

PHỤ LỤC 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 nguy cơ xâm nhập của vi khuẩn vào 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 kháng khuẩn phải ghi trên nhãn thuốc. Các phương pháp phân tích sau đây áp dụng cho một số chất bảo quản kháng khuẩn thông dụng nhất, nhằm xác định sự có mặt của chất bảo quản với hàm lượng không vượt quá 20 % lượng ghi trên nhãn.

Nồng độ chất bảo quản kháng khuẩn được thêm vào thuốc tiêm đa liều hay đơn liều, 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 nồng độ tối thiểu còn tác dụng và công thức sản xuất phải được nghiên cứu sao cho nồng độ chất bảo quản kháng khuẩn luôn cao hơn mức nồng độ tối thiểu trong suốt thời hạn sử dụng. Tại thời điểm sản xuất, sản phẩm chứa lượng chất bảo quản kháng khuẩn được công bố (trong phạm vi ± 20 % dao động cho phép trong sản xuất và kiểm nghiệm). Lượng chất bảo quản kháng khuẩn được công bố trên nhãn 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 benzyl alcol, clorobutanol, phenol; 4 ester đồng đẳng của acid p-hydroxybenzoic (methyl, ethyl, propyl và butyl parabens); 2 hợp chất cơ kim thủy ngân (phenylmercuric nitrat và thimerosal). Xác định phenylmercuric nitrat dùng phương pháp cực phổ, xác định thimerosal và 4 ester đồng đẳng của acid p-hydroxybenzoic dùng phương pháp sắc ký lỏng và xác định benzyl alcol, clorobutanol, phenol dùng phương pháp sắc ký khí.

Phương pháp sắc ký khí

Quy trình chung về phương pháp sắc ký khí trình bày dưới đây có thể áp dụng để định lượng benzyl alcol, clorobutanol, phenol. Chuẩn bị dung dịch chuẩn nội và dung dịch chuẩn cho mỗi chất bảo quản kháng khuẩn theo hướng dẫn dưới đây. Trừ khi có hướng dẫn khác trong chuyên luận riêng, chuẩn bị dung dịch thử từ một lượng chính xác mẫu thử và dung dịch chuẩn nội sao cho nồng độ của chất bảo quản kháng khuẩn cần phân tích và thành phần của dung môi trong dung dịch thử tương đương trong dung dịch chuẩn. Tiến hành sắc ký khí theo các điều kiện được trình bày trong phần này.

Benzyl alcol

Dung môi pha loãng: Methanol - nước (20 : 80).

Dung dịch chuẩn nội: Dung dịch chứa 3,8 mg/ml phenol được chuẩn bị như sau: Hòa tan một lượng phenol (TT) thích hợp trong một thể tích methanol (TT) bằng 10% thể tích bình định mức và pha loãng bằng nước đến vạch.

Dung dịch chuẩn: Dung dịch chứa 1,8 mg/ml benzyl alcol chuẩn và 1,5 mg/ml phenol (TT) được chuẩn bị như sau: Hòa tan 180 mg benzyl alcol chuẩn trong 20 ml methanol (TT) trong bình định mức 100 ml. Thêm 40,0 ml dung dịch chuẩn nội và pha loãng bằng nước đến vạch.

Dung dịch thử: Pha loãng mẫu thử và sử dụng một lượng dung dịch chuẩn nội phù hợp để thu được dung dịch có nồng độ khoảng 1,8 mg/ml benzyl alcol và 1,5 mg/ml phenol trong hỗn hợp dung môi methanol - nước (24 : 76)

Điều kiện sắc ký:

Cột silica nung chảy (30 m $\times$ 0,32 mm) được phủ pha tĩnh polyethylen glycol (phân tử lượng khoảng 15000) (ví dụ như polyethylen glycol compound 20M hoặc carbowax 20M) (lớp phim dày 0,5 μ m).

Khí mang: Heli dùng cho sắc ký.

Tỷ lệ chia dòng: 10 : 1.

Tốc độ dòng: 2 ml/min.

Nhiệt độ:

	Thời gian (min)	Nhiệt độ (°C)
Cột	0 - 5	150
	5 - 13	150 → 230 (tăng 10 °C/min)
	13 - 20	230
Buồng tiêm		200
Detector		310

Detector ion hóa ngọn lửa.

Thể tích tiêm: 1,0 µl.

Thời gian chạy sắc ký: 20 min.

Cách tiến hành:

Thời gian lưu tương đối so với benzyl alcol của phenol khoảng 1,25.

