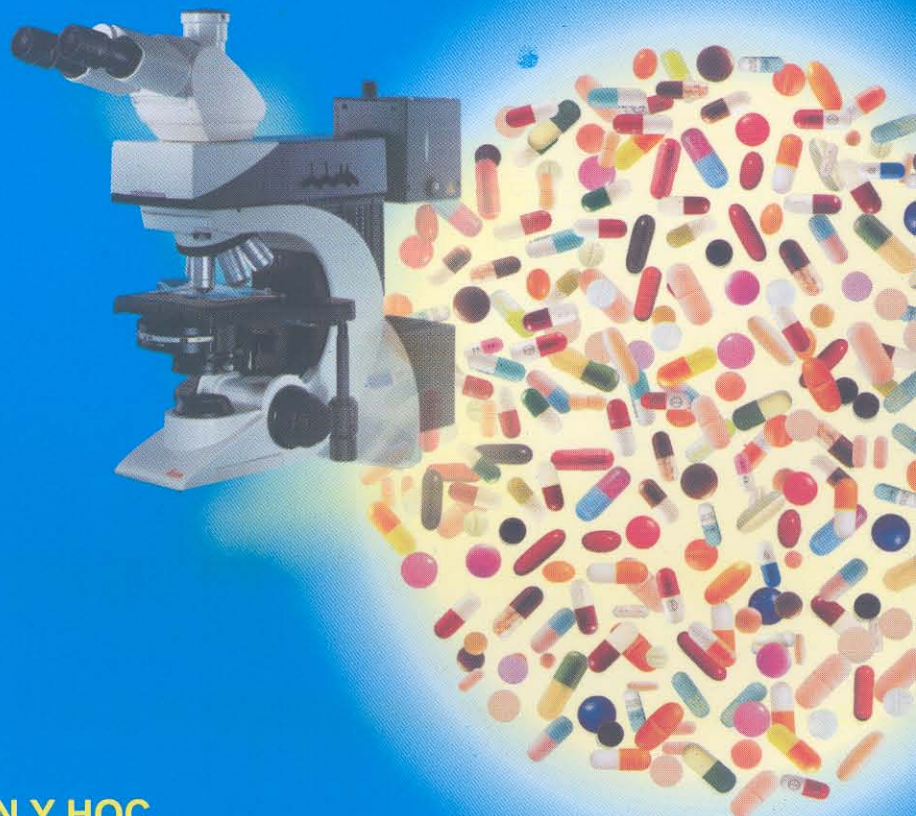


BỘ Y TẾ
VỤ KHOA HỌC VÀ ĐÀO TẠO

KIỂM NGHIỆM DƯỢC PHẨM

(SÁCH DÙNG ĐÀO TẠO DƯỢC SỸ ĐẠI HỌC)



NHÀ XUẤT BẢN Y HỌC

BỘ Y TẾ
VỤ KHOA HỌC VÀ ĐÀO TẠO

KIỂM NGHIỆM DƯỢC PHẨM

(Sách dùng đào tạo dược sĩ đại học)

MÃ SỐ: Đ.20.Z.08

NHÀ XUẤT BẢN Y HỌC
HÀ NỘI - 2005

CHỦ BIÊN

PGS.TS. Trần Tử An

THAM GIA BIÊN SOẠN

PGS.TS. Trần Tử An

CN. Trần Tích

DS. Nguyễn Văn Tuyên

TS. Chu Thị Lộc

ThS. Nguyễn Thị Kiều Anh

THAM GIA TỔ CHỨC BẢN THẢO

ThS. Phí Văn Thâm

© Bản quyền thuộc Bộ Y tế (Vụ Khoa học và Đào tạo)

LỜI NÓI ĐẦU

Thực hiện Nghị định 43/2000/NĐ-CP ngày 30/8/2000 của Chính phủ quy định chi tiết và hướng dẫn triển khai Luật Giáo dục, Bộ Giáo dục & Đào tạo và Bộ Y tế đã phê duyệt, ban hành chương trình khung cho đào tạo Dược sĩ đại học. Bộ Y tế tổ chức thẩm định sách và tài liệu dạy – học các môn cơ sở và chuyên môn theo chương trình mới nhằm từng bước xây dựng bộ sách chuẩn trong công tác đào tạo dược sĩ đại học của Ngành Y tế.

Kiểm nghiệm là một khâu quan trọng trong hệ thống quản lý chất lượng toàn diện của dược phẩm. Nó có mặt trong các công đoạn sản xuất (kiểm nghiệm nguyên liệu, bán thành phẩm và kiểm nghiệm sản phẩm cuối cùng), trong tồn trữ, lưu thông và sử dụng thuốc. Các kỹ thuật được sử dụng trong kiểm nghiệm rất phong phú và đa dạng thuộc các lĩnh vực vật lý, hoá học và sinh học. Chính vì vậy các kiến thức cơ bản của 3 bộ môn này - đặc biệt là các môn học chuyên ngành như hoá phân tích, hoá lý, vi sinh - thực sự là cơ sở cho môn học kiểm nghiệm dược phẩm cần phải được nghiên cứu trước. Tuy nhiên, việc lựa chọn một kỹ thuật nào đó cho đánh giá chất lượng một nguyên liệu hoặc chế phẩm thuốc không chỉ phụ thuộc vào đặc điểm của kỹ thuật phân tích mà còn phụ thuộc vào đặc điểm của đối tượng phân tích là dược phẩm, cho nên các kiến thức về hoá dược, dược liệu, bào chế là rất cần thiết cho kiểm nghiệm dược phẩm.

Trong thực hành kiểm nghiệm dược phẩm người ta sử dụng hầu hết các kỹ thuật phân tích, các phép đo vật lý như đo điểm chảy, điểm sôi, chỉ số khúc xạ, áp suất thẩm thấu,... cũng là những kỹ thuật thường gặp. Tuy nhiên, trong giáo trình vật lý năm thứ nhất, các nội dung này đã được trình bày chi tiết cả lý thuyết và thực hành. Vì vậy các nội dung trên không đưa vào chương trình Kiểm nghiệm dược phẩm. Các phương pháp hoá học và hoá lý được sử dụng rất phổ biến: từ loại thực hành đơn giản như chuẩn độ thể tích, so màu, đến những loại đòi hỏi các thiết bị hiện đại như sắc ký, quang phổ, khối phổ ... Nhưng với thời lượng là 2 đơn vị học trình lý thuyết cho sinh viên năm thứ 4 nên mục tiêu môn học được hạn chế ở 2 vấn đề:

- 1. Giải thích được nguyên lý của một số phương pháp hoá học, hoá lý và vi sinh thường dùng trong kiểm nghiệm.*
- 2. Trình bày được hệ thống đảm bảo chất lượng thuốc và vị trí của công tác kiểm nghiệm trong hệ thống này.*

Cuốn sách này được chia làm 6 chương. Sau chương 1 giới thiệu sơ lược về hệ thống đảm bảo chất lượng thuốc và vai trò của kiểm nghiệm, trong 3 chương tiếp theo trình bày 3 nhóm phương pháp hoá học, hoá lý và sinh học. Cơ sở lý

thuyết của các phương pháp kiểm nghiệm này đã được nghiên cứu trong các môn cơ sở như: phân tích, hoá lý, vi sinh. Ở đây chủ yếu giới thiệu nguyên tắc ứng dụng của chúng như: hiệu chuẩn thiết bị, kỹ thuật xác định nồng độ, giảm thiểu sai số... trong kiểm nghiệm. Do hạn chế của thời lượng môn học nên chỉ đề cập đến *một số phương pháp thường dùng* như: chuẩn độ môi trường khan, quang phổ phân tử, HPLC. Chương 5 trình bày sơ lược nội dung kiểm nghiệm các dạng bào chế: thuốc viên, thuốc tiêm, thuốc dùng ngoài ...

Nhằm mục đích cung cấp cho sinh viên một số kiến thức cơ bản về tính bền vững của thuốc, làm cơ sở giải thích những bất thường có thể gặp trong quá trình kiểm nghiệm đánh giá chất lượng, chúng tôi giới thiệu thêm rất sơ lược chương cuối cùng: độ ổn định và tuổi thọ của thuốc.

Kết quả phân tích đánh giá chất lượng là *sản phẩm* của thực hành Kiểm nghiệm dược phẩm. Vì vậy sản phẩm này cũng như bao loại sản phẩm khác lưu hành trong xã hội phải có chất lượng *thỏa mãn nhu cầu người tiêu dùng*. Để đảm bảo chất lượng của kết quả, cần thực hiện nhiều biện pháp đồng bộ. Đó là:

- Trang thiết bị phòng thí nghiệm,
- Kỹ năng của kiểm nghiệm viên,
- Quy trình kỹ thuật kiểm nghiệm.

Thực hành tốt phòng thí nghiệm (GLP) là cơ sở để thực hiện các biện pháp nêu trên. Những nội dung này sẽ được giới thiệu trong chương trình cao học thuộc chuyên ngành Kiểm nghiệm dược phẩm và độc chất.

Về cách tiếp cận nội dung, trong cuốn sách không nhắc lại qui trình kỹ thuật đã có trong Dược điển mà cung cấp những kiến thức cần thiết để sinh viên có thể giải thích được qui trình đó và thực hành kiểm nghiệm cho kết quả tin cậy.

Sách Kiểm nghiệm dược phẩm được các giảng viên Bộ môn Hoá Phân tích – Trường Đại học Dược Hà Nội biên soạn. Sách đã được Hội đồng chuyên môn thẩm định sách giao khoa và tài liệu dạy – học chuyên ngành Dược của Bộ Y tế thẩm định và được Bộ Y tế ban hành làm tài liệu dạy – học chính thức của Ngành Y tế trong giai đoạn hiện nay.

Vụ Khoa học và Đào tạo xin chân thành cảm ơn các giảng viên Bộ môn Hoá Phân tích – Trường Đại học Dược tham gia biên soạn cuốn sách này. Vì là lần đầu xuất bản nên chắc chắn còn nhiều thiếu sót, chúng tôi mong nhận được ý kiến đóng góp của đồng nghiệp và sinh viên để cuốn sách ngày càng hoàn thiện hơn.

**VỤ KHOA HỌC VÀ ĐÀO TẠO
BỘ Y TẾ**

MỤC LỤC

Lời nói đầu	3
-------------	---

Chương 1

ĐẠI CƯƠNG

Trần Tích

1.1. Chất lượng thuốc và đảm bảo chất lượng	9
1.1.1. Thuốc và yêu cầu chất lượng	9
1.1.2. Kiểm tra chất lượng thuốc	12
1.1.3. Hệ thống tổ chức kiểm tra chất lượng thuốc	14
1.2. Công tác tiêu chuẩn hoá	16
1.2.1. Khái niệm	16
1.2.2. Công tác xây dựng tiêu chuẩn	18
1.2.3. Công tác áp dụng tiêu chuẩn trong thực tế	22
1.2.4. Giới thiệu Dược điển Việt Nam	23
1.3. Kiểm nghiệm thuốc theo tiêu chuẩn	26
1.3.1. Lấy mẫu kiểm tra	26
1.3.2. Tiến hành kiểm nghiệm	31
1.3.3. Nội dung chính của thực hành tốt phòng kiểm nghiệm (GLP)	34
<i>Tài liệu tham khảo</i>	36
<i>Câu hỏi tự lượng giá</i>	36

Chương 2

Kiểm nghiệm thuốc bằng các phương pháp hoá học

** Trần Tích, Trần Tử An*

2.1. Các phản ứng định tính	37
2.2. Thử giới hạn các tạp chất trong thuốc	48
2.2.1. Mục đích	48

*Phần 2.1 & 2.2. Trần Tích, phần 2.3. & 2.4.: Trần Tử An

2.2.2. Phương pháp xác định giới hạn tạp chất trong thuốc	48
2.2.3. Một số thuốc thử trong các phản ứng hoá học để xác định giới hạn tạp chất	50
2.3. Chuẩn độ acid - base trong môi trường khan	51
2.3.1. Vai trò của dung môi	51
2.3.2. Khái niệm pH	52
2.3.3. Xác định điểm tương đương	53
2.3.4. Ứng dụng kiểm nghiệm thuốc	54
2.4. Xác định hàm lượng nước bằng thuốc thử Karl fischer	58
2.4.1. Nguyên tắc	58
2.4.2. Pha chế và xác định độ chuẩn	58
2.4.3. Xác định điểm tương đương	59
2.4.4. Ứng dụng	59
2.5. Định lượng một số chất hữu cơ đa chức bằng thuốc thử periodat	60
2.6. Ứng dụng cặp ion trong kiểm nghiệm thuốc	61
<i>Tài liệu tham khảo</i>	65
<i>Câu hỏi tự lượng giá</i>	66

Chương 3

CÁC PHƯƠNG PHÁP HOÁ LÝ TRONG KIỂM NGHIỆM THUỐC

Nguyễn Văn Tuyên

3.1. Phương pháp quang phổ phân tử	68
3.1.1. Quang phổ hấp thụ UV – VIS	68
3.1.2. Quang phổ hồng ngoại (IR)	79
3.1.3. Quang phổ huỳnh quang	82
3.2. Phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC)	84
3.2.1. Các thông số đặc trưng của quá trình sắc ký	84
3.2.2. Máy HPLC	86
3.2.3. Các kỹ thuật HPLC	88
3.2.4. Hướng dẫn chọn kỹ thuật HPLC	94
3.2.5. Chuẩn hoá cột HPLC	100

3.2.6. Định lượng bằng phương pháp HPLC	102
3.2.7. Các phương pháp định lượng	104
<i>Tài liệu tham khảo</i>	111
<i>Câu hỏi tự lượng giá</i>	111

Chương 4

KIỂM NGHIỆM THUỐC BẰNG PHƯƠNG PHÁP SINH HỌC

Chu Thị Lộc

4.1. Mở đầu	115
4.1.1. Nguyên tắc	115
4.1.2. Chất chuẩn	116
4.1.3. Đánh giá kết quả	116
4.2. Kiểm nghiệm thuốc bằng phương pháp thử trên động vật	116
4.3. Kiểm nghiệm thuốc bằng phương pháp thử vi sinh vật	117
4.3.1. Đại cương về vi sinh vật	117
4.3.2. Môi trường nuôi cấy vi sinh vật	121
4.3.3. Thử vô trùng	124
4.3.4. Thử giới hạn vi sinh vật	128
4.3.5. Xác định hoạt lực kháng sinh bằng phương pháp thử vi sinh vật	131
<i>Tài liệu tham khảo</i>	137
<i>Câu hỏi tự lượng giá</i>	138

Chương 5

KIỂM NGHIỆM CÁC DẠNG BÀO CHẾ

Nguyễn Thị Kiều Anh

5.1. Kiểm nghiệm thuốc bột	140
5.2. Kiểm nghiệm thuốc viên nang	145
5.3. Kiểm nghiệm thuốc viên nén	147
5.4. Kiểm nghiệm thuốc tiêm, thuốc tiêm truyền	149
5.5. Kiểm nghiệm thuốc nhỏ mắt	153
5.6. Kiểm nghiệm thuốc uống dạng lỏng	154
5.7. Kiểm nghiệm thuốc mỡ	157

5.8.	Kiểm nghiệm thuốc đạn, thuốc trứng	159
5.9.	Thử độ hoà tan của viên nén và viên nang	160
5.10	Thử độ rã của viên nén và viên nang	166
	<i>Tài liệu tham khảo</i>	169
	<i>Câu hỏi tự lượng giá</i>	169

Chương 6

ĐỘ ỔN ĐỊNH VÀ TUỔI THỌ CỦA THUỐC

Trần Tử An

6.1.	Quá trình phát triển nghiên cứu độ ổn định của thuốc	171
6.2.	Đại cương về độ ổn định của thuốc	172
6.2.1.	Định nghĩa	172
6.2.2.	Một số thuật ngữ liên quan	173
6.2.3.	Mục tiêu đánh giá độ ổn định	174
6.2.4.	Tiêu chuẩn đánh giá độ ổn định	175
6.2.5.	Phân vùng khí hậu	176
6.3.	Động hoá học dung dịch	177
6.3.1.	Bậc của phản ứng	177
6.3.2.	Ảnh hưởng của nhiệt độ	181
6.4.	Xác định độ ổn định của thuốc	182
6.4.1.	Lấy mẫu	182
6.4.2.	Phương pháp thử cấp tốc	183
6.4.3.	Phương pháp thử dài hạn	185
6.4.4.	Phương pháp phân tích đánh giá kết quả	185
6.5.	Các dược chất kém bền vững	186
	<i>Tài liệu tham khảo</i>	188
	<i>Câu hỏi tự lượng giá</i>	189

Chương 1

ĐẠI CƯƠNG

MỤC TIÊU HỌC TẬP

1. Trình bày được hệ thống đảm bảo chất lượng thuốc và vị trí của công tác kiểm nghiệm trong hệ thống này.
2. Trình bày được các nhiệm vụ chủ yếu của công tác kiểm nghiệm.

1.1. CHẤT LƯỢNG THUỐC VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

1.1.1. Thuốc và yêu cầu chất lượng

- *Khái niệm về thuốc:*

Theo Tổ chức y tế thế giới, thuốc là một chất hay một hỗn hợp các chất được sản xuất đem bán, cung cấp để bán hay giới thiệu sử dụng nhằm mục đích: Điều trị, làm giảm, phòng hay chẩn đoán bệnh tật, tình trạng cơ thể bất thường hoặc triệu chứng bệnh; khôi phục, hiệu chỉnh, thay đổi chức năng hữu cơ của cơ thể người (hay động vật - thuốc thú y).

Vận dụng vào Việt Nam, trong "Điều lệ thuốc phòng bệnh, chữa bệnh" ban hành 24/1/1991 qui định: Thuốc là những sản phẩm có nguồn gốc từ động vật, thực vật, khoáng vật, hay sinh học được sản xuất để dùng cho người nhằm:

- Phòng bệnh, chữa bệnh
- Phục hồi, điều chỉnh chức năng cơ thể
- Làm giảm triệu chứng bệnh
- Chẩn đoán bệnh
- Phục hồi hoặc nâng cao sức khoẻ
- Làm mất cảm giác một bộ phận hay toàn thân
- Làm ảnh hưởng quá trình sinh sản
- Làm thay đổi hình dáng cơ thể.

Vật liệu dùng trong khoa răng, bông băng, chỉ khâu y tế,... cũng được coi là thuốc.

Thuốc lưu hành trên thị trường đa phần là các tân dược và thuốc y học cổ truyền (là các thuốc được sản xuất theo phương pháp y học cổ truyền). Trong đó có nhiều thuốc dưới dạng biệt dược (biệt dược là những thuốc mang tên riêng còn gọi là tên thương mại riêng của một cơ sở sản xuất hay một

hãng sản xuất lần đầu đặt cho nó và đã được phép đưa ra thị trường đang được bảo hộ quyền sở hữu công nghiệp).

- *Chất lượng thuốc và yêu cầu chất lượng:*

Chất lượng của một thuốc là tổng hợp các tính chất đặc trưng của thuốc đó (thí dụ; có chứa đúng các thành phần theo tỷ lệ qui định, có độ tinh khiết theo yêu cầu, đóng gói có nhãn qui định...) được thể hiện ở một mức độ phù hợp với những yêu cầu kỹ thuật đã định trước tùy theo điều kiện xác định về kinh tế, kỹ thuật, xã hội... nhằm đảm bảo cho thuốc đó đạt các mục tiêu sau:

- Có hiệu lực phòng bệnh và chữa bệnh
- Không có hoặc ít có tác dụng có hại
- Ổn định về chất lượng trong thời hạn đã xác định
- Tiện dụng và dễ bảo quản.

Thuốc là sản phẩm hàng hoá đặc biệt, có quan hệ trực tiếp đến sức khoẻ cộng đồng, đến chất lượng và hiệu quả của việc phòng bệnh, chữa bệnh. Vì thế thuốc phải được bảo đảm chất lượng trong toàn bộ quá trình sản xuất từ nguyên liệu cho đến là thành phẩm, trong quá trình bảo quản, lưu thông phân phối đến người sử dụng.

Mục tiêu của đảm bảo chất lượng trên chỉ được coi là đạt khi nào thuốc đáp ứng được các yêu cầu cơ bản sau:

- Thuốc có chứa đúng các thành phần theo tỷ lệ qui định của công thức đã được đăng ký và được cấp phép (định tính, định lượng).
- Thuốc được phép sản xuất và sản xuất theo đúng các qui trình đã đăng ký và được phép.
- Có độ tinh khiết đạt yêu cầu qui định.
- Thuốc được đóng gói trong các đồ đựng và đồ bao gói với nhãn thích hợp và đúng qui cách đã đăng ký.
- Thuốc được bảo quản, phân phối, quản lý theo qui định để chất lượng của thuốc được duy trì trong suốt tuổi thọ đã đăng ký hay thời hạn bảo hành.

