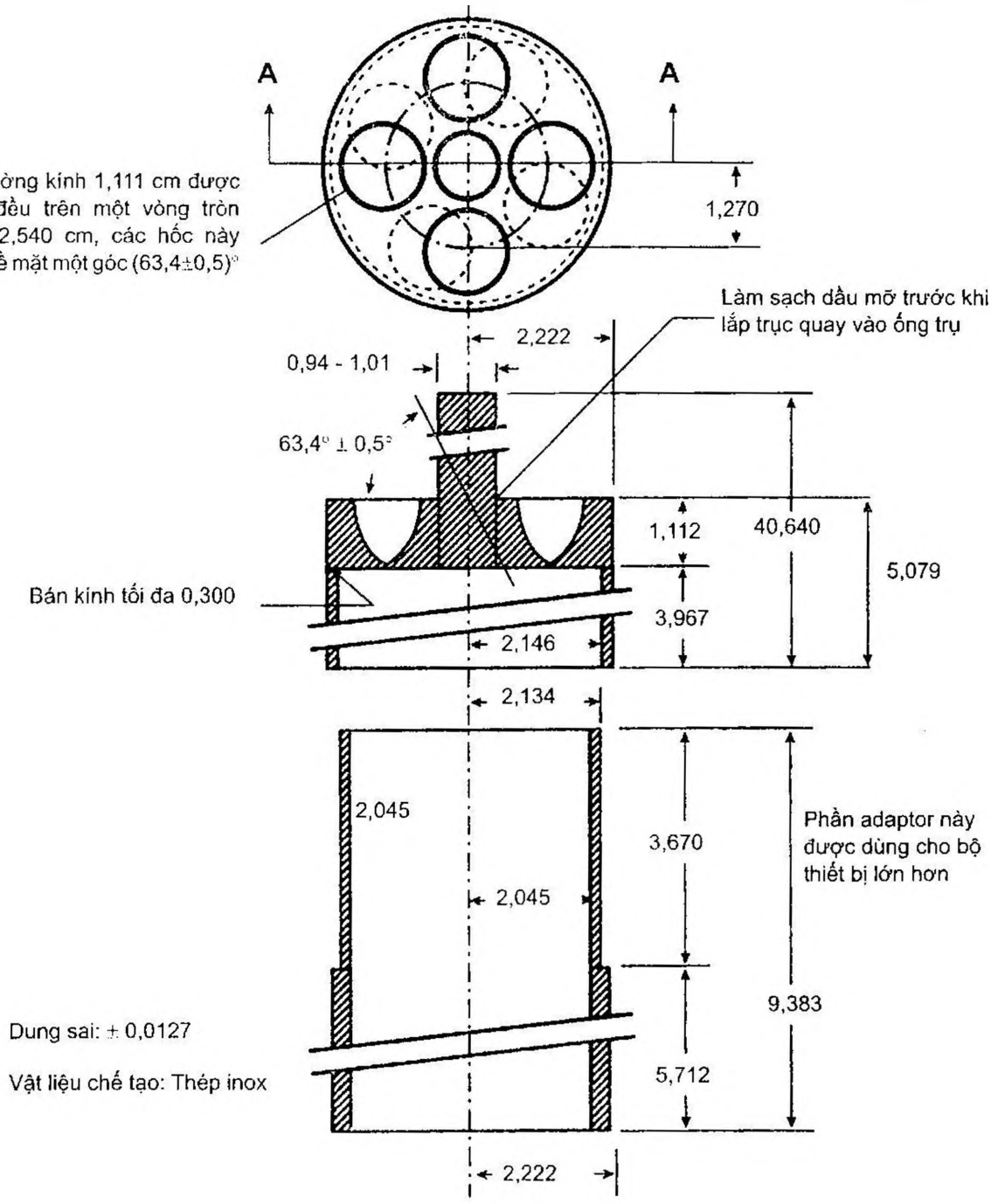
Đặt ống trụ vào thiết bị thử độ hòa tan rồi cho vận hành ngay ống trụ quay ở tốc độ quy định, chẳng hạn ở 100 r/min.

Sau từng khoảng thời gian được định trước, rút mẫu thử ở vùng giữa của bề mặt môi trường hòa tan và mặt trên của ống trụ quay, và ở chỗ cách thành bình không dưới 1 cm.

Tiến hành định lượng mỗi mẫu dung dịch như chỉ dẫn trong chuyên luận riêng, hiệu chỉnh sự giảm thể tích môi trường hòa tan nếu thấy cần thiết. Lặp lại phép thử với những miếng thuốc dán khác.

***Đánh giá kết quả***

Như Phương pháp dùng thiết bị có đĩa lưới inox.




*Hình 11.9.3* - Bộ phận khuấy hình ống trụ
*(Kích thước tính bằng cm)*