Kiểm tra tính phù hợp của hệ thống: Trên sắc ký đồ của dung dịch chuẩn, độ phân giải giữa pic benzyl alcol và pic phenol không nhỏ hơn 2,0; hệ số đối xứng của pic benzyl alcol không lớn hơn 2,0 và độ lệch chuẩn tương đối của tỷ lệ diện tích pic benzyl alcol và pic phenol thu được từ 6 lần tiêm lặp lại không lớn hơn 2,0 %.

Tính hàm lượng benzyl alcol, C_7H_8O , trong chế phẩm dựa vào tỷ lệ diện tích pic benzyl alcol và pic phenol thu được trên sắc ký đồ của dung dịch thử, dung dịch chuẩn và nồng độ benzyl alcol chuẩn trong dung dịch chuẩn.

Clorobutanol

Dung môi pha loãng: Methanol - nước (50 : 50).

Dung dịch chuẩn nội: Dung dịch chứa 10 mg/ml 2,2,2-tricloroethanol trong dung môi pha loãng.

Dung dịch chuẩn gốc: Dung dịch chứa 5 mg/ml clorobutanol chuẩn trong *methanol* (TT).

Dung dịch chuẩn: Dung dịch chứa 1,25 mg/ml clorobutanol chuẩn và 2 mg/ml 2,2,2-tricloroethanol được chuẩn bị như sau: Lấy 2,5 ml dung dịch chuẩn gốc, 2,0 ml dung dịch chuẩn nội và 0,5 ml *methanol* (TT) vào bình định mức 10 ml và pha loãng bằng *nước* đến vạch.

Dung dịch thử gốc: Pha loãng chính xác một thể tích dung dịch thử, nếu cần, để thu được dung dịch chứa 2,5 mg/ml clorobutanol trong *nước*.

Dung dịch thử: Lấy 5,0 ml dung dịch thử gốc và 2,0 ml dung dịch chuẩn nội vào bình định mức 10 ml và thêm *methanol* (TT) đến vạch.

Điều kiện sắc ký:

Cột silica nung chảy (30 m × 0,32 mm) được phủ pha tĩnh *polyethylen glycol* (phân tử lượng khoảng 15000) (ví dụ như *polyethylen glycol compound 20M* hoặc *carbowax 20M*) (lớp phim dày 0,25 µm).

Khí mang: *Heli* dùng cho sắc ký.

Tỷ lệ chia dòng: 10 : 1.

Tốc độ dòng: 1 ml/min.

Nhiệt độ: Buồng tiêm 260 °C; detector 280 °C; cột 135 °C.

Detector ion hóa ngọn lửa.

Thể tích tiêm: 0,5 µl.

Thời gian chạy sắc ký: 12 min.

Cách tiến hành:

Thời gian lưu tương đối so với clorobutanol của 2,2,2-tricloroethanol khoảng 1,4.

Kiểm tra tính phù hợp của hệ thống: Trên sắc ký đồ của dung dịch chuẩn, độ phân giải giữa pic clorobutanol và pic 2,2,2-tricloroethanol không nhỏ hơn 2,0 và độ lệch chuẩn tương đối của tỷ lệ diện tích pic clorobutanol và pic 2,2,2-tricloroethanol thu được từ 6 lần tiêm lặp lại không lớn hơn 1,0 %.

Tính hàm lượng clorobutanol, $C_4H_7Cl_3O$, trong chế phẩm dựa vào tỷ lệ diện tích pic clorobutanol và pic 2,2,2-tricloroethanol thu được trên sắc ký đồ của dung dịch thử, dung dịch chuẩn và nồng độ clorobutanol chuẩn trong dung dịch chuẩn.

Phenol

Dung dịch chuẩn nội: Dung dịch chứa 2 mg/ml benzyl alcol chuẩn trong *methanol* (TT).

Dung dịch chuẩn gốc: Dung dịch chứa 4 mg/ml phenol chuẩn trong *nước*.

Dung dịch chuẩn: Dung dịch chứa 0,4 mg/ml phenol chuẩn và 0,4 mg/ml benzyl alcol chuẩn được chuẩn bị như sau: Lấy 5,0 ml dung dịch chuẩn gốc và 10,0 ml dung dịch chuẩn nội vào bình định mức 50 ml và pha loãng bằng *nước* đến vạch.