Để đạt các mục tiêu trên, cần phải có nhiều yếu tố, trong đó 3 yếu tố cơ bản phải có là:

- Thực hành tốt sản xuất thuốc (GMP)
- Thực hành tốt phòng kiểm nghiệm thuốc (GLP)
- Thực hành tốt bảo quản thuốc (GSP)

1.1.1.1. Thực hành tốt sản xuất thuốc (Good Manufacture Practice)

Bao gồm những qui định chặt chẽ và chi tiết về mọi mặt của quá trình sản xuất như: Tổ chức, nhân sự, cơ sở và tiện nghi, máy móc, trang thiết bị, kiểm

tra nguyên phụ liệu, bao bì, đóng gói, kiểm tra bán thành phẩm, thành phẩm cuối cùng,... nhằm để sản xuất ra được thuốc theo dự kiến và đạt tiêu chuẩn kỹ thuật đã đặt ra. Muốn vậy, phải thực hiện được các yêu cầu cơ bản sau:

- Tất cả các quy trình sản xuất phải được qui định rõ ràng và chắc chắn có khả năng đạt mục đích đề ra.
- Các cán bộ, nhân viên phải được đào tạo đạt yêu cầu; cơ sở và diện tích phù hợp, các trang thiết bị và phương tiện phục vụ, nguyên liệu, phụ liệu, bao bì, đóng gói, nhãn, ... đúng quy cách và theo yêu cầu đã đề ra.
- Trong suốt quá trình sản xuất phải có sự kiểm tra, theo dõi, ghi chép đầy đủ để chứng minh rằng tất cả các giai đoạn của qui trình sản xuất đều được thực hiện nghiêm chỉnh, có chất lượng và số lượng sản phẩm phù hợp với qui định.
- Có các hồ sơ sản xuất và phân phối để dễ dàng xem xét lịch sử của một lô thuốc nào đó.
- Có một hệ thống tổ chức cần thiết để khi cần có thể thu hồi bất kỳ lô thuốc nào đã cấp phát hoặc bán ra.

1.1.1.2. Thực hành tốt phòng kiểm nghiệm thuốc (Good Laboratory Practice)

Bao gồm những quy định chặt chẽ và chi tiết các yếu tố tham gia vào quá trình kiểm tra chất lượng thuốc, nhằm đảm bảo kết quả có độ chính xác, đúng, khách quan.

Để thực hành tốt quá trình kiểm tra chất lượng thuốc, cần phải đáp ứng các yêu cầu cơ bản sau đây:

- Cán bộ được đào tạo chu đáo, được tổ chức tốt, có trình độ cao, có ý thức trách nhiệm.
- Cơ sở vật chất, trang thiết bị tốt, đáp ứng yêu cầu kỹ thuật.
- Hoá chất, thuốc thử, chất chuẩn tốt.
- Điều kiện vệ sinh tốt
- Lấy mẫu, lưu mẫu tốt
- Kết quả thử nghiệm tốt, ghi chép xử lý số liệu tốt.
- Hồ sơ lưu trữ tốt....

Vấn đề này sẽ được đề cập kỹ hơn ở phần nghiệp vụ của công tác kiểm nghiệm.

1.1.1.3. Thực hành tốt bảo quản thuốc (Good storage practice)

Bao gồm những quy định chặt chẽ và nghiêm ngặt cho việc tồn trữ, điều kiện bảo quản, xuất nhập nguyên phụ liệu, bao bì, chế phẩm, nhãn thuốc... Tất cả nhằm giám sát kiểm tra chặt chẽ để thuốc đảm bảo chất lượng đến

người sử dụng. Muốn thực hành tôn trọng thuốc tốt cần lưu ý làm tốt các yêu cầu sau:

- Cán bộ phải được đào tạo phù hợp, có trách nhiệm
- Nhà cửa và phương tiện bảo quản tốt
- Điều kiện vệ sinh tốt
- Thực hiện tốt qui trình bảo quản: nguyên liệu, bán sản phẩm, sản phẩm, bao bì, đóng gói...
- Quy trình bảo quản, vận chuyển phải được tuân thủ nghiêm chỉnh.

1.1.2. Kiểm tra chất lượng thuốc (Drug quality control)

1.1.2.1. Khái niệm

Kiểm tra chất lượng thuốc hay kiểm nghiệm thuốc là việc sử dụng các phương pháp phân tích: lý học, hoá học, hoá lý, sinh vật, vi sinh vật,... đã qui định để xác nhận một thuốc hay một nguyên liệu làm thuốc có đạt hay không đạt tiêu chuẩn qui định. Nói một cách cụ thể là kiểm tra chất lượng thuốc nhằm trả lời các câu hỏi:

- Đây có phải là thuốc cần kiểm tra không?
- Có đảm bảo hoạt lực hay hàm lượng đã đăng ký và được duyệt ?
- Có đạt độ tinh khiết theo yêu cầu hay không?
- Có bị phân huỷ hay biến chất hay không?
- Đồ bao gói, nhãn có đúng qui cách không?

Như vậy, mục tiêu cơ bản của công tác kiểm tra chất lượng thuốc là:

- Để người sử dụng dùng được thuốc đảm bảo chất lượng, đạt hiệu quả sử dụng cao.
- Phát hiện thuốc không đạt tiêu chuẩn, thuốc giả, thuốc kém phẩm chất ... để xử lý và không cho phép lưu hành trên thị trường.

Trong ngành y tế đã quy định: Tất cả các thuốc và nguyên liệu làm thuốc đều phải được kiểm nghiệm và xác định chất lượng, nếu đạt tiêu chuẩn qui định mới được đưa vào sử dụng. Bởi vậy thuốc phải được kiểm tra chất lượng một cách nghiêm ngặt, chặt chẽ, bảo đảm cho thuốc đạt chất lượng trong mọi hoạt động sản xuất, lưu thông phân phối, xuất nhập khẩu, quản lý và sử dụng thuốc.

1.1.2.2. Các yếu tố ảnh hưởng đến chất lượng thuốc

Có nhiều yếu tố, trong đó có thể là:

- Những rủi ro hoặc nhầm lẫn trong sản xuất, do không chấp hành những qui định của GMP.

- Những sản phẩm do vô tình hay cố ý trong sản xuất để tạo ra sản phẩm có hàm lượng thấp hơn qui định.
- Do lựa chọn công thức bào chế cũng như kỹ thuật bào chế chưa đúng nên thuốc bị phân huỷ biến chất.
- Quá trình bảo quản chưa tốt.
- Do lợi ích cá nhân bất chính làm hàng giả để lừa người tiêu dùng gây ra tác hại nghiêm trọng...

1.1.2.3. Khái niệm về thuốc đạt và không đạt tiêu chuẩn, thuốc giả mạo, thuốc kém phẩm chất

- *Thuốc đạt tiêu chuẩn (thuốc bảo đảm chất lượng):*

Là thuốc đáp ứng đầy đủ các yêu cầu kỹ thuật tiêu chuẩn đã đề ra (hay thuốc đáp ứng đầy đủ các mức chất lượng trong tiêu chuẩn chất lượng đã đăng ký).

- *Thuốc không đạt tiêu chuẩn:*

Là thuốc không đáp ứng đầy đủ các yêu cầu kỹ thuật tiêu chuẩn đã đề ra. Mức độ không đạt có thể là một hay một số chỉ tiêu. Thuốc không đạt tiêu chuẩn thuộc loại thuốc kém chất lượng.

- *Thuốc giả:*

Theo qui định của Tổ chức y tế thế giới, thuốc giả là chế phẩm được sản xuất không đúng với nhãn ở khía cạnh nhận dạng hay nguồn gốc thuốc, với sự cố ý và mang tính chất lừa đảo của nhà sản xuất. Sản xuất sai thành phần công thức đã đăng ký, không có hay không đủ hàm lượng hoạt chất, hoặc được đóng gói trong các bao bì giả mạo. Như vậy, có thể nói thuốc giả là những sản xuất thuốc của người sản xuất mang ý đồ lừa đảo, gian lận có thể dựa vào một số biểu hiện để phát hiện:

- Thuốc không có hoặc có ít dược chất
- Thuốc có chứa dược chất khác với tên dược chất ghi trên nhãn
- Nhãn, bao gói giống hay gần giống với nhãn, bao gói của một thuốc khác...

- *Thuốc kém phẩm chất:*

Là thuốc không đạt tiêu chuẩn kỹ thuật mà trước đó nó đã đạt. Mức độ không đạt tiêu chuẩn có nhiều hình thái khác nhau. Tất cả các nguyên nhân gây ra có thể xác minh được bằng các phương pháp khoa học, kỹ thuật cho phép. Các nguyên nhân đó có thể là:

- Do kỹ thuật sản xuất, bảo quản không đúng, do đó thuốc tự biến chất.
- Do đồ bao gói không đạt tiêu chuẩn, nên đã đưa tạp chất vào thuốc.

- Do tuổi thọ (hạn dùng) đã hết
- Do nguyên phụ liệu không đạt tiêu chuẩn
- Do tác động của môi trường: nhiệt độ, ánh sáng, độ ẩm...

1.1.3. Hệ thống tổ chức quản lý, kiểm tra chất lượng thuốc

Nhà nước giao cho Bộ Y tế chịu trách nhiệm quản lý toàn diện chất lượng thuốc. Vì vậy, hệ thống tổ chức, quản lý, kiểm tra chất lượng thuốc của ngành y tế được chia làm 3 phần: Hệ thống quản lý chất lượng thuốc; Hệ thống kiểm tra chất lượng thuốc; Hệ thống thanh tra Dược.

1.1.3.1. Hệ thống quản lý chất lượng thuốc

- *Cục quản lý Dược Việt Nam:*

Là cơ quan được Bộ Y tế uỷ quyền thực hiện các nhiệm vụ trong lĩnh vực quản lý nhà nước về chất lượng thuốc:

- Xây dựng quy hoạch, kế hoạch về quản lý chất lượng thuốc và tổ chức kế hoạch đã được phê duyệt.
- Xây dựng các văn bản pháp quy về tiêu chuẩn và chất lượng thuốc để Bộ ban hành, hướng dẫn kiểm tra việc thực hiện các văn bản trên.
- Quản lý việc đăng ký tiêu chuẩn cơ sở. Cung cấp thông tin khoa học kỹ thuật liên quan đến đảm bảo chất lượng thuốc.
- Chỉ đạo, giám sát hệ thống kiểm tra chất lượng thuốc trên toàn quốc.
- Kiểm tra và cấp giấy chứng nhận; cơ sở sản xuất đạt tiêu chuẩn “Thực hành tốt sản xuất thuốc” và phòng kiểm nghiệm đạt tiêu chuẩn “Thực hành tốt kiểm nghiệm thuốc”.
- Tổ chức hướng dẫn nghiệp vụ cho cán bộ quản lý chất lượng thuốc của ngành y tế, tổ chức đào tạo và bồi dưỡng nghiệp vụ về tiêu chuẩn - đo lường - chất lượng thuốc.
- Phối hợp với thanh tra Bộ Y tế thực hiện chức năng kiểm tra, thanh tra nhà nước về chất lượng thuốc và xử lý vi phạm pháp luật về chất lượng thuốc theo thẩm quyền.

- *Cơ quan quản lý nhà nước về chất lượng thuốc ở địa phương:*

Sở Y tế chỉ đạo quản lý toàn diện về chất lượng của thuốc ở địa phương (thường uỷ quyền cho phòng nghiệp vụ Dược) có nhiệm vụ:

- Phổ biến, hướng dẫn và tổ chức thực hiện các văn bản pháp luật về quản lý chất lượng thuốc tại địa phương.
- Thực hiện chức năng kiểm tra, thanh tra nhà nước về chất lượng thuốc và xử lý vi phạm về chất lượng thuốc trong phạm vi địa phương.

1.1.3.2. Hệ thống kiểm tra chất lượng thuốc

- *Cơ quan kiểm tra chất lượng thuốc của nhà nước về thuốc*

- Ở Trung ương là Viện Kiểm nghiệm thuốc Quốc gia (ở Hà Nội) và Phân viện Kiểm nghiệm (ở TP. Hồ Chí Minh).

Giúp Bộ Y tế quản lý chỉ đạo công tác kiểm tra chất lượng thuốc trong toàn quốc về mặt kỹ thuật. Có nhiệm vụ:

- + Nghiên cứu xây dựng tiêu chuẩn Việt Nam về thuốc.
- + Kiểm tra xác định chất lượng thuốc lưu hành trên thị trường.
- + Thẩm tra kỹ thuật, giúp Bộ xét duyệt các tiêu chuẩn kiểm nghiệm để xét cấp đăng ký sản xuất và lưu hành thuốc ở Việt Nam.
- + Phát hành các chất chuẩn và chất đối chiếu dùng trong kiểm nghiệm.
- + Làm trọng tài về chất lượng khi có tranh chấp khiếu nại về chất lượng thuốc.
- + Tham gia đào tạo cán bộ làm công tác kiểm nghiệm .
- + Tư vấn về chính sách chất lượng thuốc quốc gia.
- + Xây dựng tiêu chuẩn phòng kiểm nghiệm thuốc đạt tiêu chuẩn và giúp đỡ, kiểm tra công nhận các phòng kiểm nghiệm thuốc trong cả nước.
- + Kiểm tra việc kiểm nghiệm thuốc theo tiêu chuẩn trong phạm vi toàn quốc.
- Ở tỉnh, thành phố trực thuộc Trung ương là Trung tâm kiểm nghiệm dược phẩm, mỹ phẩm.

Là cơ quan trực thuộc Sở y tế, có nhiệm vụ như Viện Kiểm nghiệm nhưng giới hạn trong phạm vi tỉnh, thành phố.

- *Hệ thống tự kiểm tra chất lượng ở các cơ sở (phòng kiểm nghiệm):*

Công tác kiểm tra chất lượng thuốc được thực hiện ở tất cả các cơ sở có liên quan tới thuốc. Tùy theo qui mô của cơ sở sản xuất (xí nghiệp, công ty trung ương hoặc địa phương, các cơ sở nhỏ...), kinh doanh (công ty, cửa hàng...) bệnh viện (trung ương, địa phương) mà lập phòng kiểm nghiệm hay tổ kiểm nghiệm để tự kiểm tra chất lượng thuốc. Với các cơ sở sản xuất, bắt buộc phải có bộ phận tự kiểm tra chất lượng. Bộ phận này phải có khả năng kiểm nghiệm xác định chất lượng thuốc được sản xuất ở cơ sở mình theo tiêu chuẩn đã duyệt. Phải kiểm nghiệm, theo dõi được chất lượng của thuốc trong suốt quá trình sản xuất từ nguyên liệu, bán thành phẩm, thành phẩm. Phải lập hồ sơ theo dõi từng lô sản phẩm. Cơ sở sản xuất phải chịu trách nhiệm về thuốc do cơ sở sản xuất ra.

Các cơ sở bảo quản, phân phối thuốc phải có bộ phận tự kiểm nghiệm (với các công ty lớn) hoặc kiểm tra, kiểm soát để quản lý, đánh giá chất lượng thuốc, theo dõi chất lượng trong quá trình bảo quản, cung cấp hồ sơ chất lượng cho đơn vị sử dụng thuốc.

Các bệnh viện, tùy theo quy mô lớn, nhỏ cũng phải có bộ phận kiểm nghiệm các thuốc tự pha chế, kiểm tra, kiểm soát chất lượng thuốc trước khi phân phối đến người sử dụng.

1.1.3.3. Hệ thống thanh tra dược

Cùng các cơ quan quản lý nhà nước về chất lượng thuốc, thực hiện chức năng kiểm tra, thanh tra nhà nước về chất lượng thuốc được tổ chức từ trung ương đến địa phương.

1.2. CÔNG TÁC TIÊU CHUẨN HOÁ

1.2.1. Khái niệm

1.2.1.1. Một số định nghĩa

Tiêu chuẩn hoá là một lĩnh vực hoạt động bao gồm hai nội dung: Xây dựng ra các tiêu chuẩn và áp dụng các tiêu chuẩn đó trong thực tế nhằm đưa các hoạt động của xã hội (đặc biệt trong lĩnh vực sản xuất và kinh doanh) đi vào nề nếp để đạt được hiệu quả chung có lợi nhất cho mọi người và cho xã hội.

Tiêu chuẩn là những qui định thống nhất và hợp lý được trình bày dưới dạng một văn bản hoặc một thể thức nhất định do một cơ quan có thẩm quyền ban hành để bắt buộc áp dụng cho những nơi có liên quan. Nói một cách khác tiêu chuẩn là một văn bản mang tính pháp chế trong đó đề ra những qui định thống nhất và hợp lý bắt buộc áp dụng nhằm đảm bảo chất lượng cho một sản phẩm nào đó.

Chất lượng sản phẩm là một tập hợp các chỉ tiêu đặc trưng thể hiện tính năng sử dụng nhằm thoả mãn yêu cầu đã được xác định trước cho một sản phẩm trong những điều kiện xác định phù hợp hoàn cảnh kinh tế, khoa học kỹ thuật, xã hội.

Đối với thuốc, tiêu chuẩn là một văn bản khoa học kỹ thuật mang tính pháp chế trong đó qui định: qui cách, chỉ tiêu yêu cầu kỹ thuật, phương pháp thử, đóng gói, ghi nhãn, bảo quản và các vấn đề khác liên quan đến việc đánh giá chất lượng của một thuốc. Đây là cơ sở để các cơ quan kiểm nghiệm (hoặc người kiểm nghiệm) tiến hành thực nghiệm, đánh giá kết quả, công bố kết quả (bằng phiếu kiểm nghiệm) đánh giá chất lượng thuốc là đạt hay không đạt và có được phép lưu hành (hoặc sử dụng) hay không.

Về mặt lịch sử, công tác tiêu chuẩn hoá gắn liền với lịch sử sản xuất của loài người, của các phương thức sản xuất của từng chế độ xã hội khác nhau. Những hình thức sơ khai của tiêu chuẩn hoá đã có từ thời cổ đại, nhưng phát triển có tính tổ chức rộng rãi trên phạm vi quốc tế thì chỉ có từ đầu thế kỷ 20.

1.2.1.2. Đối tượng của công tác tiêu chuẩn hoá

Bao gồm rất rộng, hầu như trên tất cả mọi lĩnh vực, ví dụ:

- Các máy móc, dụng cụ, trang thiết bị công nghệ
- Nguyên, nhiên vật liệu
- Nông lâm hải sản, hàng tiêu dùng
- Các nguyên tắc, phương pháp, thủ tục, các vấn đề tổ chức, quản lý...
- Thuật ngữ, ký hiệu, đo lường...
- Sản phẩm và bán sản phẩm.

Trong ngành Dược, mọi hoạt động sản xuất, kinh doanh, sử dụng thuốc, mọi vấn đề có liên quan đến các đối tượng nêu trên đều phải tiêu chuẩn hoá.

1.2.1.3. Nội dung chính của một tiêu chuẩn về thuốc

Tiêu chuẩn về thuốc là một tiêu chuẩn toàn diện, bao gồm rất nhiều nội dung thể hiện được mức chất lượng của thuốc đã được tạo ra và duy trì chất lượng đó cho tới khi sử dụng hoặc hết tuổi thọ (hạn dùng) của thuốc.

Nội dung chính của một tiêu chuẩn về thuốc (nguyên liệu hay thành phẩm) thường gồm các mục sau:

- Tiêu đề: Trong đó nêu rõ tên nguyên liệu hoặc thành phẩm, tên đơn vị ban hành tiêu chuẩn, loại tiêu chuẩn, hiệu lực thi hành.
- Yêu cầu kỹ thuật: Là loại tiêu chuẩn rất quan trọng vì nó đề ra mức chất lượng hợp lý của sản phẩm (mỗi yêu cầu kỹ thuật gọi là một chỉ tiêu hay tiêu chí, đó là yếu tố cấu thành của yêu cầu kỹ thuật) và là cơ sở cho việc lập kế hoạch sản xuất (về số lượng, chất lượng), việc thực hiện kế hoạch, việc quản lý (kinh tế, kỹ thuật, giá cả, ký kết hợp đồng, khiếu nại...).
- Phương pháp thử: Tiêu chuẩn này bao giờ cũng phải qui định kèm theo các chỉ tiêu yêu cầu kỹ thuật. Đây là phần không thể thiếu vì nó chính là qui trình thử nghiệm hay qui trình phân tích mô tả chi tiết toàn bộ quá trình thực hành để thực hiện xem một chỉ tiêu nào đó của yêu cầu kỹ thuật có đạt hay không đạt yêu cầu đã đặt ra.
- Đóng gói, ghi nhãn, bảo quản: Điều này phải được qui định rõ vì tất cả các thuốc lưu hành trên thị trường phải có nhãn thuốc đến đơn vị đóng gói nhỏ nhất. Nhãn thuốc phải: có đủ nội dung cần thiết để giúp nhận biết được thuốc, cách sử dụng, tránh nhầm lẫn, tên cơ sở sản xuất, có số đăng ký, số lô sản xuất, số kiểm soát, hạn dùng, điều kiện bảo quản.

1.2.1.4. Các cấp tiêu chuẩn về thuốc

- Trước đây có 3 cấp tiêu chuẩn:
 - Tiêu chuẩn Việt Nam (tiêu chuẩn quốc gia, Dược điển Việt Nam) TCVN.
 - Tiêu chuẩn ngành y tế Việt Nam.

Hai cấp này có hiệu lực và phạm vi áp dụng trong cả nước.