Dung dịch thử: Pha loãng mẫu thử và sử dụng một lượng dung dịch chuẩn nội phù hợp để thu được dung dịch có nồng độ 0,4 mg/ml phenol và 0,4 mg/ml benzyl alcol trong hỗn hợp *methanol* - *nước* (20 : 80)

Điều kiện sắc ký:

Cột silica nung chảy (30 m × 0,32 mm) được phủ pha tĩnh *polyethylen glycol* (phân tử lượng khoảng 15000) (ví dụ như *polyethylen glycol compound 20M* hoặc *carbowax 20M*) (lớp phim dày 0,5 μm).

Khí mang: *Heli* dùng cho sắc ký.

Tỷ lệ chia dòng: 10 : 1.

Tốc độ dòng: 2 ml/min.

Nhiệt độ:

	Thời gian (min)	Nhiệt độ (°C)
Cột	0 - 5	150
	5 - 13	150 → 230 (tăng 10 °C/min)
	13 - 20	230
Buồng tiêm		200
Detector		310

Detector ion hóa ngọn lửa.

Thể tích tiêm: 1 μl.

Thời gian chạy sắc ký: 20 min.

Cách tiến hành:

Thời gian lưu tương đối so với phenol của benzyl alcol khoảng 0,85.

Kiểm tra tính phù hợp của hệ thống: Trên sắc ký đồ của dung dịch chuẩn, độ phân giải giữa pic benzyl alcol với pic phenol không nhỏ hơn 2,0; hệ số đối xứng của pic phenol không lớn hơn 2,0 và độ lệch chuẩn tương đối của tỷ lệ diện tích pic phenol và pic benzyl alcol thu được từ 6 lần tiêm lặp lại không lớn hơn 1,0 %.

Tính hàm lượng phenol, C_6H_6O , trong chế phẩm dựa vào tỷ lệ diện tích pic phenol và pic benzyl alcol thu được trên sắc ký đồ của dung dịch thử, dung dịch chuẩn và nồng độ phenol chuẩn trong dung dịch chuẩn.

Phương pháp sắc ký lỏng

Quy trình chung về phương pháp sắc ký lỏng trình bày dưới đây được áp dụng để định lượng các paraben và thimerosal. Chuẩn bị dung dịch chuẩn nội và dung dịch chuẩn cho mỗi chất bảo quản

kháng khuẩn theo hướng dẫn dưới đây. Trừ khi có hướng dẫn khác trong chuyên luận riêng, chuẩn bị dung dịch thử từ một lượng chính xác mẫu thử và dung dịch chuẩn nội sao cho nồng độ của chất bảo quản kháng khuẩn cần phân tích và thành phần dung môi trong dung dịch thử tương đương trong dung dịch chuẩn. Tiến hành sắc ký lỏng theo các điều kiện được trình bày trong phần này.

Methylparaben và propylparaben

Phương pháp sắc ký lỏng (Phụ lục 5.3).

Pha động: Methanol - dung dịch kali dihydrophosphat 7 g/l (65 : 35).

Dung dịch chuẩn nội: Dung dịch chứa 0,013 mg/ml ethylparaben chuẩn trong pha động.

Dung dịch phù hợp hệ thống: Dung dịch chứa 0,01 mg/ml mỗi chất sau: butylparaben chuẩn, propylparaben chuẩn, ethylparaben chuẩn, methylparaben chuẩn và acid *p*-hydroxybenzoic trong pha động.

Dung dịch chuẩn gốc: Dung dịch chứa 0,2 mg/ml methylparaben chuẩn và 0,03 mg/ml propylparaben chuẩn trong pha động.

Dung dịch chuẩn: Lấy 5 ml dung dịch chuẩn gốc, 5 ml dung dịch chuẩn nội vào bình chiết và tiến hành chiết 3 lần, mỗi lần với 10 ml *diethyl ether* (TT). Gộp dịch chiết ether và làm khan bằng *natri sulfat khan* (TT). Bốc hơi dịch chiết đến khô và hòa tan cần thu được trong 50 ml pha động.

Dung dịch thử: Lấy 5 ml dung dịch cần thử, 5 ml dung dịch chuẩn nội vào bình chiết và tiến hành chiết 3 lần, mỗi lần với 10 ml *diethyl ether* (TT). Gộp dịch chiết ether và làm khan bằng *natri sulfat khan* (TT). Bốc hơi dịch chiết đến khô và hòa tan cần thu được trong 50 ml pha động.

Điều kiện sắc ký:

Cột bảo vệ (3mm × 4,0 mm) được nhồi pha tĩnh C.

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

Detector quang phổ tử ngoại đặt ở bước sóng 272 nm.

Tốc độ dòng: 1,3 ml/min.

Thể tích tiêm: 10 μl.