- Tiêu chuẩn cơ sở (TC hoặc TCZ): do các cơ sở sản xuất biên soạn, có hiệu lực trong phạm vi qui định của các cấp quản lý.
- *Hiện nay, chỉ còn 2 cấp tiêu chuẩn là:* Tiêu chuẩn Dược điển Việt Nam và tiêu chuẩn cơ sở (theo quyết định số 2412/1998/QĐ-BYT ngày 15/09/1998).

Tiêu chuẩn cơ sở là tiêu chuẩn do cơ sở sản xuất biên soạn, áp dụng đối với các sản phẩm do cơ sở sản xuất ra.

Có hai loại tiêu chuẩn cơ sở:

- Tiêu chuẩn cơ sở của những sản phẩm lưu hành ở thị trường: phải đăng ký với cơ quan có thẩm quyền. Các mức tiêu chuẩn chất lượng không được thấp hơn các mức quy định trong tiêu chuẩn Dược điển Việt Nam.
- Tiêu chuẩn cơ sở của các thuốc pha chế trong đơn vị (không lưu hành trên thị trường): do thủ trưởng đơn vị xét duyệt và ban hành.

1.2.2. Công tác xây dựng tiêu chuẩn

Tiêu chuẩn Việt Nam về thuốc được nhà nước ủy quyền cho Bộ Y tế tổ chức biên soạn, xét duyệt và ban hành sau khi đăng ký tại cục tiêu chuẩn đo lường chất lượng nhà nước Việt Nam, các tiêu chuẩn này được tập hợp trong một bộ sách gọi là Dược điển Việt Nam (Hội đồng Dược điển được Bộ Y tế giao trách nhiệm này).

Một số thuốc chưa có TCVN sẽ sử dụng TC do các cơ sở sản xuất biên soạn và được cấp có thẩm quyền duyệt.

1.2.2.1. Thủ tục xây dựng tiêu chuẩn

Thường được tiến hành qua các giai đoạn sau:

- Chuẩn bị tài liệu, khảo sát thực tế, lập đề cương.
- Xây dựng dự thảo tiêu chuẩn lần thứ nhất gồm các việc: Tham khảo tài liệu, đề xuất các chỉ tiêu và phương pháp thử, khảo sát thực tế về sản xuất và sử dụng sản phẩm. Sản xuất thử, làm thực nghiệm phân tích các tiêu chuẩn dự kiến, viết dự thảo tiêu chuẩn và thuyết minh, lập dự thảo biện pháp áp dụng (thí dụ sửa đổi hoặc đề xuất các qui định kỹ thuật, qui chế thủ tục trong tiến hành sản xuất theo GMP...). Thông qua dự thảo ở cơ sở.
- Hoàn thành dự thảo tiêu chuẩn sau khi tiến hành các việc: Lấy ý kiến góp ý (cần thì tổ chức hội thảo). Thu thập góp ý, sửa chữa, hoàn chỉnh hồ sơ gửi tới cơ quan quản lý và xét duyệt.
- Xét duyệt và ban hành tiêu chuẩn: Cơ quan quản lý cấp tiêu chuẩn nào thì xét duyệt và ban hành tiêu chuẩn đó. Trước khi xét duyệt, tiêu chuẩn phải được gửi qua cơ quan thẩm tra kỹ thuật (Viện kiểm nghiệm

và phân viện kiểm nghiệm nếu thuộc trung ương; Trung tâm kiểm nghiệm tỉnh, thành phố nếu thuộc địa phương) và các cơ quan pháp chế (Cục quản lý Dược ở trung ương và Phòng nghiệp vụ dược ở địa phương). Thủ trưởng Bộ Y tế hoặc giám đốc Sở Y tế ký duyệt sau khi tham khảo các cơ quan thẩm tra.

Việc xem xét và sửa đổi tiêu chuẩn cũng được tiến hành như thủ tục xây dựng tiêu chuẩn.

Hồ sơ tiêu chuẩn: Bao gồm tất cả các văn bản khoa học kỹ thuật, khảo sát nghiên cứu, công văn trình duyệt, quyết định xét duyệt.

1.2.2.2. Phương pháp xây dựng tiêu chuẩn về yêu cầu kỹ thuật

Khi xây dựng tiêu chuẩn về yêu cầu kỹ thuật cần chú ý tới việc kết hợp giữa các loại chỉ tiêu để phản ánh hết được chất lượng của thuốc phù hợp với điều kiện kỹ thuật, kinh tế và thực tế: Các chỉ tiêu phản ánh về công dụng của thuốc (thể hiện ở độ tinh khiết và hàm lượng). Chỉ tiêu phản ánh về mức độ tin cậy và an toàn (độ độc, độ bền, hạn dùng...). Tiêu chuẩn về tâm sinh lý (dạng thuốc - qua các đường vào cơ thể). Chỉ tiêu về thẩm mỹ (hình thức đóng gói, trình bày đẹp, bảo quản...).

• Các nội dung chính của yêu cầu kỹ thuật:

Thông thường các nội dung chính của yêu cầu kỹ thuật của một tiêu chuẩn về thuốc bao gồm:

- Công thức pha chế: Phải trình bày công thức pha chế của thuốc, ghi rõ tên nguyên liệu, phụ liệu với số lượng ghi bằng số và bằng chữ, cùng tiêu chuẩn của chúng (ví dụ: tá dược đạt tiêu chuẩn Dược dụng...).
- Chất lượng thành phẩm: Phải nêu rõ về hình thức cũng như tính chất cảm quan, mức độ tinh khiết như: Hình dạng, thể chất, màu sắc, mùi vị, các đặc điểm đặc biệt, độ bền cơ học (với thuốc viên), độ tan rã, sai số khối lượng, sai số thể tích.
- Yêu cầu về định tính, thử độ tinh khiết
- Yêu cầu về hàm lượng.

• Phương pháp xây dựng các chỉ tiêu:

Dựa trên các nội dung chính của yêu cầu kỹ thuật, căn cứ vào thực tế, điều kiện kỹ thuật, lựa chọn ra các chỉ tiêu thích hợp, không quá nhiều hoặc quá ít nhưng nói lên đủ đặc trưng chất lượng thuốc, phù hợp với điều kiện cụ thể. Sau đó phải xây dựng được mức cho các chỉ tiêu trên. Mức chỉ tiêu là giá trị cụ thể hay là khoảng giá trị mà thuốc phải đạt được. Để xây dựng mức chỉ tiêu được tốt, trước hết nên xem xét:

- Nếu loại chỉ tiêu này đã có sẵn trong các qui định thì chỉ việc kiểm tra, xem xét lại, áp dụng hoặc đề xuất (thí dụ: nếu là thuốc viên, khối lượng trung bình viên qui định sai $\pm x\%$; nếu là thuốc nước, thể tích sai $\pm y\%$...).

- Nếu loại chỉ tiêu này chưa có trong qui định thì phải làm thực nghiệm, từ đó đưa ra số liệu cho phù hợp.
- Khi xây dựng mức phải được tiến hành làm thử với mẫu ít nhất lấy từ 3 lô sản xuất thử hay 3 lô sản phẩm đã có quá trình sản xuất ổn định; tốt nhất nên sử dụng phương pháp thống kê (xét sai số, độ chính xác, khoảng tin cậy...).
- Giới hạn tin cậy tìm được qua thử nghiệm, cần căn cứ thêm vào các điều kiện kinh tế, thực tế (khả năng sản xuất, trình độ kỹ thuật, tiêu chuẩn dung sai chung...) mà qui định mức chỉ tiêu đưa vào tiêu chuẩn.
- Nếu sản phẩm lấy ở nhiều lô hoặc được sản xuất ở nhiều cơ sở thì nên chọn chỉ tiêu trung bình tiên tiến $\bar{X}_{(tt)}$

$$\bar{X}_{(tt)} = \frac{\bar{X} + x_{\max}}{2}$$

Trong đó:

\bar{X} : chỉ tiêu trung bình của nhiều cơ sở đạt được

x_{\max} : chỉ tiêu cao nhất một cơ sở đạt được.

1.2.2.3. Phương pháp xây dựng tiêu chuẩn về phương pháp thử:

• Các loại qui trình về phương pháp thử:

Mục đích chính của việc tiêu chuẩn hoá một phương pháp thử là chọn cho được một qui trình thử hay qui trình phân tích sao cho khi áp dụng sẽ cho một kết quả gần với giá trị thực nhất. Trong kiểm nghiệm thuốc, các loại qui trình thử thường được chia thành 3 loại:

- Các phép thử định tính: là các phép thử nhằm chứng minh rằng chất cần phân tích có mặt trong mẫu đem thử. Phép thử được thực hiện bằng cách tiến hành các phản ứng định tính, đo các thông số đặc trưng các chất cần thử (tính chất phổ UV-VIS, IR, sắc ký...) hoặc so sánh với chất chuẩn đối chiếu.
- Các phép thử về độ tinh khiết: Là các phép thử nhằm chứng minh rằng mẫu đem thử đạt (hay không đạt) về mức độ tinh khiết. Phép thử được thực hiện bằng cách sử dụng một số tính chất đặc hiệu (màu sắc, độ đục...) để so sánh định lượng tạp chất có trong mẫu thử và mẫu chuẩn để từ đó xác định được giới hạn của tạp chất có trong mẫu đem phân tích.
- Các phép thử định lượng: Là những phép thử nhằm xác định hàm lượng của mẫu thử (hoặc thành phần chính của mẫu) hay hàm lượng của các hoạt chất có trong mẫu đem thử. Các phép thử này được tiến hành bằng các phương pháp định lượng hoá học, hoá lý, vật lý, sinh học ...

- Các yêu cầu chất lượng đối với một phương pháp thử:

Được thể hiện ở một số điểm chính sau:

* Có tính tiên tiến: Thể hiện ở độ đúng, độ chính xác, tính chọn lọc, đặc hiệu.

+ Độ đúng: Một phương pháp được coi là có độ đúng cao nghĩa là khi áp dụng sẽ cho kết quả gần với giá trị thực nhất tức là sai số $\frac{\bar{x} - \mu}{\mu} \times 100\%$ càng nhỏ càng tốt (trong đó \bar{x} : giá trị trung bình xác

định được; μ : giá trị thực).

Muốn có giá trị thực μ để so sánh, phải có mẫu chuẩn đã biết trước hoặc một mẫu điển hình được sản xuất theo một phương pháp đảm bảo đồng nhất và đại diện cho sản phẩm.

Độ đúng của phương pháp cũng còn được biểu thị bằng tỷ lệ thu hồi $\frac{\bar{x}}{\mu} \times 100\%$ (μ : là hàm lượng chất chuẩn cho vào; \bar{x} : là hàm lượng xác

định được). Tỷ lệ thu hồi càng cao (nhưng không được vượt quá 100%), độ đúng càng tốt.

+ Độ chính xác: Có độ chính xác đáp ứng được yêu cầu. Độ chính xác cho biết sự phù hợp giữa các kết quả (hay độ dao động) của các phép xác định song song, thường được biểu thị bằng độ lệch chuẩn S hoặc độ lệch chuẩn tương đối RSD :

$$S = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}} \text{ hoặc } RSD \% = \frac{S}{\bar{x}} 100 \%$$

(n: số thí nghiệm; x_i : kết quả xác định lần thứ i; \bar{x} : kết quả trung bình của n thí nghiệm).

+ Tính chọn lọc - đặc hiệu: Phương pháp cho phép xác định đúng chất cần phân tích và ít chịu ảnh hưởng bởi sự có mặt của các chất khác trong mẫu thử.

+ Có tính chất tuyến tính: Đối với trường hợp khi xác định kết quả phân tích dựa vào đường chuẩn. Đường chuẩn là đường biểu diễn $y = f(x)$. Trong đó x là nồng độ dung dịch, y là đại lượng tín hiệu đo (mật độ quang, diện tích pic sắc ký, chiều cao sóng cực phổ...) phụ thuộc vào x. Tính chất tuyến tính được biểu thị bằng cách tính hệ số hồi qui theo phương pháp bình phương tối thiểu. Nếu hệ số này càng gần 1 thì hàm y càng tuyến tính.

* Có tính thực tế: Phương pháp thử đưa ra phải phù hợp với điều kiện thực tế, có tính khả thi cao (phù hợp trang thiết bị, máy, kỹ thuật, hoá chất, thuốc thử, trình độ con người ...).

* Có tính kinh tế: Phương pháp thử đưa ra ít tốn kém mà vẫn đáp ứng các yêu cầu nêu trên.

* Có tính an toàn cao: An toàn lao động và bảo vệ sức khỏe (ít dùng hoá chất độc hại, tránh được các thao tác kỹ thuật phức tạp nguy hiểm ...).

• *Kinh nghiệm tiến hành xây dựng phương pháp thử:*

- Phải dựa trên yêu cầu kỹ thuật để chọn xây dựng phương pháp thử cho thích hợp.
- Tham khảo các tài liệu, các tiêu chuẩn tương tự đã có.
- Kết hợp với tự nghiên cứu, lựa chọn.
- Phải lấy mẫu và tiến hành làm thực nghiệm.
- Viết chương trình dự thảo có kèm bản thuyết minh, đưa ra các bảng kết quả thực nghiệm, xử lý kết quả, tài liệu tham khảo.

1.2.3. Công tác áp dụng tiêu chuẩn trong thực tế

1.2.3.1. Mục đích ý nghĩa

Áp dụng tiêu chuẩn là một mặt công tác của toàn bộ công tác tiêu chuẩn hoá. Qua áp dụng để:

- Kiểm chứng lại các kết quả nghiên cứu khi xây dựng tiêu chuẩn (mức chỉ tiêu có phù hợp không? Phương pháp thử đúng hay sai? ...).
- Xác định hiệu quả kinh tế của tiêu chuẩn (tiêu chuẩn có kích thích cho sản xuất, kích thích tiêu thụ). Trên cơ sở đó tiếp tục sửa đổi, hoàn thiện nâng cao chất lượng của tiêu chuẩn.
- Ngăn chặn việc đưa các thuốc không đạt tiêu chuẩn ra lưu hành, sử dụng. Phát hiện thuốc giả, thuốc kém chất lượng, phát hiện nguyên nhân vi phạm và tìm các biện pháp khắc phục.

1.2.3.2. Các hình thức áp dụng tiêu chuẩn trong thực tế

• *Áp dụng tiêu chuẩn trong sản xuất:*

Nghĩa là phải thực hiện đúng các tiêu chuẩn (kỹ thuật, thủ tục, nguyên tắc và các qui định có liên quan) để sản xuất ra thuốc đạt tiêu chuẩn. Thí dụ: Phải kiểm tra xử lý nguyên vật liệu đạt tiêu chuẩn mới đưa vào sản xuất; trong quá trình sản xuất phải kiểm tra; tất cả các công đoạn, 100% lô sản xuất tại cơ sở; kiểm tra thu nhận sản phẩm...

- *Áp dụng tiêu chuẩn trong kiểm tra chất lượng:*

Nghĩa là tiến hành thực nghiệm tất cả các chỉ tiêu yêu cầu kỹ thuật theo đúng phương pháp thử đã nêu để đánh giá xem thuốc có đạt tiêu chuẩn hay không.

1.2.3.3 Các công việc phải thực hiện

- *Phổ biến, giải thích, cung cấp tiêu chuẩn tùy theo cấp quản lý:*
 - Các cơ quan chức năng: Bộ Y tế, Sở Y tế chịu trách nhiệm cung cấp tiêu chuẩn sau khi duyệt.
 - Các cơ quan kỹ thuật: Viện Kiểm nghiệm, Trung tâm Kiểm nghiệm tỉnh, thành phố hướng dẫn giải thích và thi hành việc áp dụng tiêu chuẩn.
- *Lập kế hoạch các biện pháp áp dụng tiêu chuẩn:*
 - Về tổ chức: Qui định trách nhiệm, quyền hạn của các cấp quản lý, các bộ phận thực hiện. Qui định về con người (phải được đào tạo để có thể đáp ứng được việc thực hiện tiêu chuẩn).
 - Về kỹ thuật: Soát xét lại trang thiết bị, hoá chất, chất chuẩn, thuốc thử, nhà xưởng, phòng thí nghiệm ... để đáp ứng đầy đủ theo yêu cầu của tiêu chuẩn đề ra.

- *Kiểm tra áp dụng tiêu chuẩn:*

Công việc này được tiến hành thường xuyên ở các cơ sở hoặc ở hệ thống kiểm tra nhà nước: Viện Kiểm nghiệm, Trung tâm Kiểm nghiệm, thanh tra Dược ... Nội dung kiểm tra bao gồm:

- Kiểm tra cơ sở vật chất của công tác kiểm nghiệm: Tài liệu, trang thiết bị, phòng thí nghiệm, hoá chất, thuốc thử ...
- Kiểm tra nguyên liệu, bán thành phẩm, thành phẩm và tất cả các thuốc đang lưu hành trên thị trường.

1.2.3.4. Sửa đổi, soát xét lại tiêu chuẩn

Được tiến hành khi thấy tiêu chuẩn không còn phù hợp.

1.2.4. Giới thiệu Dược điển Việt Nam

1.2.4.1. Một số nét chung về Dược điển Việt Nam

- *Dược điển Việt Nam là một tài liệu bao gồm:*
 - Tập hợp các tiêu chuẩn nhà nước (TCVN) về thuốc (hoá dược và các chế phẩm, huyết thanh và vaccin, dược liệu, chế phẩm đông dược). Mỗi tiêu chuẩn còn được gọi là một chuyên luận.

- Những qui định chung trong công tác kiểm nghiệm, giới thiệu các phương pháp kiểm nghiệm chung, các hoá chất, thuốc thử, thuốc chuẩn, chỉ thị ... dùng để phân tích và đánh giá chất lượng thuốc.
- Một số phụ lục, các bảng tra cứu ...
- *Dược điển Việt Nam được gọi tên theo lần xuất bản (giống các nước khác), tuân theo qui tắc lần sau phủ nhận lần trước đó:*
 - Dược điển Việt Nam I: gồm 638 chuyên luận tân dược và 284 chuyên luận đông dược (tập 1 in 1970, tập 1 bổ sung in 1977, tập 2 đông dược in lần 1 vào 1983).
 - Dược điển Việt nam II: gồm 357 chuyên luận tân dược, 64 chuyên luận đông dược, và 32 chuyên luận về vaccin (tập 1 in 1990, tập 2 in 1991 và tập 3 in 1994).
 - Dược điển Việt nam III: gồm 342 chuyên luận hoá dược, 276 chuyên luận về dược liệu, 37 chuyên luận về chế phẩm đông dược, 47 chuyên luận chế phẩm sinh học và 500 chuyên luận về hoá chất thuốc thử. (Quá trình biên soạn chuẩn bị từ 1995-2000, dự thảo in lấy ý kiến 2000, in chính thức 2002).

1.2.4.2. Một số qui định chung khi sử dụng Dược điển Việt Nam (trong công tác kiểm nghiệm thuốc)

Có nhiều qui định, dưới đây nêu tóm tắt nội dung chính của 10 qui định:

1. Tên các chuyên luận: lấy tên chính là tên Việt Nam, sau tên Việt Nam là tên Latin và tên thông dụng khác nếu có.
2. Đơn vị đo lường: sử dụng theo đúng yêu cầu của cơ quan đo lường nhà nước Việt Nam.
3. Khái niệm “cân chính xác” nghĩa là cân trên cân phân tích có độ nhạy đến 0,1 mg (0,0001 g). Khái niệm “lấy khoảng” có ý nghĩa là lấy một lượng với độ chênh không quá $\pm 10\%$ so với yêu cầu. Khái niệm “Đến khối lượng không đổi” nghĩa là xử lí chế phẩm đến khi nào sai giữa 2 lần kế tiếp nhau $< 0,5$ mg.
4. Nồng độ phần trăm không có chỉ dẫn gì coi là cách biểu diễn theo % KL/TT. Còn các trường hợp khác sẽ ghi cụ thể.
5. Khái niệm “alcol” không có chỉ dẫn gì có nghĩa là alcol chứa khoảng 96% (TT/TT) ethanol (C_2H_6O). Ethanol không có chỉ dẫn gì khác nghĩa là ethanol tuyệt đối.
6. Độ tan : Qui ước:

Một chất là dễ tan : Khi hoà 1g chất dưới 1ml dung môi

Rất tan :	-nt-	1 - 10 ^{ml}	-nt-
Tan :	-nt-	> 10-30 ^{ml}	-nt-
Hơi tan :	-nt-	> 30-100 ^{ml}	-nt-
Khó tan :	-nt-	> 100-1000 ^{ml}	-nt-
Rất khó tan :	-nt-	>1000-10.000 ^{ml}	-nt-
Thực tế không tan :	-nt-	>10.000 ^{ml}	-nt-

7. Về nhiệt độ: Dùng thang độ bách phân ký hiệu °C. Khi không ghi cụ thể, qui ước :

Nhiệt độ chuẩn:	20°C
Nhiệt độ thường:	20-30°C
Nước ấm:	40-50°C
Nước nóng:	70-80°C
Nước cách thủy:	98-100°C

Nhiệt độ trong thử “về mất khối lượng do làm khô” cho phép hiểu là: 100 °C ± 2 °C.

Nhiệt độ nơi bảo quản :

Rất lạnh:	<-10 °C
Lạnh:	2-10 °C
Mát:	10-20 °C
Nhiệt độ phòng :	20-35 °C
Nhiệt độ phòng có điều nhiệt :	20-25 °C
Nóng:	35-40 °C
Rất nóng:	> 40 °C
Nung đỏ:	~ 400 °C
Đỏ thẫm:	~ 600 °C
Đỏ trắng:	≥ 900°C

8. Về phương pháp: Có thể dùng phương pháp hay phương tiện khác với qui định trong Dược điển hoặc TC nhưng với điều kiện các kết quả có độ chính xác tương đương nhau. Nếu các kết quả khác nhau thì coi phương pháp hoặc phương tiện qui định trong Dược điển hay TC là chính thức.

9. Về hàm lượng: Nếu trong chuyên luận không ghi giới hạn trên thì có nghĩa là không được quá 101,0%.

10. Khi thử độ tinh khiết, nếu phát hiện thấy tạp chất lạ không ghi trong chuyên luận thì vẫn phải ghi vào kết quả thử.

1.3. KIỂM NGHIỆM THUỐC THEO TIÊU CHUẨN

Như trên đã nêu, kiểm nghiệm thuốc là việc tiến hành phân tích một mẫu thuốc đại diện cho lô thuốc đó bằng các phương pháp hoá học, lý học, hoá lý, sinh học ... đã được qui định để xem thuốc đó đạt hay không đạt tiêu chuẩn từ đó quyết định xem có được phép lưu hành hoặc sử dụng hay không. Để sự đánh giá này chính xác, đòi hỏi phải làm tốt 3 việc sau: lấy mẫu kiểm nghiệm, thực hành phân tích, đánh giá kết quả và viết phiếu trả lời (phiếu kiểm nghiệm, phiếu phân tích).

1.3.1. Lấy mẫu kiểm nghiệm

1.3.1.1. Một số khái niệm

- **Lô thuốc:** Là một lượng thuốc xác định của cùng một loại sản phẩm được sản xuất trong một chu kỳ nhất định đáp ứng yêu cầu GMP, được coi là đồng nhất và được ghi bằng số lô của cơ sở sản xuất trên nhãn các bao bì.
- **Tổng thể:** Là toàn bộ các đơn vị sản phẩm được xét. Tùy theo từng trường hợp tổng thể có thể là một lô, một số lô hay một quá trình sản xuất.
- **Đơn vị bao gói:** Là dạng bao gói sản phẩm lặp lại trong lô (thùng, hòm, hộp...).
- **Đơn vị đóng gói:** Là dụng cụ đóng gói trực tiếp sản phẩm (chai đựng thuốc viên, vỉ thuốc ...).
- **Đơn vị sản phẩm:** Là đối tượng qui ước hoặc cụ thể của một lượng sản phẩm nhất định (viên thuốc, ống thuốc, 1g, 1kg ...).
- **Mẫu:** Là một số đơn vị sản phẩm lấy từ tổng thể để thử và được dùng làm cơ sở để có những thông tin quyết định về tổng thể đó. Số đơn vị sản phẩm có trong lô gọi là cỡ lô, số đơn vị có trong mẫu gọi là cỡ mẫu.
- **Mẫu ban đầu:** Là một lượng sản phẩm của lô thuốc được lấy trong một lần ở một hay nhiều đơn vị bao gói. Mỗi bao gói lấy một lần.
- **Mẫu riêng:** Là một lượng sản phẩm được lấy từ những mẫu ban đầu đã được gộp lại và trộn đều của một bao gói.
- **Mẫu chung:** Là một lượng sản phẩm được lấy từ những mẫu riêng của từng đơn vị bao gói gộp lại và trộn đều.
- **Mẫu trung bình thí nghiệm:** Là một lượng sản phẩm được lấy ra từ mẫu chung dùng để tiến hành các phép thử qui định (kể cả làm lại).

- Mẫu lưu: Được lấy từ mẫu trung bình thí nghiệm hay từ mẫu ban đầu tương đương với lượng mẫu thử. Mẫu lưu dùng để lưu lại khi cần thiết hoặc để làm các thí nghiệm trọng tái.

1.3.1.2. Qui định về lấy mẫu

Lấy mẫu là một tập hợp các thao tác nhằm lấy ra một lượng mẫu thuốc đại diện để kiểm tra chất lượng. Do vậy để kết luận về mẫu thuốc mang tính pháp lý, cần phải tuân thủ một cách nghiêm ngặt các qui định về thủ tục lấy mẫu như sau:

- *Đối tượng để lấy mẫu:*

- Với hệ thống tự kiểm tra: Là các nguyên liệu dùng làm thuốc, bao bì đóng gói, sản phẩm trung gian, sản phẩm chưa đóng gói, thành phẩm.
- Với hệ thống quản lý nhà nước: Thuốc và các nguyên liệu làm thuốc đang trong quá trình lưu thông hoặc tồn trữ trong kho.

- *Các trường hợp lấy mẫu:*

- Trường hợp tự kiểm tra chất lượng: Phải lấy mẫu kiểm tra toàn bộ các lô thuốc tại các cơ sở sản xuất, lưu trữ, phân phối. Với các cơ sở sản xuất thuốc, yêu cầu 100% số lô phải được kiểm tra. Việc lấy mẫu do cán bộ chuyên môn của phòng kiểm tra chất lượng sản phẩm (KCS) tiến hành, có sự chứng kiến của cán bộ ở đơn vị lấy mẫu. Thủ trưởng đơn vị căn cứ vào qui định chung có thể có những qui định cụ thể hơn cho phù hợp với tình hình của cơ sở.
- Trường hợp kiểm tra giám sát chất lượng hoặc thanh tra: Ưu tiên lấy mẫu kiểm tra và giám sát là các thuốc chữa bệnh, có giá trị kinh tế cao, có chất lượng không ổn định và đặc biệt là có nghi ngờ về hàm lượng hoặc hiệu lực tác dụng.

Lấy mẫu để kiểm tra giám sát chất lượng của các cơ sở sản xuất (lấy 10% số lô sản xuất trong năm) hoặc lấy theo qui định của Bộ Y tế, Sở Y tế.

Lấy mẫu để thanh tra đột xuất trong những trường hợp có thông tin về chất lượng thuốc xấu, thuốc không an toàn, ít hiệu lực và đặc biệt là thuốc giả hay thuốc kém phẩm chất.

Việc lấy mẫu được thực hiện bởi các thanh tra viên hoặc các cán bộ có giấy uỷ nhiệm của cơ quan kiểm tra, thanh tra và có sự chứng kiến của cán bộ cơ sở.

- *Các điều kiện cần lưu ý khi lấy mẫu:*

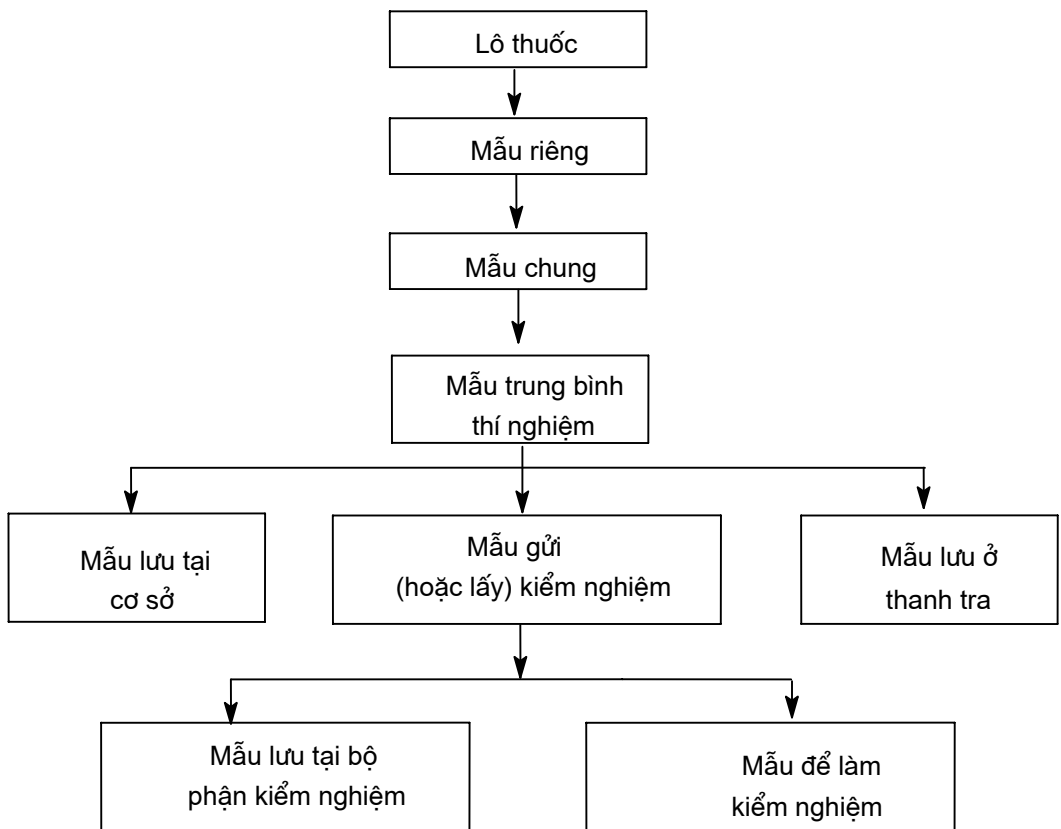
- Nơi lấy mẫu: Tại nơi chứa sản phẩm, môi trường xung quanh không được gây nhiễm bẩn hoặc tác động làm thay đổi tính chất của mẫu và ngược lại không để mẫu tác động xấu đến môi trường.
- Người lấy mẫu: Phải là người có chuyên môn nhất định và đáp ứng được yêu cầu của quá trình lấy mẫu.

- Phải quan sát kiểm tra sơ bộ lô hàng (phân loại nếu cần), nhận xét và phải ghi vào biên bản lấy mẫu.
- Dụng cụ lấy mẫu: Sạch, khô, đáp ứng yêu cầu cần lấy mẫu.
- Đồ đựng mẫu: Đáp ứng yêu cầu lấy mẫu (sạch, không làm hỏng mẫu, khô, có nhãn ghi chép đầy đủ ...).
- Thao tác lấy mẫu: Phải thận trọng, tỉ mỉ, quan sát cẩn thận ...
- Phương thức lấy mẫu: Người lấy mẫu phải tự tay lấy mẫu, ghi nhãn, làm biên bản, đóng gói niêm phong bảo đảm và bảo quản mẫu. Đặc biệt lưu ý phải lấy chữ ký xác nhận của đơn vị được lấy mẫu.

1.3.1.3. Tiến hành lấy mẫu

Sơ đồ lấy mẫu:

Việc lấy mẫu phải bảo đảm cho được tính khách quan, đại diện cho được chất lượng của thuốc cần lấy kiểm tra. Vì vậy, phải lấy theo hướng dẫn của qui trình (hình 1.1).



Hình 1.1. Sơ đồ qui trình lấy mẫu, lưu mẫu

- Từ lô sản xuất lấy ra các đơn vị bao gói một cách ngẫu nhiên, cỡ mẫu ban đầu lấy theo chỉ dẫn ở phần sau.
- Trộn đều các mẫu ban đầu và gộp thành những mẫu riêng của từng đơn vị bao gói.
- Trộn đều các mẫu riêng thành mẫu chung.
- Từ mẫu chung lấy ra một lượng mẫu trung bình thí nghiệm.
- Từ mẫu trung bình thí nghiệm lấy ra thành các mẫu lưu và mẫu thử để kiểm nghiệm

Sau khi lấy mẫu xong, người lấy mẫu tự tay dán nhãn niêm phong, bao gói (phải có chữ ký xác nhận của người lấy mẫu và cơ sở được lấy mẫu) và biên bản lấy mẫu (cũng phải có đủ chữ kí xác nhận).

Lấy mẫu cụ thể:

Cần cứ vào lô thuốc phải lấy mẫu, xem xét phân loại tiến hành lấy như sau:

- **Lấy mẫu thuốc có phân liều** (lô sản phẩm thuộc dạng thuốc có phân liều).

Từ lô sản phẩm lấy ra các đơn vị bao gói một cách ngẫu nhiên bất kỳ: Các gói được lấy ra phải độc lập với dự kiến của người lấy mẫu (không nên lựa chọn theo cảm quan lấy mẫu xấu hay mẫu tốt). Lô thuốc phải đồng nhất, hợp lý về số lượng hay khối lượng (Thí dụ không quá 500.000 viên với thuốc viên, không quá 50.000 ống với dạng ống ...).

Số bao gói trong lô lấy ra để tạo mẫu ban đầu tính theo công thức :

$$n = 0,4 \times \sqrt{N}$$

Trong đó:

n: số bao gói lấy ra

N: số đơn vị bao gói cuối cùng trong lô (thí dụ với thuốc tiêm: các ống đóng trong hộp giấy, các hộp giấy đóng trong hòm thì đơn vị bao gói cuối cùng là hòm).

Chú ý:

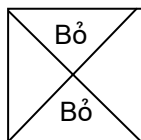
- + Khi tính theo công thức trên, nếu phân thập phân nhỏ hơn 0,5 bỏ qua, nếu lớn hơn 0,5 thì tăng thêm một đơn vị.
- + Khi $N > 100$ lưu ý $n_{\max} \leq 30$
- + Khi $N < 100$ có thể dùng bảng:

N	n
1 - 10	1
11 - 40	2
41 - 80	3
81 - 100	4

- *Lấy mẫu sản phẩm là chất rắn* (hạt, bột, viên):

1. Trường hợp một bao gói:

- + Trước khi lấy, xem xét sản phẩm có đồng nhất không, nếu không đồng nhất phải chọn riêng ra từng loại và lấy theo các loại đó.
- + Trường hợp sản phẩm là hạt, cục, trừ trường hợp phải xác định cỡ hạt, còn tất cả phải được nghiền nhỏ thành bột (không được làm ảnh hưởng tới tính chất của sản phẩm).
- + Lấy mẫu ban đầu ở 3 vị trí khác nhau: trên, giữa, dưới sau đó trộn thành mẫu chung.
- + Dàn đều lượng mẫu chung thành lớp phẳng hình vuông dày không quá 2 cm, chia mẫu thành 2 đường chéo, bỏ 2 phần đối diện, trộn đều 2 phần còn lại và chia tiếp cho đến khi lượng mẫu còn lại tương ứng với 2-4 lần mẫu thử cần lấy, đó là mẫu trung bình thí nghiệm.
- + Chia mẫu trung bình thí nghiệm thành các mẫu lưu và mẫu kiểm nghiệm.



2. Đối với thuốc viên chỉ đóng trong một bao gói: cũng lấy mẫu ở ba vị trí khác nhau trong bao gói, chai, lọ sau đó trộn thành mẫu chung, mẫu trung bình thí nghiệm ... như trên.

3. Trường hợp sản phẩm đóng thành nhiều bao gói: lấy mẫu ban đầu theo công thức: $n = 0,4 \times \sqrt{N}$ nêu trên.

- *Lấy mẫu là sản phẩm lỏng:*

1. Trường hợp một bao gói: Nếu sản phẩm là đồng nhất thì lấy mẫu ở bất kì vị trí nào cũng được. Nếu không đồng nhất, trước khi lấy mẫu phải khuấy đều, sau đó mới lấy mẫu.

2. Trường hợp nhiều bao gói : lấy theo công thức : $n = 0,4 \times \sqrt{N}$

Nếu là những chai lọ nhỏ thì có thể lấy hết thể tích.

- *Lấy mẫu là các sản phẩm thuốc mỡ, bột nhão:*

Tiến hành lấy mẫu như các sản phẩm lỏng, rắn nhưng chú ý khuấy kỹ, trộn đều để được hỗn hợp đồng nhất, sau đó mới lấy mẫu.

- *Lấy mẫu thành phẩm chưa đóng gói lẻ:*

Thường các thành phẩm này chứa trong các bao gói lớn để chuyên chở đến cơ sở đóng gói lẻ. Nếu lô sản phẩm chỉ có 1 - 2 bao gói thì mở cả 2 bao gói;

nếu lô sản phẩm có từ 3 bao gói trở lên thì mở 3 bao gói. Lấy ít nhất 3 mẫu ban đầu ở 3 vị trí khác nhau của mỗi bao gói. Sau đó trộn các mẫu ban đầu lại với nhau để tạo mẫu thí nghiệm.

Bao gói và dán nhãn:

Sau khi lấy mẫu và cho vào đồ đựng, người lấy mẫu bao gói, dán nhãn và niêm phong mẫu, làm biên bản lấy mẫu. Lưu ý phải có chữ ký xác nhận của cơ sở được lấy mẫu ở nhãn niêm phong và biên bản lấy mẫu.

1.3.2. Tiến hành kiểm nghiệm

1.3.2.1. Nhận mẫu

Bộ phận nhận mẫu của cơ quan kiểm nghiệm phải kiểm tra xem mẫu có đáp ứng đủ các yêu cầu sau không:

- Mẫu phải được lấy theo đúng các thủ tục đã qui định trên.
- Mẫu phải được đóng gói niêm phong và có nhãn ghi đủ các thông tin cần thiết (nhãn gốc, tên thuốc, số lô sản xuất, tên tiêu chuẩn yêu cầu kiểm tra ...).
- Các mẫu do thanh tra lấy về phải có kèm biên bản lấy mẫu.
- Các mẫu gửi phải kèm công văn hoặc giấy giới thiệu.
- Nếu mẫu xin phép sản xuất phải kèm các tài liệu theo qui định thuốc xin đăng ký sản xuất.
- Nếu mẫu nhận qua đường bưu điện, phải kiểm tra kỹ niêm phong sau đó báo lại cho nơi gửi mẫu, chỉ sau khi nhận được ý kiến trả lời của nơi gửi mẫu mới tiến hành kiểm nghiệm.

1.3.2.2. Kiểm nghiệm, xử lý kết quả

Công việc này do bộ phận kỹ thuật thực hiện. Thông thường gồm các nội dung sau :

- Chuẩn bị tài liệu: theo TCVN hoặc TC ...
- Chuẩn bị dụng cụ, hoá chất, máy... đáp ứng đủ yêu cầu mà tiêu chuẩn qui định. Bố trí thí nghiệm một cách hợp lý để có đủ mẫu làm và không làm nhiễm bẩn hoặc biến chất mẫu cần thử.
- Tiến hành các thí nghiệm phân tích theo tiêu chuẩn.
- Người làm kiểm nghiệm phải có cuốn sổ ghi chép đầy đủ các số liệu khi tiến hành thí nghiệm, sổ này gọi là Sổ tay kiểm nghiệm viên. Sổ tay kiểm nghiệm viên được coi là chứng từ gốc của các số liệu sau này công bố trên phiếu trả lời kết quả kiểm nghiệm (gọi là phiếu kiểm nghiệm).
- Xử lý các số liệu thực nghiệm để quyết định xem các chỉ tiêu đã thử theo tiêu chuẩn đạt hay không đạt yêu cầu.

1.3.2.3. Viết phiếu trả lời kết quả

Bằng phiếu kiểm nghiệm hay phiếu phân tích.

Phiếu kiểm nghiệm là văn bản pháp lý của các tổ chức kiểm tra chất lượng thuốc, xác nhận kết quả kiểm nghiệm theo tài liệu kỹ thuật hợp pháp của một mẫu thuốc.

Phiếu phân tích là văn bản pháp lý xác nhận kết quả phân tích của một hay nhiều tiêu chí trong tiêu chuẩn kỹ thuật của một mẫu thuốc.

Do vậy, sau khi hoàn thành các thí nghiệm và xử lý số liệu đánh giá kết quả, kiểm nghiệm viên phải viết vào phiếu trả lời nội bộ (chưa phải phiếu chính thức), ký tên chịu trách nhiệm và đưa cho cán bộ phụ trách phòng duyệt lại, trước khi đưa phòng chức năng trình lãnh đạo duyệt lần cuối, sau đó trả lời chính thức bằng phiếu của cơ quan kiểm nghiệm (gọi là phiếu kiểm nghiệm hay phiếu phân tích). Phiếu kiểm nghiệm chỉ cần có chữ ký và con dấu của giám đốc cơ quan kiểm nghiệm hoặc đơn vị.

Câu chữ viết trong phiếu kiểm nghiệm phải rõ ràng, chính xác, gọn, đầy đủ và thống nhất. Nội dung chính của một phiếu kiểm nghiệm phải có: Phần tiêu đề (bao gồm tên cơ quan kiểm nghiệm, số phiếu kiểm nghiệm, tên mẫu kiểm nghiệm, lý lịch mẫu kiểm nghiệm...), các chỉ tiêu thử và kết quả, kết luận cuối cùng về mẫu thuốc kiểm nghiệm... Dưới đây là mẫu thông dụng của một phiếu kiểm nghiệm (xem ở trang sau).

1.3.2.4. Lưu mẫu kiểm nghiệm tại cơ quan kiểm nghiệm

Mẫu lưu phải được đánh số cùng với số đăng ký mẫu thử cùng loại, nhưng có nhãn riêng với chữ “mẫu lưu” và bảo quản trong điều kiện theo qui định chung, mẫu này được sử dụng đến trong trường hợp có tranh chấp về kết quả đã công bố (ở phiếu kiểm nghiệm). Thông thường, mẫu lưu lấy từ một phần mẫu đã lấy để thử, do vậy số lượng lấy phải giống như mẫu lấy để thử.