Thời gian chạy sắc ký: 10 min.

Cách tiến hành:

Thời gian lưu tương đối so với methylparaben: acid *p*-hydroxybenzoic khoảng 0,58; ethylparaben khoảng 1,4 và propylparaben 2,1.

Kiểm tra tính phù hợp của hệ thống: Trên sắc ký đồ của dung dịch phù hợp hệ thống, độ phân giải giữa pic acid *p*-hydroxybenzoic và methylparaben không nhỏ hơn 2,0 và độ phân giải giữa pic methylparaben và ethylparaben không nhỏ hơn 2,0; độ lệch chuẩn tương đối của tỷ lệ diện tích pic methylparaben/ethylparaben và tỷ lệ diện tích pic propylparaben/ethylparaben thu được từ 6 lần tiêm lặp lại không lớn hơn 2,0 %. Trên sắc ký đồ của dung dịch chuẩn, hệ số đối xứng của pic methylparaben và pic propylparaben không lớn hơn 2,0.

Tính hàm lượng của methylparaben, C₈H₈O₃, và propylparaben, C₁₀H₁₂O₃ trong chế phẩm lần lượt dựa vào tỷ lệ diện tích pic methylparaben/ethylparaben và propylparaben/ethylparaben thu được trên sắc ký đồ của dung dịch chuẩn và dung dịch thử, hàm lượng tương ứng của C₈H₈O₃ và C₁₀H₁₂O₃ trong methylparaben chuẩn và propylparaben chuẩn.

Ethylparaben và butylparaben có thể được xác định theo cách tương tự với các dung dịch nội chuẩn thích hợp. Tuy nhiên, độ thu hồi của quá trình chiết xuất phụ thuộc vào chất nền, vì vậy cần xác định tính phù hợp của quy trình với từng sản phẩm cụ thể.

Thimerosal

Phương pháp sắc ký lỏng (Phụ lục 5.3).

Dung dịch A: Acid trifluoroacetic - nước (0,5 : 1000).

Pha động: Methanol - dung dịch A (60 : 40).

Dung dịch chuẩn: Dung dịch chứa 25 µg/ml thimerosal chuẩn trong nước.

Dung dịch thử: Pha loãng mẫu thử trong nước để thu được dung dịch có nồng độ thimerosal khoảng 25 µg/ml.

Điều kiện sắc ký:

Cột kích thước (10 cm × 2,1 mm) được nhồi pha tĩnh C (2 µm).

Detector quang phổ tử ngoại đặt ở bước sóng 222 nm.

Tốc độ dòng: 0,35 ml/min.

Thể tích tiêm: 2,5 µl.

Nhiệt độ buồng tiêm mẫu tự động: 4 °C.

Cách tiến hành:

Kiểm tra tính phù hợp của hệ thống: Trên sắc ký đồ của dung dịch chuẩn, hệ số đối xứng của pic thimerosal không lớn hơn 1,5; độ lệch chuẩn tương đối của diện tích pic thimerosal thu được từ 6 lần tiêm lặp lại không lớn hơn 1,0 %.

Tính hàm lượng của thimerosal, $C_9H_9HgNaO_2S$, trong chế phẩm dựa vào diện tích pic thimerosal thu được trên sắc ký đồ của dung dịch chuẩn và dung dịch thử, hàm lượng của $C_9H_9HgNaO_2S$ trong thimerosal chuẩn.

Phương pháp cực phổ

Phenylmercuric nitrat

Dung dịch chuẩn gốc: Dung dịch chứa 0,1 mg/ml phenylmercuric nitrat trong dung dịch natri hydroxyd 0,1 M (TT). Làm ấm để hòa tan nếu cần.

Dung dịch chuẩn: Hút 10 ml dung dịch chuẩn gốc vào 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 %....”.

Dung dịch thử: Hút 10 ml mẫu thử vào bình định mức 25 ml, thêm 2 ml dung dịch kali nitrat 1 % (TT) và 10 ml dung dịch đệm borat kiểm pH 9,2 (TT), nếu cần điều chỉnh đến pH 9,2 bằng dung dịch acid nitric 2 M (TT). Thêm 1,5 ml dung dịch gelatin (TT) 0,1 % mới pha, thêm dung dịch đệm borat kiểm pH 9,2 (TT) đến vạch, trộn đều.

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 tồn 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 phenylmercuric nitrat, $C_6H_5HgNO_3$, trong mẫu thử (µg/ml) theo công thức sau:

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

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

anhpt.qld_Pham Tuan Anh_22/01/2025 11:55:03