BỘ Y TẾ
Tên cơ quan
kiểm nghiệm thuốc

CỘNG HOÀ XÃ HỘI CHỦ NGHĨA VIỆT NAM
Độc lập - Tự do - Hạnh phúc

Địa chỉ cơ quan

PHIẾU KIỂM NGHIỆM

Mẫu kiểm nghiệm: Viên nang Cephalexin 500mg

Nơi sản xuất: Công ty Dược phẩm X

Số lô, hạn dùng:..... Số đăng ký:.....

Người và nơi gửi mẫu:.....

Yêu cầu kiểm nghiệm (*ghi rõ nội dung, số, ngày, tháng, năm của công văn hay giấy tờ kèm theo*):.....

Ngày tháng, năm nhận mẫu:..... Số đăng ký KN:.....

Người nhận mẫu:.....

Thủ theo; Dược điển Việt Nam III

Tình trạng mẫu khi nhận và mở niêm phong để kiểm nghiệm:.....

Yêu cầu	Kết quả
1. Tính chất: Nang nhẵn bóng, không méo mó, bột thuốc bên trong đồng nhất.	Đạt
2. Định tính: Chế phẩm phải có phản ứng đặc trưng của cephalaxin	Đúng
3. Nước: Không được quá 10%	Đạt (6,75%)
4. Độ đồng đều khối lượng: Khối lượng trung bình viên $\pm 7,5\%$	Đạt
5. Độ hoà tan: Không ít hơn 80% cephalaxin ($C_{16}H_{17}O_4S$) ghi trên nhãn được hoà tan trong 45 phút.	Đạt (86,5%)
6. Định lượng: Hàm lượng cephalaxin khan ($C_{16}H_{17}O_4S$) từ 92,5–110% so với lượng ghi trên nhãn.	Đạt (98,6%)

Kết luận: Mẫu thử này đạt yêu cầu kiểm tra chất lượng theo tiêu chuẩn Dược điển Việt Nam III.

Hà Nội, ngày ... tháng năm

Thủ trưởng cơ quan

(Ký và đóng dấu)

Các mẫu lưu phải được giữ lại theo đúng thời gian qui định. Các mẫu có hạn dùng phải lưu tiếp 3 tháng kể từ khi hết hạn dùng. Khi hết thời gian lưu, cơ quan lập biên bản xử lý theo qui chế.

Sổ sách, phiếu kiểm nghiệm phải lưu giữ ít nhất là 3 năm. Khi hết hạn lưu, muốn huỷ phải được giám đốc cơ quan duyệt.

1.3.3. Nội dung chính của thực hành tốt phòng kiểm nghiệm (GLP)

Mục đích cơ bản của GLP là nhằm xây dựng được một đơn vị làm công tác kiểm nghiệm đáp ứng đầy đủ mọi yêu cầu của công tác kiểm tra chất lượng thuốc đề ra, để đảm bảo rằng kết quả các phép phân tích thu được là có tính chọn lọc cao, chính xác và đúng đắn, có tính pháp lí. Đồng thời giúp cho việc tra cứu và tìm được nhanh chóng nguồn gốc của các sai sót xảy ra khi gặp phải. Vì vậy, GLP là những qui định nhằm đảm bảo thuốc có chất lượng tốt trong quá trình sản xuất, tồn trữ tại kho và lưu thông phân phối đến tay người sử dụng. Cụ thể là những qui định chặt chẽ và được chuẩn hoá cho một cơ sở kiểm nghiệm phải tuân thủ về mọi mặt: nhân sự, tổ chức, cơ sở vật chất, trang thiết bị, hoá chất thuốc thử, qui trình thử nghiệm, các điều khoản kiểm tra, báo cáo kết quả, lưu giữ số liệu ...

1.3.3.1. Về tổ chức và nhân sự

- Một phòng kiểm nghiệm thuốc phải có đủ các bộ phận chuyên môn, hậu cần, đăng ký và lưu trữ mẫu ... có chức năng nhiệm vụ rõ ràng, được xây dựng và được người có thẩm quyền ban hành.
- Các nhân viên phải được đào tạo và huấn luyện về chuyên môn để có thể thực hiện được các nhiệm vụ được giao có tinh thần trách nhiệm cao.
- Các nhân viên phải mặc trang phục theo qui định, phải được kiểm tra sức khoẻ, không làm nhiệm vụ vào các phép thử và các dụng cụ, hệ thống thử nghiệm...

1.3.3.2. Về cơ sở vật chất chung

- Phải có diện tích làm việc phù hợp với yêu cầu đặt ra: Có đủ diện tích, có qui mô, kích thước xây dựng thích hợp cho phép sắp xếp trật tự, hợp lí các dụng cụ, trang thiết bị. Có môi trường tốt về: chiếu sáng, thông gió, nhiệt độ, độ ẩm ...
- Phải đảm bảo tính biệt lập: cơ sở thí nghiệm phải không bị nhiễm bẩn do môi trường hoặc các bộ phận lân cận khác, bảo đảm vệ sinh theo qui định.
- Bảo đảm công tác an toàn, các phương tiện bảo hộ lao động, sử dụng và bảo quản chất độc hại, xử lý chất thải ...

1.3.3.3. Trang thiết bị

- Phải được trang bị đầy đủ các trang thiết bị để đáp ứng thích hợp các yêu cầu thử nghiệm. Các trang thiết bị này cần được lựa chọn, chuẩn hoá, có chất lượng.
- Thiết bị phải đặt ở vị trí thích hợp tiện cho sử dụng, vận hành, kiểm tra, vệ sinh, bảo dưỡng.
- Định kỳ phải được kiểm tra, chuẩn hoá, bảo dưỡng.
- Phải có nội qui vận hành, hướng dẫn sử dụng, có cá nhân chịu trách nhiệm.

1.3.3.4. Cơ sở vật chất cho các phép thử

- Tất cả các phép thử phải có qui trình được viết chi tiết và được chuẩn hoá. Mọi hoá chất, thuốc thử, chất chuẩn ... phải đáp ứng đúng các yêu cầu qui định.
- Thuốc thử, hoá chất, các dung dịch... đã bị biến chất hay quá hạn không được phép sử dụng.

1.3.3.5. Qui định về nguyên tắc, cơ sở cho các phép thử về định tính, thử độ tinh khiết, định lượng về hàm lượng, hay hoạt lực của thuốc, độ bền vững của thuốc, qui định về mẫu thử, thuốc thử và chất đối chiếu...

1.3.3.6. Qui định về qui trình và hướng dẫn thử nghiệm

- Qui trình và hướng dẫn thử nghiệm phải rõ ràng, chính xác, được chuẩn hoá và được lãnh đạo duyệt thông qua.
- Kiểm nghiệm viên tiến hành thử nghiệm phải báo cáo một cách chi tiết những hiện tượng gặp phải trong quá trình thử nghiệm với phụ trách.

1.3.3.7. Qui trình về báo cáo kết quả

Phải báo cáo đầy đủ để cho thấy rõ : mục đích của phép thử nghiệm, nơi thử nghiệm, tên mẫu thử, ngày thử nghiệm, phương pháp áp dụng để thử, người thử nghiệm, các phương pháp thống kê áp dụng để phân tích số liệu, kết quả thử nghiệm và bàn luận, kết luận, ký xác nhận, nơi lưu trữ mẫu lưu, hồ sơ, tài liệu...

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Bộ Y tế (2002). Dược điển Việt Nam III. NXB Y học. Hà Nội.
2. Bộ Y tế (2002). Các văn bản quản lý nhà nước trong lĩnh vực Dược. NXB Y học. Hà Nội.
3. Đặng Văn Hoà (2001). Giáo trình kiểm nghiệm thuốc. Đại học Y Dược Thành phố Hồ Chí Minh.
4. Liên hiệp các xí nghiệp Dược Việt Nam (1990). Hướng dẫn thực hành sản xuất thuốc tốt (sách dịch). NXB Ngoại Văn. Hà Nội.

CÂU HỎI TỰ LƯỢNG GIÁ

- 1.1. Mục tiêu của công tác kiểm tra chất lượng thuốc? Các yêu cầu cơ bản để đạt mục tiêu trên ?
- 1.2. Nội dung chính của công tác kiểm tra chất lượng thuốc? Điều kiện để thuốc được đưa vào lưu thông, phân phối, sử dụng? Các yếu tố ảnh hưởng đến chất lượng thuốc ?
- 1.3. Thế nào là thuốc đạt và không đạt tiêu chuẩn? Thuốc giả mạo? Thuốc kém phẩm chất?
- 1.4. Trình bày hệ thống tổ chức kiểm tra chất lượng thuốc của Việt Nam?
- 1.5. Nội dung chính của công tác tiêu chuẩn hoá? Nội dung chính của một tiêu chuẩn về thuốc?
- 1.6. Trình bày phương pháp xây dựng tiêu chuẩn về yêu cầu kỹ thuật? về phương pháp thử? Yêu cầu chất lượng đối với một phương pháp thử ?
- 1.7. Nội dung chính của công tác áp dụng tiêu chuẩn trong thực tế?
- 1.8. Trình bày một số qui định chung khi sử dụng Dược điển Việt Nam (dùng trong công tác kiểm nghiệm thuốc)?
- 1.9. Cách tiến hành lấy mẫu để kiểm nghiệm?
- 1.10. Trình bày các nhiệm vụ chủ yếu khi tiến hành kiểm nghiệm?
- 1.11. Nội dung chính của thực hành tốt phòng kiểm nghiệm thuốc?

Chương 2

KIỂM NGHIỆM THUỐC BẰNG CÁC PHƯƠNG PHÁP HÓA HỌC

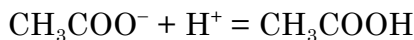
MỤC TIÊU HỌC TẬP

3. Trình bày được cách định tính và xác định giới hạn tạp chất trong thuốc.
4. Giải thích được kỹ thuật định lượng các acid, base và các loại muối trong môi trường khan.
5. Trình bày được cách sử dụng thuốc thử Karl Fischer để xác định hàm lượng nước trong các mẫu phân tích rắn, trong dung môi hữu cơ.
6. Viết được phương trình phản ứng định lượng một số chất hữu cơ (polyol, và amino alcol) bằng thuốc thử periodat.
7. Phân tích được ứng dụng của cặp ion trong kiểm nghiệm thuốc.

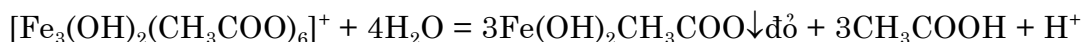
2.1. CÁC PHẢN ỨNG ĐỊNH TÍNH

2.1.1. Acetat

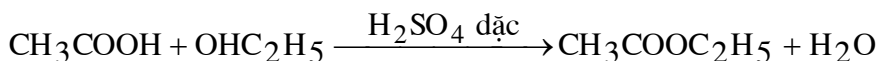
- Phản ứng với các acid (mạnh hơn acid acetic) giải phóng acid acetic có mùi chua:



- Với dung dịch FeCl_3 loãng cho phức màu đỏ $[\text{Fe}_3(\text{OH})_2(\text{CH}_3\text{COO})_6]^+$. Khi pha loãng và đun sôi sẽ cho kết tủa màu đỏ:

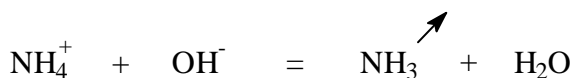


- Với H_2SO_4 đặc và $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ tạo ra este etyl acetat có mùi thơm:



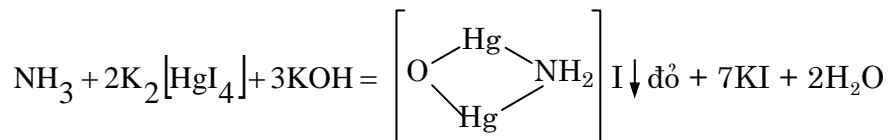
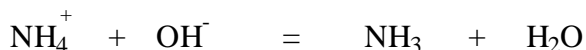
2.1.2. Amoni (muối)

- Bị phân huỷ khi đun nóng với dung dịch NaOH , giải phóng khí NH_3 :



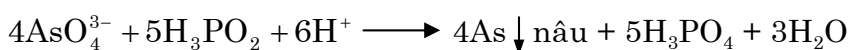
Nhận biết NH_3 bằng các dấu hiệu: Mùi khai, làm xanh giấy quì đỏ tẩm ướt, làm hồng giấy tẩm phenolphtalein.

- Thuốc thử Nessler (dung dịch kiềm của muối Kaliiodomercurat – $K_2[HgI_4]$ phản ứng với NH_3 cho tủa màu đỏ (lượng nhỏ cho dung dịch màu vàng):

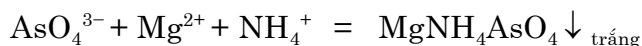


2.1.3. Arseniat

- Phản ứng với acid hypophosphorơ hoặc dung dịch hypophosphit (thuốc thử Bugo hay Tile): tạo ra kết tủa As nguyên tố có màu nâu:

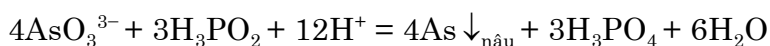


- Phản ứng với $AgNO_3$: tạo kết tủa nâu đỏ Ag_3AsO_4 , tủa này không tan trong CH_3COOH , tan trong HNO_3 , dung dịch amoniac.
- Phản ứng với hỗn hợp magnessi ($MgCl_2 + NH_4OH + NH_4Cl$): Cho kết tủa tinh thể trắng magnessi amonarseniat:



2.1.4. Arsenit

- *Phản ứng Tile:*

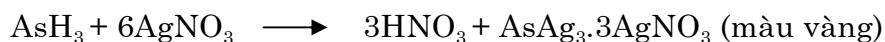


- *Phản ứng với $AgNO_3$:* tạo ra kết tủa trắng hơi vàng Ag_3AsO_3 , tủa này tan trong HNO_3 , trong dung dịch amoniac.
- *Phản ứng khử bằng hydro mới sinh* (do Zn trong môi trường acid tạo ra): các hợp chất của Arsen (cả AsO_3^{3-} và AsO_4^{3-} ...) đều thành AsH_3 dạng khí:

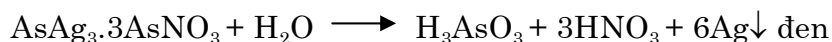


Có thể nhận ra AsH_3 bằng:

– Cho tác dụng với $AgNO_3$:



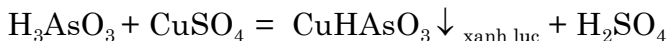
Sản phẩm màu vàng này dễ bị thủy phân tạo ra Ag đen:



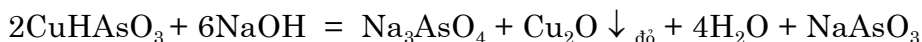
– Cho tác dụng với HgCl_2 : tạo thành hợp chất có màu từ vàng sang đỏ nâu:



- *Phản ứng với CuSO_4* : cho tủa đồng hydroarsenit màu xanh lục:



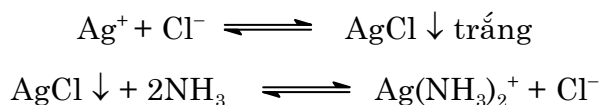
Nếu thêm NaOH và đun nóng sẽ có kết tủa màu đỏ của Cu_2O :



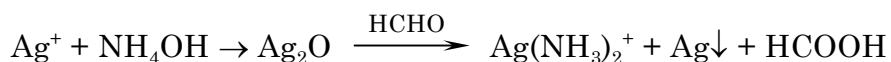
(Phản ứng này dùng để phân biệt giữa AsO_4^{3-} và AsO_3^{3-}).

2.1.5. Bạc (muối)

- Phản ứng với HCl cho tủa trắng AgCl, tủa không tan trong HNO_3 nhưng tan trong dung dịch amoniac:

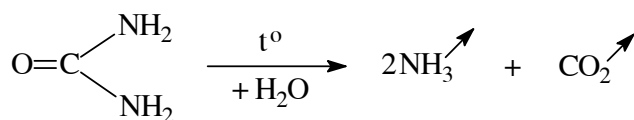
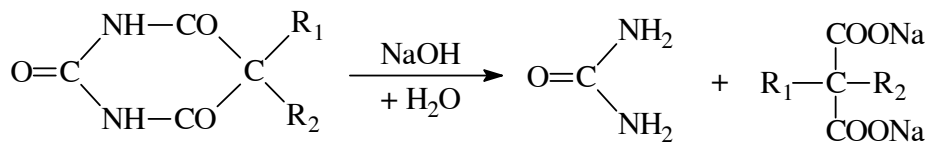


- Phản ứng với formol trong môi trường kiềm bị khử thành Ag có màu đen (phản ứng tráng gương):



2.1.6. Barbiturat

- Khi đun nóng với kiềm đặc, vòng ureid bị mở giải phóng ra các sản phẩm khác nhau:



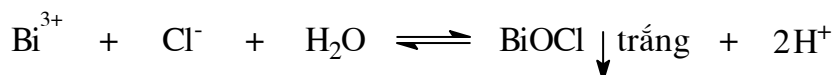
- Tạo phản ứng phức có màu với các ion kim loại như Cu^{2+} , Co^{2+} ...

2.1.7. Bari (muối)

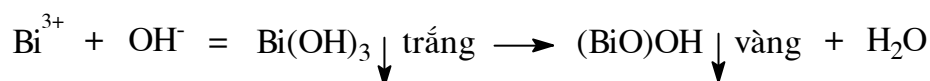
- Phản ứng đốt cho màu ngọn lửa xanh lục hơi vàng.
- Phản ứng với H_2SO_4 cho kết tủa BaSO_4 màu trắng, không tan trong các acid vô cơ.

2.1.8. Bismuth (muối)

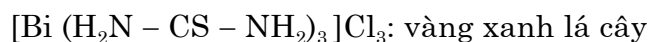
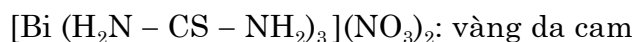
- Phản ứng thủy phân:



- Tác dụng với dung dịch kiềm: cho tủa $\text{Bi}(\text{OH})_3$ màu trắng, khi đun nóng với nước ngả màu vàng:

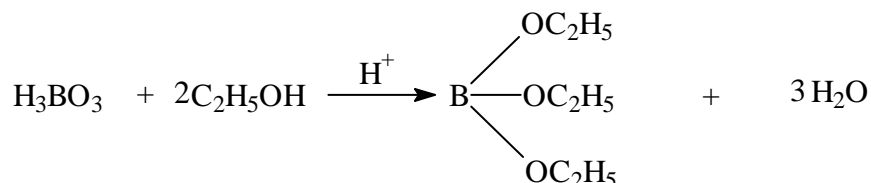
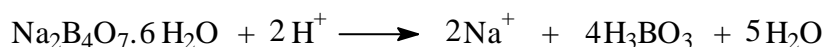


- Phản ứng với S^{2-} : cho tủa nâu đen Bi_2S_3
- Phản ứng với thioure: trong môi trường acid cho màu vàng da cam hay vàng xanh lá cây (nhiều cho kết tủa):



2.1.9. Borat

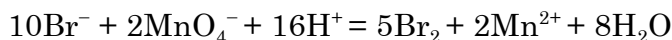
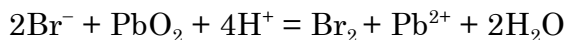
- Hỗn hợp muối borat với ethanol (hoặc methanol) và H_2SO_4 đặc sẽ tạo ra ester trietyl borat, đem đốt cháy cho ngọn lửa màu lục:



- Trong môi trường acid, borat chuyển thành acid boric, acid boric phản ứng với giấy nghệ (hoặc côn nghệ) cho màu nâu đỏ, sau đó tẩm ướt bằng dung dịch kiềm loãng (amoniac hoặc natrihydroxyd) màu nâu chuyển thành màu lam hay lục (do sự tạo phức của cucumin trong nghệ với acid boric).

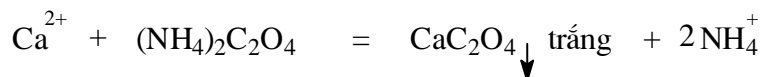
2.1.10. Bromid

- Phản ứng với AgNO_3 : cho tủa vàng nhạt AgBr , tủa này khó tan trong dung dịch amoniac 10M.
- Phản ứng oxy hoá Br^- thành Br_2 bằng: $\text{PbO}_2 + \text{CH}_3\text{COOH}$ hoặc $\text{KMnO}_4 + \text{H}_2\text{SO}_4$. Nhận biết Br_2 bằng cách chiết vào cloroform có màu vàng hoặc đỏ nâu:

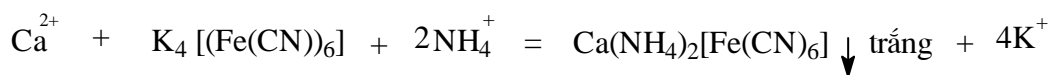


2.1.11. Calci (muối)

- Phản ứng với amoni oxalat: trong môi trường trung tính hoặc CH_3COOH loãng cho kết tủa màu trắng, kết tủa này dễ tan trong các acid vô cơ :

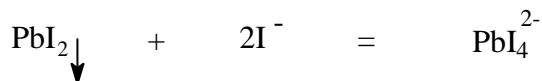
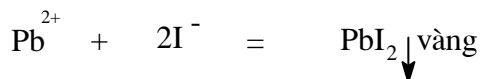


- Phản ứng với Kali ferocyanid: trong môi trường NH_4Cl cho tủa màu trắng:



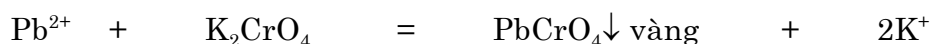
2.1.12. Chì (muối)

- Phản ứng với dung dịch KI: cho kết tủa màu vàng, tan trong KI thừa:



Tủa PbI_2 tan trong nước nóng, khi để nguội kết tủa trở lại.

- Phản ứng với dung dịch K_2CrO_4 cho tủa màu vàng, tủa dễ tan trong HCl và NaOH:



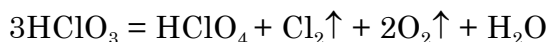
2.1.13 Citrat ($\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7^{3-}$)

- Cho tủa với Ca^{++} khi đun nóng. Tủa này dễ tan trong dung dịch $\text{CH}_3\text{COOH} 6\text{M}$.

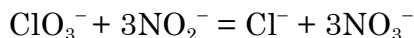
- Phản ứng tạo thành acid acetondicarboxylic: khi đun nóng với H_2SO_4 đặc (hay dung dịch KMnO_4), acid citric sẽ bị oxi hoá thành acid acetondicarbonic $\text{CO}(\text{CH}_2\text{COOH})_2$. Acid này tạo tủa với muối Hg^{2+} .

2.1.14. Clorat

- Không kết tủa với dung dịch AgNO_3 .
- Đun nóng với dung dịch HCl , H_2SO_4 loãng sẽ bị phân huỷ thành Cl_2 bay ra:

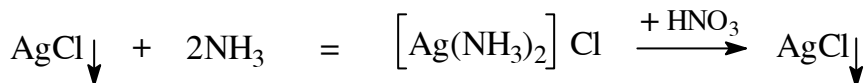


Tác dụng với NaNO_2 : khử thành Cl^- :

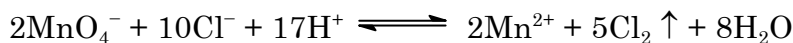


2.1.15. Clorid

- Phản ứng với AgNO_3 : cho kết tủa AgCl màu trắng, tủa này tan trong dung dịch amoniac và kết tủa trở lại trong HNO_3



- Phản ứng với KMnO_4 trong môi trường acid: mất màu KMnO_4 :



Nhận biết Cl_2 do có mùi đặc biệt hoặc làm xanh giấy tẩm hồ tinh bột có KI :



2.1.16. Đồng (muối)

- Phản ứng với $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ Cho tủa màu đỏ nâu không tan trong acid acetic:

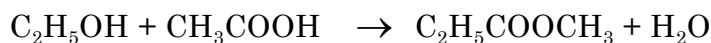


- Phản ứng với dung dịch amoniac: cho tủa muối base màu xanh $\text{Cu}_2(\text{OH})_2^{2+}$, muối này tan trong amoniac dư thành phức màu xanh $\text{Cu}(\text{NH}_3)_4^{2+}$



2.1.17. Ethanol

- Tác dụng với acid acetic (môi trường H_2SO_4) tạo ra ethyl acetat có mùi thơm:

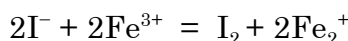


- Tác dụng với dung dịch I_2 trong môi trường kiềm tạo tủa màu vàng iodoform (CHI_3) có mùi đặc biệt:



2.1.18. Iodid

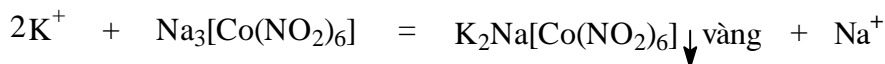
- Phản ứng với AgNO_3 cho tủa màu vàng AgI , tủa này không tan trong amoniac.
- Phản ứng với Fe^{3+} :



I_2 giải phóng ra có thể chiết vào lớp cloroform có màu tím đỏ.

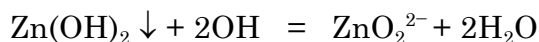
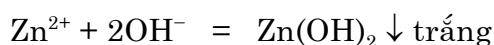
2.1.19. Kali (muối)

- Phản ứng màu ngọn lửa: muối Kali đốt cho ngọn lửa màu tím (vạch quang phổ có $\lambda = 768 \text{ nm}$ và 404 nm).
- Phản ứng với natri hexanitrocobantat : Cho kết tủa màu vàng (trong môi trường CH_3COOH loãng):



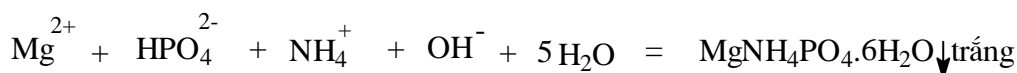
2.1.20. Kẽm (muối)

Tác dụng với dung dịch NaOH cho tủa trắng $\text{Zn}(\text{OH})_2$, tủa này tan trong kiềm dư thành muối Zincat, khi thêm Na_2S sẽ cho kết tủa trắng ZnS :



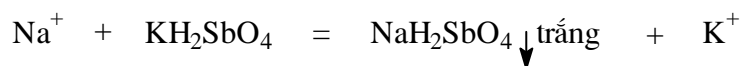
2.1.21. Magnesi (muối)

Phản ứng với dinatrihydrophosphat trong môi trường ($\text{NH}_4\text{Cl} + \text{NH}_4\text{OH}$) cho kết tủa màu trắng Magnesi amoniphosphat, soi trên kính hiển vi có hình lá dương xỉ:

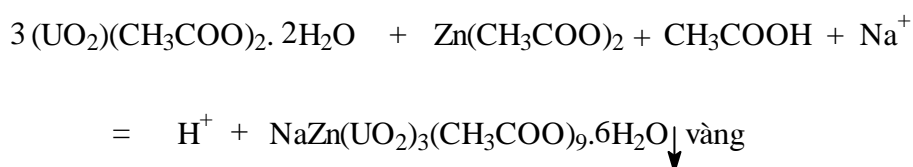


2.1.22. Natri (muối)

- Phản ứng màu ngọn lửa: Muối Natri đốt cho ngọn lửa màu vàng (vạch quang phổ có $\lambda = 589 \text{ nm}$).
- Phản ứng với Kalidihydro antimonat: cho kết tủa màu trắng (trong môi trường trung tính hoặc acid nhẹ).



- Phản ứng với kẽm uranyl acetat : cho kết tủa màu vàng natri kẽm uranyl acetat (trong môi trường CH_3COOH loãng) :



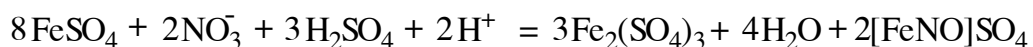
(Có thể dùng muối maginesi cũng được).

2.1.23. Nhôm (muối)

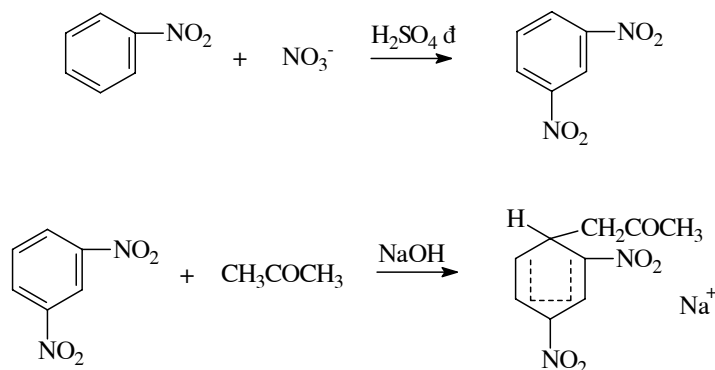
Với thuốc thử đỏ alizarin S tạo hợp chất nội phức có màu đỏ.

2.1.24. Nitrat

- Phản ứng với $\text{FeSO}_4 + \text{H}_2\text{SO}_4$ đặc: tạo ra NO , Fe^{2+} dư sẽ kết hợp với NO tạo thành sắt (II) nitrososulfat có màu nâu:

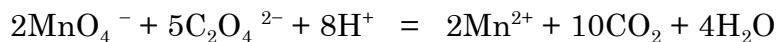


- Phản ứng với nitrobenzen: trong môi trường H_2SO_4 đặc tạo ra m-dinitrobenzen, hợp chất này phản ứng với aceton trong môi trường kiềm tạo thành phức có màu tím (Phản ứng Janovsky):



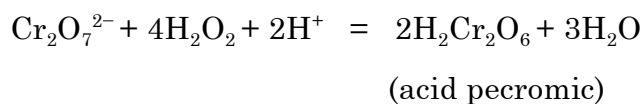
2.1.25. Oxalat

- Phản ứng với CaCl_2 cho kết tủa trắng CaC_2O_4 , tủa này không tan trong các acid vô cơ, không tan trong acid acetic loãng.
- Làm mất màu dung dịch KMnO_4 trong môi trường acid :



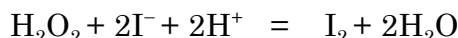
2.1.26. Peroxyd

- Phản ứng với $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ trong môi trường acid:



Acid pecromic có màu xanh được chiết bằng ether (acid này dễ bị phân huỷ trong môi trường nước).

- Phản ứng với KI giải phóng I_2 có màu đỏ:

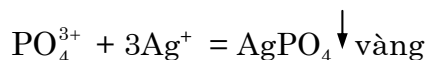


2.1.27. Phosphat

- Phản ứng với $(\text{NH}_4)_2\text{MoO}_4$ trong môi trường HNO_3 : cho tủa màu vàng (lượng ít cho dung dịch màu vàng) amoniphosphomolipdat $(\text{NH}_4)_3[\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}]$:



- Phản ứng với AgNO_3 : cho kết tủa bạc phosphat màu vàng, tủa này dễ tan trong acid vô cơ và dung dịch amoniac:



2.1.28. Salicylat ($\text{C}_6\text{H}_4\text{OHCOO}^-$)

- Phản ứng với dung dịch FeCl_3 loãng cho phức màu đỏ tím $\text{Fe}(\text{OH})_2\text{C}_7\text{H}_5\text{O}_3$
- Phản ứng với HCl loãng cho tủa acid salicylic $\text{C}_6\text{H}_4\text{OHCOOH}$ (có độ nung chảy $156^\circ\text{C} - 161^\circ\text{C}$).

2.1.29. Sắt (II)

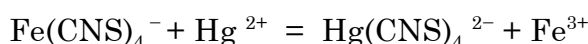
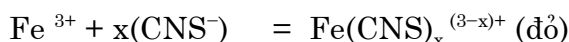
Phản ứng với dung dịch kalifericyanid tạo thành tủa có màu xanh lam (nồng độ nhỏ cho dung dịch keo màu xanh lơ).

Không tan trong dung dịch HCl 2M:



2.1.30. Sắt (III)

- Phản ứng với KCNS tạo phức màu đỏ $\text{Fe}(\text{CNS})_x^{(3-x)+}$; (x từ 1-6). Phức này chiết được trong ether, alcol (hoặc mất màu khi thêm Hg^{2+})

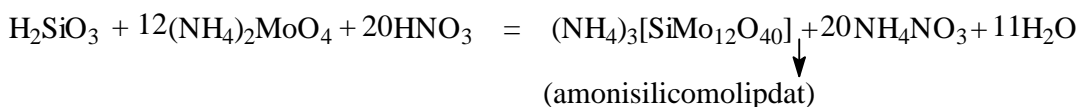


- Phản ứng với kaliferocyanid tạo thành tủa xanh lam không tan trong dung dịch HCl 2M :



2.1.31. Silicat

- Hợp chất của Silic khi đun với H_2SO_4 đặc và NaF (hay CaF_2) trong chén bạch kim hay chì sẽ tạo ra tetraflorid silic SiF_4 ở dạng hơi (hoặc hexaflorosilicat SiF_6), dễ bị thủy phân tạo ra tủa là acid metasilic H_2SiO_3 (hoặc acid octosilic H_4SiO_4).
- Phản ứng với amonimolipdat trong môi trường HNO_3 cho tủa màu vàng :



2.1.32. Stibi (muối)

Cho phản ứng với natrisulfid (Na_2S) tạo thành tủa Sb_2S_3 hoặc Sb_2S_5 có màu vàng cam. Các tủa này tan trong dung dịch sulfid dư hoặc polysulfid kiềm hay amoni cho các muối SbS_5^- hoặc SbS_4^- .

Ghi chú:

Thường hoà tan các dạng của muối Stibi bằng dung dịch natrikalitartrat, khi đó Stibi ở dưới dạng muối nội phức tartrat kép K và Sb dễ tan: $\text{KOOCCOH} - \text{CHOH} - \text{COOSbO}$. Sau đó cho phản ứng tạo Sb_2S_3 hoặc Sb_2S_5 .

2.1.33. Sulfat

Cho phản ứng kết tủa với dung dịch BaCl_2 (tạo tủa BaSO_4) màu trắng, tủa này không phản ứng với I_2 , SnCl_2 ...).

2.1.34. Sulfid (S²⁻)

- Tác dụng với HCl loãng giải phóng khí H₂S có mùi thối
- Phản ứng với Pb²⁺ tạo kết tủa màu đen PbS.

2.1.35. Bisulfit và sulfit (HSO₃⁻ và SO₃²⁻)

- Tác dụng với dung dịch HCl giải phóng khí SO₂ có mùi đặc biệt.
- Làm mất màu I₂ :

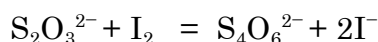


2.1.36. Tartrat (C₄H₄O₆²⁻ và HC₄H₄O₆⁻)

Khi phản ứng với H₂SO₄ đặc + resorcin: acid tartric giải phóng ra và phân huỷ thành aldehyd glycolic OHH₂C-CHO, chất này sẽ tạo màu tím đậm với resorcin.

2.1.37. Thiosulfat

- Phản ứng làm mất màu dung dịch I₂;



- Tác dụng với HCl cho kết tủa S và giải phóng khí SO₂:

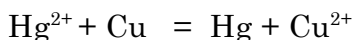


- Tác dụng với AgNO₃ cho kết tủa vàng chuyển dần sang đen:



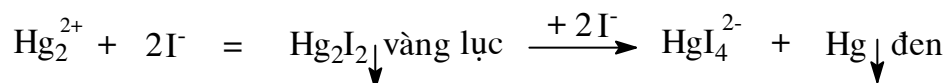
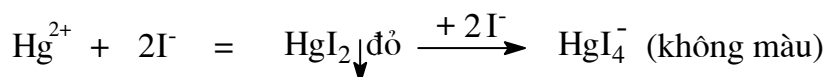
2.1.38. Thủy ngân (I và II)

- Phản ứng hỗn hống với đồng:



Khi làm, trên miếng đồng sẽ thấy vết hỗn hống sáng bóng, đốt nóng vết bóng sẽ mất (vì Hg bay đi).

- Với KI:



2.2. THỬ GIỚI HẠN CÁC TẠP CHẤT TRONG THUỐC

2.2.1. Mục đích

Xác định giới hạn tạp chất trong thuốc thực chất là thử độ tinh khiết của thuốc nhằm xác định phẩm chất của thuốc. Nếu thuốc càng tinh khiết thì hiệu quả tác dụng càng cao.

Các tạp chất trong thuốc mặc dù rất nhỏ nhưng nó có thể:

- Gây tác hại cho sức khoẻ (thí dụ tạp chất bari tan, arsen, chì ...).
- Gây hiện tượng tương kị hoá học, ảnh hưởng đến phẩm chất hay độ bền vững của thuốc.
- Một số tạp chất có thể không có tác dụng có hại nhưng lại là những chất xúc tác đẩy nhanh quá trình phân huỷ thuốc (thí dụ: các vết kim loại, độ ẩm ...).
- Một số tạp chất không gây hại, không gây tương kị hoá học, không làm phân huỷ thuốc, không gây phản ứng hoá học ... nhưng nó biểu thị cho mức độ sạch (hay mức độ tinh chế chưa đủ) của thuốc.
- Khi biết mức độ tinh khiết của thuốc (đặc biệt trong trường hợp không đạt yêu cầu) cho phép xem xét các nguồn gốc gây ra các tạp chất này và tìm biện pháp khắc phục. Các nguyên nhân có thể là:
 - + Nguyên liệu, phụ liệu hoặc bán thành phẩm dùng để sản xuất thuốc chưa đủ độ tinh khiết.
 - + Quy trình sản xuất đã qui định không được thực hiện nghiêm chỉnh.
 - + Ảnh hưởng của các dụng cụ sử dụng.
 - + Phương pháp sản xuất chưa tốt.
 - + Trong quá trình bảo quản, các phản ứng phụ do nhiều yếu tố như: môi trường, vấn đề vệ sinh, chất bảo quản ... làm phát sinh các tạp chất.
 - + Do dụng ý gian lận của người sản xuất...

Bởi vậy, TCVN (Dược điển) và TC thường qui định cho phép mỗi thuốc chỉ được có những lượng rất nhỏ các tạp chất nhất định để bảo đảm cho thuốc đó có độ sạch nhất định tức là thuốc có chất lượng, đạt hiệu quả tác dụng cao nhất.

2.2.2. Phương pháp xác định giới hạn tạp chất trong thuốc

2.2.2.1. Phương pháp xác định

Xác định giới hạn tạp chất trong thuốc tức là xác định xem các tạp chất có vượt quá giới hạn cho phép hay không, các phản ứng thử tạp chất có tính chất bán định lượng và được thực hiện bằng phương pháp so sánh:

Lấy hai bình (thường là 2 ống nghiệm) để thực hiện phản ứng.

Bình 1: Lấy một thể tích dung dịch thuốc đem thử.

Bình 2: Lấy một thể tích dung dịch mẫu. (Dung dịch mẫu là dung dịch có chứa tạp chất cần thử với số lượng cho phép).

Sau đó tiến hành song song phản ứng thử tạp chất với cùng một thuốc thử. So sánh kết quả phản ứng ở hai bình (thường là so màu hoặc so độ đục) từ đó xác định được giới hạn tạp chất cần thử có trong mẫu thuốc đem thử.

Trong quá trình thực hành cần phải theo các qui định sau:

- Nước và những hoá chất, thuốc thử sử dụng không được có tạp chất đang cần thử.
- Khi pha dung dịch mẫu phải sử dụng cân phân tích và dụng cụ thể tích chính xác.
- Hai bình phản ứng để so sánh phải giống nhau: bằng thuỷ tinh không màu, có đường kính bằng nhau, độ dày như nhau...
- Khi so sánh, quan sát độ đục thì nhìn từ trên xuống, quan sát màu thì nhìn ngang trên nền trắng.
- Phải cho các thuốc thử vào hai bình phản ứng giống nhau về: thời gian, số lượng và thể tích cuối.
- Khi phân tích, nếu phát hiện được một tạp chất lạ thì phải ghi lại và báo cáo.

2.2.2.2. Pha các dung dịch mẫu

Để pha dung dịch mẫu của một tạp nào đó, chỉ cần cân lượng chính xác chất tinh khiết của tạp đó (chất gốc) pha vào một thể tích xác định theo tính toán ta sẽ được mẫu tạp chuẩn có nồng độ xác định (thường biểu thị theo mg/ml; % hoặc phần triệu).

• **Thí dụ:** Pha dung dịch mẫu Cl^- như sau :

- Dung dịch A: Cân chính xác 0,8238g NaCl tinh khiết hoà tan trong nước và thêm nước cho đủ 1 lít (dùng bình định mức). Được dung dịch có chứa:

$$\frac{35,5 \times 0,8238}{58,5 \times 1000} = 0,0005 \text{ g Cl}^- / 1\text{ml}$$

- Dung dịch B (dung dịch mẫu chuẩn đem thử): Lấy chính xác 1^{ml} 00 dung dịch A pha loãng bằng nước cho đủ 100,0 ml. Dung dịch này có chứa $\frac{0,0005}{100} = 0,000005 \text{ g Cl}^- / \text{ml}$ (tương đương 0,005 mg Cl^- / ml hay dung dịch 0,0005% hoặc 5 phần triệu).

2.2.2.3. Pha dung dịch để thử

Để pha, giả thiết mẫu đem kiểm tra có chứa một lượng tạp chất cho phép tối đa, từ đó tính hệ số pha loãng thích hợp, sau đó tiến hành pha theo tính toán này.

- **Thí dụ:** Pha dung dịch để thử tạp Cl^- trong paracetamol (theo tiêu chuẩn Cl^- không được quá 0,01%):

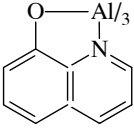
Vì dung dịch mẫu Cl^- khi đem thử là dung dịch có chứa 0,0005% (hay 5 phần triệu). Do đó hệ số pha loãng dung dịch thử sẽ là $\frac{0,01}{0,0005} = 20 \Rightarrow$ Ta có

cách pha như sau: Cân 1,000 g paracetamol hoà tan trong nước cho đủ 20,00 ml, lọc. Lấy 10,00 ml dịch lọc đem thử và so sánh với 10,00 ml dung dịch mẫu chuẩn Cl^- 0,0005%.

(Thường trong Dược điển hoặc TC có ghi rõ cách pha dung dịch để thử là dựa trên cơ sở tính này).

2.2.3. Một số thuốc thử trong các phản ứng hoá học để xác định giới hạn tạp chất

Ion cần thử (tạp chất)	Thuốc thử	Sản phẩm	Hiện tượng quan sát
Cl^-	AgNO_3	$\text{AgCl} \downarrow$	Tủa trắng
SO_4^{2-}	BaCl_2	$\text{BaSO}_4 \downarrow$	Tủa trắng
NH_4^+	Nessler	$\left[\begin{array}{c} \text{O} \quad \text{Hg} \quad \text{NH}_2 \\ \diagdown \quad \diagup \\ \text{Hg} \end{array} \right] \text{I}$	Màu vàng (nếu nhiều có nâu đỏ)
Ca^{2+}	$(\text{NH}_4)_2\text{C}_2\text{O}_4$	$\text{CaC}_2\text{O}_4 \downarrow$	Tủa trắng
Arsen	$\text{Zn} + \text{HCl}$	$\text{AsH}_3 \uparrow$	Giấy tẩm HgCl_2 chuyển từ vàng sang nâu
Kim loại nặng	- Na_2S (H_2S) - thioacetamid	$\text{PbS} \downarrow$	Đen hoặc nâu
Sắt	- acid mercapto-acetic - acid sunfosaliciclic	- Feri mercaptoacetat - Ferisulfisalicilat	Màu hồng Đỏ nâu hay vàng

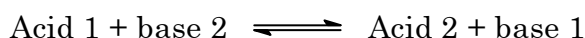
Nhôm	8-hydroxyquinolin (ở pH ~6)	 (oxyquinolat nhôm)	Màu vàng rơm (tan trong CHCl ₃)
Magnesi	8-hydroxyquinolin (ở pH ~10)	Oxyquinolat Mg	Màu vàng (tan trong CHCl ₃)
Phosphat	Sulphomolybdic	(NH ₄) ₃ H ₄ [P(Mo ₂ O ₇) ₆]	Màu vàng
Kẽm	K ₄ [Fe(CN) ₆]	K ₂ Zn ₃ [Fe(CN) ₆] ₂	Tủa trắng

2.3. CHUẨN ĐỘ ACID - BASE TRONG MÔI TRƯỜNG KHAN

Chuẩn độ trong môi trường khan dựa trên phản ứng trung hoà giữa acid và base. Cho đến nay có thể thống kê 4 thuyết chính phát triển khái niệm acid - base:

- *Thuyết điện ly acid - base trong môi trường nước của Arrhenius - Ostwald*
- *Thuyết proton của Bronsted-Lowry,*
- *Thuyết điện tử của Lewis,*
- *Thuyết acid - base tổng quát của Usanovich.*

Với mục đích giải thích ứng dụng các phản ứng acid - base trong kiểm nghiệm thuốc, chúng ta sử dụng thuyết proton của Bronsted - Lowry. Theo thuyết này, acid và base tạo ra những cặp acid - base liên hợp, chúng khác nhau một proton. Phản ứng acid - base là phản ứng giữa 1 acid và 1 base thuộc hai cặp acid - base liên hợp: acid 1/ base1 và acid 2/ base 2.



Cặp thứ hai có thể là phân tử chất tan hoặc phân tử dung môi. Phản ứng acid - base là phản ứng *cho nhận proton*.

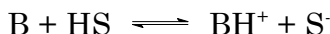
2.3.1. Vai trò của dung môi

Trong phản ứng acid - base, dung môi có thể tác động theo 2 hướng.

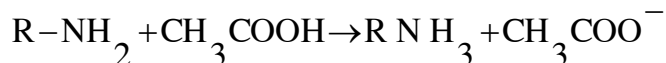
- *Solvat hóa chất tan:*

Nếu dung môi có tính acid, nó làm tăng tính base của chất tan B

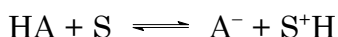
Ví dụ:



+



Ngược lại nếu dung môi có tính base, nó sẽ tăng tính acid của chất tan HA



Trong các dung môi trơ (dung môi không cho hoặc không nhận proton), quá trình solvat hóa được thực hiện do cơ chế khác (liên kết hydro, phức π , lực Van der Waals).

• *Tác động lên quá trình điện ly của cặp ion:*

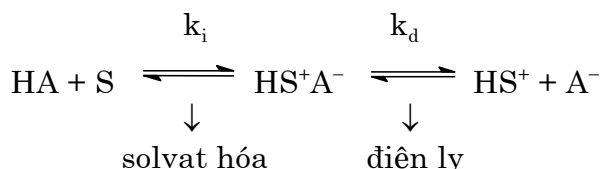
Trong dung môi có hằng số điện môi lớn (nước, formamid) hầu hết cặp ion tạo ra do quá trình solvat hóa chất tan đều phân ly thành các ion tự do. Ngược lại, trong dung môi có hằng số điện môi ϵ bé, các ion chủ yếu tồn tại dưới dạng cặp ion.

Quá trình điện ly của cặp ion do hằng số ϵ quyết định. Có thể phân chia sơ bộ như sau:

- $\epsilon > 50$ như nước, formamid, dimetylsulfoxid: acid và base tồn tại chủ yếu dưới dạng ion tự do.
- $\epsilon < 30$ như ethanol, aceton: tồn tại nhiều cặp ion
- $\epsilon < 10$ như benzen, cloroform, acid acetic: tồn tại cặp ion là chủ yếu.

Cần lưu ý là hằng số ϵ chỉ tác động lên quá trình điện ly của cặp ion. Nếu trong phản ứng acid - base không tạo ra các ion có điện tích ngược dấu, do đó không tạo cặp ion thì hằng số ϵ ít tác động lên quá trình điện ly.

Phương trình tổng quát mô tả quá trình ion hóa (thể hiện ở hằng số K_i) và quá trình điện ly (thể hiện ở hằng số K_d) của chất tan HA trong dung môi S được thể hiện như sau:

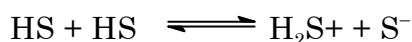


2.3.2. Khái niệm pH

Trong dung dịch nước, người ta định nghĩa $pH = -\lg a_{H^+}$

Trong dung môi khan, người ta xác định pH biểu kiến.

Thang này liên quan đến hằng số tự điện ly K_S của dung môi.



H_2S^+ là ion lionium, S^- là anionlyat, pH biểu kiến là $pH = -\lg a_{H_2S^+}$ ở đây

$$a_{H_2S^+} \cdot a_{S^-} = K_S$$

Ví dụ:



$$K_S = [CH_3COOH_2^+] [CH_3COO^-]$$



$$K_S = [C_2H_5OH_2^+] [C_2H_5O^-]$$

Độ dài của thang pH biểu kiến tùy thuộc vào hằng số tự điện ly của dung môi. Ví dụ:

- Methanol: $pK_S = 17$
- Ethanol: $pK_S = 20$
- Acid acetic: $pK_S = 6,35$

2.3.3. Xác định điểm tương đương

Định lượng trong môi trường khan thường được thực hiện bằng cách chuẩn độ. Để phát hiện điểm tương đương thường dùng 2 phương pháp:

- *Chỉ thị màu pH:*

Theo dõi sự đổi màu của chỉ thị. Thường dùng tím tinh thể, tím metyl. Ngoài ra còn dùng các loại chỉ thị màu hỗn hợp.

- *Chỉ thị đo thế:*

Ở đây điện cực so sánh có thể là điện cực calomel hoặc bạc clorid, điện cực chỉ thị thường là điện cực thủy tinh (nếu có thể, dùng dung dịch trong bầu thủy tinh có cùng dung môi với môi trường chuẩn độ).

Để có kết quả tin cậy khi chuẩn độ trong môi trường khan cần lưu ý:

- Khi xác định điểm tương đương theo dõi sự thay đổi của điện thế, không phải của pH,
- Cần trung hoà dung môi trước khi chuẩn độ,
- Cần xử lý điện cực chỉ thị phù hợp.

2.3.4. Ứng dụng kiểm nghiệm thuốc

Chuẩn độ trong môi trường khan được áp dụng khi:

- Chất phân tích không hoà tan trong nước. Trong kiểm nghiệm thuốc, thường gặp các acid và base có khối lượng phân tử lớn ít tan trong nước.
- Sức acid, base quá yếu trong nước nên khó phát hiện điểm tương đương.
- Các acid, base đa chức có các hằng số điện ly trong nước ít khác biệt nhau.

Sau đây sẽ giới thiệu các loại dung môi, dung dịch chuẩn trong định lượng các acid và base.

2.3.4.1. Định lượng acid

Các chất hữu cơ có tính acid yếu thường được chuẩn độ bằng base trong môi trường khan như:

- Các acid carboxylic,
- Dẫn xuất enol, imid, sulfonamid,
- Dẫn xuất thể phenol như polyclorophenol, polynitrophenol.
- Hỗn hợp các chất có tính acid hoặc acid đa chức .

• Dung môi

Thường chọn dung môi có tính base để tăng tính acid của chất phân tích như: pyridin, dimetylformamid (DMFA). Ngoài ra tert - butanol thường được dùng làm dung môi cho chuẩn độ acid carboxylic, dẫn xuất của phenol.

• Dung dịch chuẩn

Thường dùng các dung dịch chuẩn base như:

- KOH trong alcol (thường dùng trong methanol),
- Metylát kim loại kiềm như natri, kali,
- Tetraalkyl amonium hydroxyd: thường dùng tert - Bu₄NOH trong hỗn hợp dung môi benzen - methanol (95:5).

Khi dùng các dung dịch chuẩn này cần lưu ý:

- Dung dịch chuẩn kim loại kiềm gây sai số base cho điện cực thuỷ tinh khi chuẩn độ đo thế.
- Dung dịch chuẩn R₄NOH là base mạnh, mạnh hơn dung dịch hydroxyd kiềm như KOH, cho nên có thể chuẩn độ các acid rất yếu. Tuy nhiên các dung dịch này có 2 nhược điểm:
 - + Độc do có benzen
 - + Pha chế mất nhiều thời gian, khó bảo quản (dễ phản ứng với CO₂ của không khí).

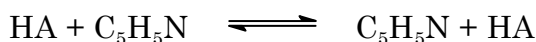
- **Chất chuẩn**

Các chất chuẩn acid thường dùng là:

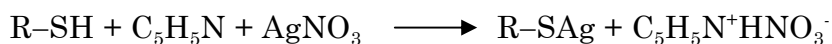
- Acid benzoic: C_6H_5COOH , $E = M = 122,12$
- Acid succinic $(CH_2COOH)_2$, $E = M/2 = 59,05$
- Acid sulfamic NH_2SO_3H , $E = M = 97,09$
- Kalihydrophthalat, $E = M = 204,22$.

- **Phản ứng chuẩn độ**

Lấy dung môi điển hình là pyridin



Để chuẩn độ các enol, thiol, người ta thường thêm $AgNO_3$ vào môi trường



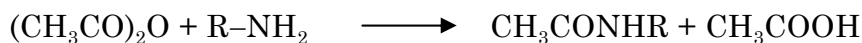
2.3.4.2. Định lượng các base hữu cơ

Các alcaloid và base nitơ tổng hợp thường được chuẩn độ bằng các acid chuẩn trong dung môi acid.

- **Dung môi**

Để tăng tính base của chất phân tích người ta dùng các dung môi acid như acid acetic khan.

Acid acetic khan thường được sử dụng phổ biến nhất vì ít độc, rẻ tiền. Dạng anhydrid acetic cũng hay dùng vì có thể định lượng các base rất yếu. Hơn nữa bước nhảy thế ở điểm tương đương trong anhydrid acetic thường lớn hơn trong acid acetic. Tuy nhiên anhydrid acetic có nhược điểm là dễ acetyl hóa các amin bậc nhất và bậc hai nhất là khi đun nóng.



Trong trường hợp định lượng amin không dùng dung môi này. Ngoài acid acetic, acetonitril được dùng để định lượng các base với dung dịch chuẩn acid perchloric trong 1,4 dioxan.

- **Dung dịch chuẩn**

Dung dịch acid perchloric trong acid acetic khan thường được dùng nhiều nhất. Dung dịch này pha chế từ acid perchloric thương mại 72% (kl/kl). Vì vậy khi pha chế phải thêm anhydrid acetic để loại nước và để 48 giờ trước khi dùng.

Ngoài acid acetic khan, còn dùng 1,4 dioxan để pha dung dịch chuẩn acid perchloric. Dung dịch này kém ổn định, dễ chuyển thành màu nâu trong quá trình bảo quản. Vì vậy chỉ pha và sử dụng khi cần thiết.

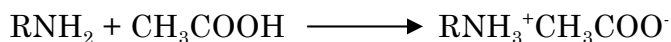
- *Chất chuẩn*

Thường dùng kali hydrophthalat.

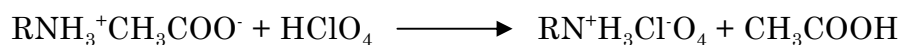
- *Phản ứng chuẩn độ*

Thường được viết thành 2 giai đoạn

- Solvat hóa



- Trung hoà



Nếu chất cần định lượng ít tan, phải đun nóng. Nhưng cần thận trọng vì có thể acetyl hóa chức amin I hoặc amin II. Đôi khi người ta thêm acid formic vào dung môi acid acetic khan thay cho đun nóng để làm tăng độ tan (do hằng số ϵ của dung môi tăng lên).

2.3.4.3. Định lượng các muối

Nhiều dược chất là muối của các base hữu cơ. Chọn phương pháp định lượng chúng trong acid acetic tùy thuộc vào anion tạo muối với base.

- *Muối của các acid yếu hơn acid acetic BH^+Y^-*

Y^- là anion propionat, maleat, benzoat, salicylat,... Trong trường hợp này muối BH^+Y^- được chuẩn độ trực tiếp như một base bằng HClO_4 :

Anion Y^- được trung hoà bằng HClO_4 . Vì vậy phản ứng không đặc hiệu.

- *Muối của acid mạnh hơn acid acetic BH^+X^-*

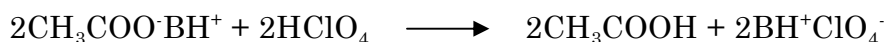
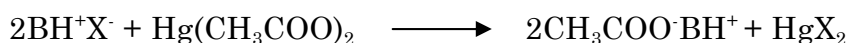
X^- là các halogenid, anion sulfat. Người ta phân ra hai trường hợp:

- Muối halogenid (thường hydroclorid, hydrobromid)

Cách đơn giản nhất là định lượng X^- như Y^- trong trường hợp trên. Nhưng nếu X^- là base rất yếu sẽ không phản ứng toàn lượng với HClO_4 . Để giải quyết khó khăn này, người ta dùng 2 phương pháp:

+ Phương pháp Pifer - Wollish

Thêm vào môi trường một lượng dư Hg(II) acetat để giải phóng ion acetat. Trong môi trường acid acetic, nó là base mạnh được chuẩn bằng HClO_4

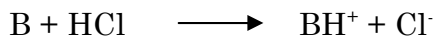


Ở đây định lượng muối BH^+X^- thông qua anion CH_3COO^- (thay cho anion X^-) tương tự Y^- trong trường hợp trên.

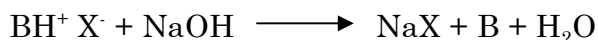
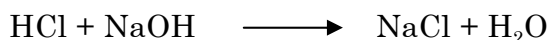
+ Phương pháp Billon

Hoà tan muối trong ethanol, BH^+ trong dung môi này là acid tương đối mạnh, có thể được trung hoà bằng NaOH 0,1N. Phản ứng định lượng trải qua 2 giai đoạn

Đầu tiên thêm một lượng dư HCl để chuyển hết base B (nếu có trong BH^+X^-) sang dạng muối



Hỗn hợp BH^+X^- và HCl dư được trung hoà bằng NaOH



Phát hiện điểm tương đương bằng chuẩn độ đo thế: có 2 bước nhảy thế ứng với trung hoà HCl dư và BH^+X^- trong mẫu phân tích.

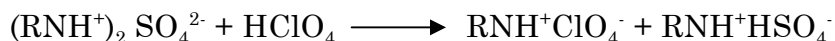
Nhược điểm chính của phương pháp này là sự chênh lệch sức acid của HCl và BH^+X^- phải đủ lớn để có 2 bước nhảy. Mặt khác B là base không quá yếu trong ethanol.

– Muối sulfat

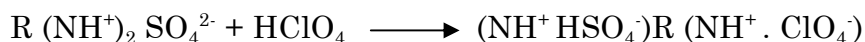
H_2SO_4 có thể tạo nhiều dạng muối với base hữu cơ đơn chức (stricnin, atropin) hoặc đa chức (quinin).

+ Muối dạng $BH^+HSO_4^-$ ở đây anion HSO_4^- là base khá mạnh có thể định lượng bằng $HClO_4$ trong acid acetic.

+ Nếu base hữu cơ tạo muối trung tính: dạng $(RN)_2H_2SO_4$ hoặc $(RNH^+)_2SO_4^{2-}$ như strychnin sulfat, atropin sulfat



Với quinin bisulfat cũng xảy ra tương tự



1 mol $HClO_4$ ứng với 1 mol muối sulfat

+ Muối không trung tính như quinin sulfat basic



1 mol muối cần 3 mol $HClO_4$ để trung hoà.

– Muối tetraalkyl amonium bậc bốn

Cation R_4N^+ có thể liên kết với hydroxyd, halogenid (X^-), phosphat. Các anion tham gia vào phản ứng trung hoà như một base.

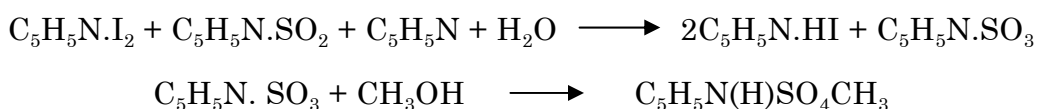
- + Với hydroxyd: trung hoà trực tiếp bằng HClO_4
- + Với halogenid: thêm Hg (II) acetat như trong phương pháp Pifer - Wollish.

2.4. XÁC ĐỊNH HÀM LƯỢNG NƯỚC BẰNG THUỐC THỬ KARL FISCHER

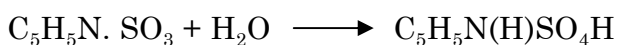
Có nhiều kỹ thuật xác định hàm lượng nước trong chất rắn, trong dung môi hữu cơ. Ở đây giới thiệu phương pháp dùng thuốc thử Karl Fischer dựa vào tính chất oxy hóa của iod.

2.4.1. Nguyên tắc

Thuốc thử này gồm có iod, SO_2 , methanol và pyridin. Hỗn hợp phản ứng với nước theo hai phương trình sau:



Hỗn hợp có lượng lớn pyridin nên các chất tham gia phản ứng và sản phẩm đều tồn tại dưới dạng phức. Phản ứng đầu tiêu thụ 1 phân tử nước. Phản ứng thứ 2 xảy ra khi có dư CH_3OH là cần thiết, quyết định sự thành công của chuẩn độ vì phức SO_3 cũng phản ứng với nước



Đây là phản ứng phụ. Để loại bỏ phản ứng này, người ta dùng methanol dư trong hỗn hợp.

2.4.2. Pha chế và xác định độ chuẩn

- *Pha chế:*

Cơ chế phản ứng chỉ rõ một phân tử iod oxy hoá một phân tử SO_2 tiêu thụ một phân tử nước trong môi trường có dư pyridin và methanol. Khi pha thuốc thử người ta dùng một lượng dư SO_2 và pyridin. Vì vậy phản ứng của thuốc thử với nước do lượng I_2 quyết định. Độ chuẩn của thuốc thử thường 2 đến 5 mg $\text{H}_2\text{O}/\text{ml}$. Lượng SO_2 dư gấp 2 lần, pyridin gấp 3 - 4 lần.

Độ chuẩn của thuốc thử giảm dần trong quá trình bảo quản. Vì vậy thường chỉ pha chế trước 1 - 2 ngày. Có trường hợp pha thành hai dung dịch:

Dung dịch A: SO_2 và pyridin trong methanol,

Dung dịch B: I_2 trong methanol khan.

Khi dùng trộn 1 thể tích A với 1 thể tích B.

- *Xác định độ chuẩn của thuốc thử: có 2 cách.*

1. Xác định hàm lượng nước dưới 1%, người ta chọn một hóa chất có hàm lượng nước kết tinh xác định, sấy khô để loại độ ẩm. Cho thuốc thử tác dụng với hóa chất rồi tính ra đương lượng. Muối natri tartrat dihydrat ($C_4H_4Na_2 \cdot 2H_2O$) hay được lựa chọn.

2. Xác định hàm lượng nước trên 1%, xác định hàm lượng nước theo dung dịch chuẩn nước/ methanol.

2.4.3. Xác định điểm tương đương

Hai cách phổ biến xác định điểm tương đương của phản ứng định lượng:

1. Theo lượng thừa của iod khi nước đã phản ứng hết. Sự đổi màu do thừa thuốc thử.

2. Chuẩn độ amper với 2 điện cực platin (chuẩn độ đến điểm dừng). Một số nhà sản xuất cho ra đời các dụng cụ chuẩn độ tự động dùng thuốc thử Karl Fischer.

2.4.4. Ứng dụng

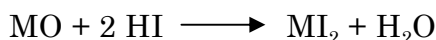
Thuốc thử Karl Fischer được dùng để xác định hàm lượng nước trong nhiều dạng mẫu khác nhau. Dựa vào đặc điểm của mẫu người ta xây dựng qui trình phân tích cho phù hợp.

- Nếu mẫu dễ tan trong methanol, người ta dùng chuẩn độ trực tiếp nước trong các chất hữu cơ như acid, alcol, ester, anhydrid, kể cả các muối ngậm nước.
- Nếu mẫu ít tan trong thuốc thử, người ta dùng chuẩn độ thừa trừ: cho một lượng thừa thuốc thử. Sau thời gian phản ứng thích hợp, xác định lượng dư bằng dung dịch chuẩn nước trong methanol.
- Một cải tiến khác là chiết hồi lưu nước trong mẫu bằng methanol khan. Xác định lượng nước chiết xuất được bằng chuẩn độ trực tiếp. Kỹ thuật này rất thích hợp cho định lượng nước hấp thụ, nước kết tinh.
- Cần lưu ý là một số phản ứng hóa học cản trở phương pháp Karl Fischer do tạo thành nước sau phản ứng:

- Các hợp chất carbonyl tác dụng với methanol:



- Oxyd kim loại phản ứng với HI

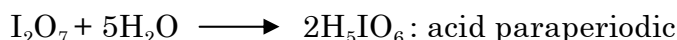


Ngoài ra các chất oxy hóa khử cũng thường cản trở phương pháp Karl Fischer vì chất oxy hóa sẽ phản ứng với iodid là sản phẩm của thuốc thử, còn chất khử phản ứng với iod của thuốc thử.

2.5. ĐỊNH LƯỢNG MỘT SỐ CHẤT HỮU CƠ ĐA CHỨC BẰNG THUỐC THỬ PERIODAT

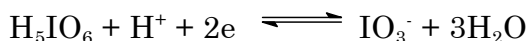
2.5.1. Nguyên tắc

- Đây là phương pháp định lượng dựa vào tính chất oxy hóa của cặp I^{7+}/I^{5+} . Tùy theo mức độ hydrat hóa của I_2O_7 ta có 2 dạng acid:



Trong dung dịch nước các acid và ion periodic nằm ở trạng thái cân bằng, $H_4IO_6^-$, IO_4^- , $H_3IO_6^{2-}$.

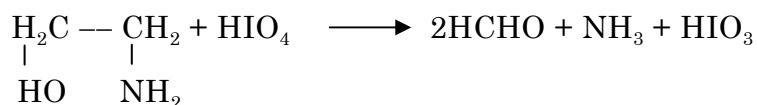
Cặp oxy hóa khử periodic



Thế chuẩn khoảng 1,6 V. Periodat là chất oxy hóa mạnh

- Phản ứng oxy hóa của periodat với các chất hữu cơ được dự báo theo 4 nguyên tắc sau:
 - Bẻ gãy liên kết C – C có mang 2 nhóm chức ở cạnh nhau như: chức C = O, - NH₂, - OH.
 - Nguyên tử C có nhóm chức – OH bị oxy hóa thành aldehyd hoặc ceton .
 - Nguyên tử C có nhóm chức ceton được chuyển thành acid – COOH.
 - Nguyên tử C có nhóm - NH₂ sẽ chuyển thành aldehyd đồng thời tạo ra NH₃.

Ba phản ứng sau minh họa 4 nguyên tắc trên



- Trong các phản ứng trên, người ta thường định lượng bằng cách cho thừa thuốc thử HIO_4 vào mẫu phân tích. Sau khi phản ứng kết thúc cho lượng dư As_2O_3 và dung dịch KI. Iod giải phóng được chuẩn bằng dung dịch $Na_2S_2O_3$. Song song làm một mẫu trắng. Đó là nguyên tắc của phương pháp Fleury. Có trường hợp người ta dùng phương pháp iod để xác định nồng độ periodat chỉ với lượng dư KI, không cần dùng As_2O_3 .

- *Dung dịch chuẩn*

Nếu phản ứng oxy hóa thực hiện trong môi trường acid nhẹ dùng dung dịch H_5IO_6 . Nếu trong môi trường acid mạnh dùng dung dịch NaIO_4 hoặc $\text{Na}_3\text{H}_2\text{IO}_6$ (thường pha trong dung dịch H_2SO_4).

Định lượng thường tiến hành theo cách gián tiếp, có hiệu chỉnh với mẫu trắng.

2.5.2. Ứng dụng

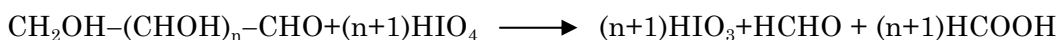
- Người ta ít quan tâm đến ứng dụng của chuẩn độ periodat cho định lượng các chất khử vô cơ bởi có nhiều thuốc thử oxy hóa dễ thực hiện, không đắt tiền như $\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$, MnO_4^- , I_2 . Ngược lại người ta chú ý đến phản ứng của periodat với các chất hữu cơ đa chức do tính chất oxy hóa chọn lọc của nó. Trước đây các phản ứng này được dùng trong phân tích cấu trúc. Hiện nay, tính oxy hóa của periodat được sử dụng trong phân tích định lượng.
- Có thể dùng thuốc thử periodat để định lượng nhiều chất hữu cơ như:
 - Các α .diol: etylenglycol, propadiol 1,2
 - Polyol : phản ứng tổng quát



Cần lưu ý là :

- + Số phân tử formadehyd tạo thành bằng số chức alcol bậc nhất.
- + Số phân tử acid formic tạo thành bằng số chức alcol bậc 2.

Với các aldose ta có thể viết:



- Các α diamin như etylen diamin, α amino - alcol như ephedrin.
- Có thể minh họa ứng dụng của phương pháp periodat thông qua định lượng glycerin của Dược điển Pháp X
 - + Dùng HIO_4 có dư để oxy hóa hết glycerin
 - + Thêm propylenglycol để loại hết HIO_4 dư
 - + Dùng dung dịch chuẩn NaOH trung hòa hết acid tạo thành sau phản ứng (HIO_3 và HCOOH)
 - + Song song làm một mẫu trắng. Tính kết quả dựa vào lượng NaOH đã dùng cho mẫu phân tích và mẫu thử.

2.6. ỨNG DỤNG CẶP ION TRONG KIỂM NGHIỆM THUỐC

Kỹ thuật tạo cặp ion được triển khai đầu tiên trong phương pháp chiết lỏng - lỏng với mục tiêu tăng hiệu suất chiết từ dung dịch nước của một số ion.

Sau đó, kỹ thuật này được ứng dụng nhanh chóng để định lượng nhiều dược chất mang tính acid hoặc base dưới dạng phân tích thể tích hoặc đo quang. Hiện nay, kỹ thuật tạo cặp ion đã xâm nhập vào lĩnh vực sắc ký không chỉ để đánh giá chất lượng thuốc mà cả trong nghiên cứu dược động học và phân tích hóa sinh. Trong phạm vi giáo trình kiểm nghiệm thuốc, chúng tôi chỉ trình bày sơ lược khái niệm về cặp ion và nguyên tắc ứng dụng của nó.

2.6.1. Định nghĩa cặp ion

Cặp ion được hình thành do tương tác tĩnh điện giữa 2 ion có điện tích trái dấu: 1 ion dương và 1 ion âm. Theo thuyết liên hợp Bjerrum (năm 1926) thì hai ion solvat hóa có điện tích trái dấu khi chuyển động nhiệt trong dung dịch sẽ tiến lại gần nhau do lực hút Coulombs. Đến một khoảng cách nào đó giữa 2 ion được gọi là *khoảng cách đặc trưng q*, chúng tạo thành một tiểu phân động học chuyển động tự do như các ion. Tiểu phân động học đó là cặp ion (ion pairs). Với các chất điện ly đối xứng (1 - 1, 2 - 2, ...) cặp ion tạo thành không mang điện tích. Với các chất điện ly không đối xứng (1 - 2, 1 - 3, 2 - 3, ...) cặp ion có điện tích nhỏ hơn điện tích của các ion ban đầu. Trong cả hai trường hợp độ dẫn điện của dung dịch sẽ giảm xuống.

Khoảng cách đặc trưng q nói trên được xác định bởi *tỷ lệ giữa năng lượng tạo cặp ion và năng lượng chuyển động nhiệt trung bình tách riêng các ion*. Giá trị q được tính theo phương trình sau:

$$q = \frac{|z_a z_k|}{2 \epsilon k T} e^2$$

Trong đó:

z_a và z_k là điện tích của anion và cation,

e là điện tích của điện tử

k là hằng số Boltzmann

ϵ là hằng số điện môi của dung dịch,

T là nhiệt độ tuyệt đối ($^{\circ}\text{K}$)

Khoảng cách q phụ thuộc vào điện tích z của ion và hằng số ϵ : nếu điện tích càng lớn và ϵ càng nhỏ thì q càng tăng, cặp ion tạo ra càng nhiều.

Với chất điện ly 1 - 1 trong dung dịch nước ở 25°C thì $q = 3,6 \text{ \AA}$ ($1 \text{ \AA} = 10^{-8} \text{ cm}$). Điều đó có ý nghĩa là trong dung dịch nước, chất điện ly 1-1 hoà tan, ví dụ muối KCl, khi 2 ion K^+ và Cl^- ở khoảng cách $q < 3,6 \text{ \AA}$ sẽ tạo thành cặp ion. Chúng chuyển động tự do trong dung dịch như các ion K^+ , Cl^- và phân tử không điện ly. Cặp ion trung hoà điện tích lại do va chạm làm giảm bớt lớp vỏ hydrat hóa trong dung dịch nước nên dễ chuyển sang hoà tan trong dung môi hữu cơ.

2.6.2. Các yếu tố ảnh hưởng đến sự tạo thành cặp ion

Ngoài yếu tố điện tích z và hằng số ϵ , sự tạo thành cặp ion còn chịu ảnh hưởng của 2 yếu tố sau:

- *Đặc điểm của ion*

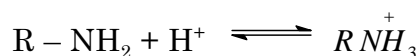
Nếu ion càng lớn và càng sơ nước, càng ít bị hydrat hóa trong dung dịch nước thì càng dễ bị solvat hóa bởi các phân tử dung môi hữu cơ.

- *pH của dung dịch nước*

Để có thể tạo cặp ion từ các chất mang tính acid, base thì pH dung dịch phải bảo đảm tồn tại cả cation (từ base) và anion (từ acid).

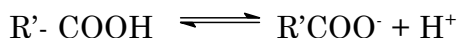
Ví dụ:

- Các alcaloid và base nitơ tổng hợp có thể mang điện tích dương khi cộng proton:



Chúng có thể tạo cặp ion ở pH acid.

- Với các chất có tính acid, chúng tạo ra anion cũng tùy theo pH:



Để tạo ra cặp ion $R NH_3^+ OOCR'$ cần có pH thích hợp.

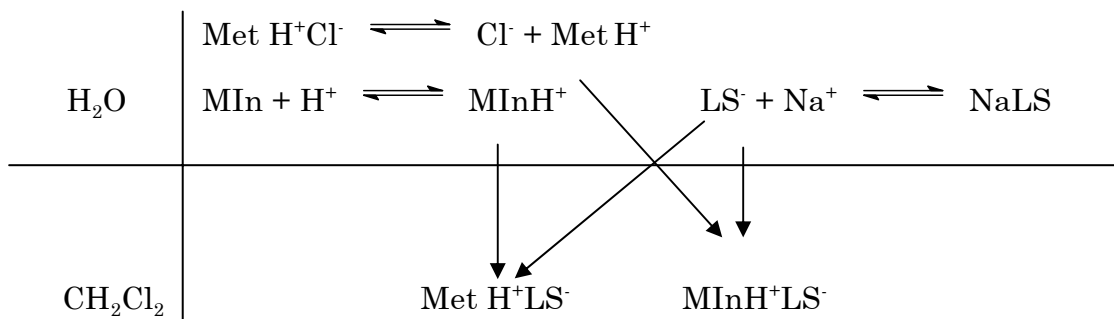
2.6.3. Ứng dụng

Kỹ thuật tạo cặp ion được ứng dụng nhiều trong phân tích thể tích, đo quang và sắc ký.

2.6.3.1. Phân tích thể tích

Thường dùng cách chuẩn độ hai pha. Ví dụ: chuẩn độ metoclopramid hydroclorid ($MetH^+Cl^-$) bằng dung dịch chuẩn natri laurylsulfat (Na^+LS^-) trong hệ dung môi nước – metylen clorid (CH_2Cl_2) với chỉ thị metyl đỏ (MIn).

Khi anion LS^- phản ứng với cation $MetH^+$ (tạo cặp ion $MetH^+ LS^-$), anion này sẽ kết hợp với chỉ thị tạo cặp ion $MInH^+ LS^-$ tan trong dung môi CH_2Cl_2 . Pha này chuyển từ màu vàng (do có phân tử chỉ thị MIn hòa tan) sang màu đỏ (màu của cặp ion $MInH^+ LS^-$).



Nhiều alkaloid và base tổng hợp được chuẩn độ theo nguyên tắc này.

2.6.3.2. Chiết đo quang

Đây là phương pháp thường được dùng để định lượng bằng đo độ hấp thụ của các chất có tính acid hoặc base.

- *Chiết các base dùng chỉ thị màu acid:*

Các chỉ thị này là đối ion tạo cặp với base mang điện tích dương (khi cộng hợp proton) ở pH thích hợp. Các chỉ thị thường dùng thuộc nhóm azoic (metyl da cam, tropeolin 00, ...), bromophenol, bromothymol, ...

Chiết cặp ion bằng cloroform và đo quang. Các alkaloid và base tổng hợp được định lượng theo nguyên tắc này.

Ví dụ:

- Alkaloid: morphin, codein, cocain, atropin, quinin, ...
- Base tổng hợp: novocain, quinolon, ...
- Muối amonium bậc bốn: tetraetyl amonium clorid (Et₄NCl), tetrabutyl amonium iodid (Bu₄NI), ...

- *Chiết các acid hữu cơ*

Các acid này khi phân ly thành anion sẽ tạo cặp ion với các cation là các chỉ thị màu base (lục malachit, tím tinh thể, rodamin và dẫn xuất ...).

Các dẫn xuất phenol và acid hữu cơ được chiết dưới dạng cặp ion và đo quang như:

- Dẫn xuất phenol: 2,4 dinitrophenol, acid picric.
- Dẫn xuất của acid benzoic như: acid 3,5 dinitrobenzoic, acid 2 nitrobenzoic.
- Dẫn xuất của acid salicylic như: acid 4 - nitro salicylic, acid 3,5 dinitrosalicylic.
- Muối alkyl sulfat: lauryl sulfat, dodecyl sulfat.
- Muối acid hữu cơ mạch thẳng như: oleat, stearat.

2.6.3.3. Sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC)

Khi xây dựng chương trình HPLC phân tích các dược chất, thông thường người ta sử dụng kỹ thuật tạo cặp ion. Ví dụ, để định lượng các chất hữu cơ mang điện tích dương, người ta thường thêm vào pha động các chất có thể tạo ra anion để tạo cặp như natri lauryl sulfat, natri heptansulfonat, natri octansulfonat. Vấn đề này sẽ được đề cập cụ thể hơn ở môn học các phương pháp sắc ký trong chương trình cao học.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Bộ Y tế (2002). Dược điển Việt Nam III. NXB Y học, Hà Nội.
2. Hà Như Phú (1971). Kiểm nghiệm thuốc. NXB Y học, Hà Nội.
3. Phạm Hải Tùng, Phạm Gia Huệ (1987). Hoá học phân tích. NXB Y học, Hà Nội.
4. Nguyễn Bá Hiệp (1988). Kiểm nghiệm Dược Phẩm. NXB KHKT, Hà Nội.
5. Block (1959). Phân tích định tính (phần II phản ứng cation) Bản dịch tiếng Việt. NXB Giáo dục, Hà Nội.
6. British pharmacopeia BP 2001
The United States of Pharmacopeia USP XXIV (2000).
7. Conors K. A (1982). A Textbook of Pharmaceutical Analysis, third edition, John Wiley & Sons, Inc, pp 3 - 92.
8. Delvordre - Steinmetz A. C., Prognon P. (1992). Protométrie en milieu aqueux et non aqueux dans "Analyse pratique du médicament". Coordonateur D. Pradeau, Editions Médicales internationales, Paris, pp 288 - 344.
9. Le Hoang M. D, Prognon (1992). Oxydo - reductimétrie, dans "Analyse pratique du médicament". Coordonateur D. Pradeau, Edition Mediales internationales, Paris, pp. 352 - 385.
10. Skoog D. A, West D. M, Holler F. J (1988). Fundamentals of Analytical chemistry. Sounders College Publishing, pp 233 - 344.
11. The Merck Index (1996). 12th edition.
12. The United States of Pharmacopeia USP XXIV (2000).

CÂU HỎI TỰ LƯỢNG GIÁ

2.1. Giải thích phản ứng thử định tính của:

- Các ion: Amoni; Nitrat; Phosphat; Arseniat và arsenit; Thủy ngân; Sắt (II và III)
- Phân tử: Ethanol

2.2. Giải thích mục đích của việc thử giới hạn tạp chất trong thuốc.

2.3. Trình bày phương pháp xác định giới hạn tạp chất trong thuốc

2.4. Các cách pha dung dịch mẫu và dung dịch thử để xác định giới hạn tạp chất trong thuốc.

2.5. Trong dung dịch nước, amin là một base yếu, nhưng trong dung môi acid acetic, nó là một base mạnh. Tại sao ?

2.6. Pha dung dịch chuẩn acid perchloric bằng cách lấy 17,0 ml acid perchloric đặc 72% (kl/kl) pha vừa đủ thành 1000 ml dung dịch acid acetic khan. Tính số ml anhydrid acetic cần thiết để phản ứng hết với lượng nước đã có trong 17 ml acid perchloric đặc đã dùng. Biết khối lượng riêng của acid perchloric là 1,60 g/ ml và của anhydrid acetic là 1,02 g/ ml. (42,3 ml)

2.7. Viết phương trình phản ứng giải thích quá trình định lượng acid barbituric trong pyridin với sự có mặt của AgNO_3 . Dung dịch chuẩn là KOH/ methanol.

Nếu chất cần định lượng là muối Na barbiturat, quá trình phản ứng có gì khác không ?

2.8. Lấy 20 viên phenobarbital có khối lượng 6,025g, nghiền mịn, cân 2,000 g hoà tan trong DMFA, chuẩn độ bằng dung dịch Lithi metylat 0,1000N hết 8,50ml. Tính khối lượng trung bình của phenobarbital trong viên, biết $M = 232,2$ (29,8 mg/ viên).

2.9. Cân 0,6120 g diphenhydramin hydroclorid ($M = 291,8$) hoà tan trong acid acetic băng. Thêm 15 ml thủy ngân acetat 3,2% và chuẩn độ bằng dung dịch chuẩn HClO_4 0,1145N hết 17,12 ml. Tính tỷ lệ % của dược chất trong mẫu (93,45%).

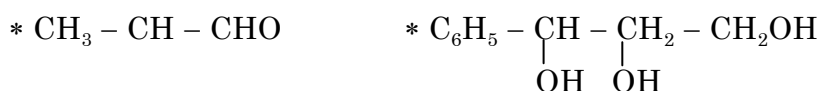
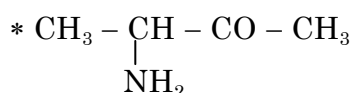
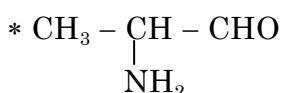
2.10. So sánh đánh giá 2 phương pháp Pifer - Wollish và Billon trong định lượng muối halogenid.

2.11. Hòa tan 0,5404g muối vào methanol và định mức thành 50,00ml (dung dịch A). Lấy 5,00ml dung dịch A thêm 20,0ml methanol và chuẩn độ với thuốc thử Karl Fischer hết 9,00ml. Khi xác định nước trong methanol ở trên đã dùng hết 0,80ml thuốc thử Karl Fischer cho 25,0ml. Tính độ chuẩn của thuốc thử Karl Fischer (6,21 mg $\text{H}_2\text{O}/\text{ml}$).

2.12. Cân 0,2310 g mẫu phân tích hòa tan vào 10,00 ml methanol (ở bài tập 2.11) và chuẩn độ bằng thuốc thử Karl Fischer hết 2,40 ml. Tính tỷ lệ % nước trong mẫu phân tích trên (5,59%).

2.13. Viết phản ứng xác định nồng độ dung dịch chuẩn H_5IO_6 theo phương pháp iod.

2.14. Chỉ rõ số mol của mỗi sản phẩm tạo thành khi 1 mol các chất sau phản ứng với HIO_4 . Viết phản ứng



2.15. Vẽ sơ đồ giải thích định lượng HIO_4 dư theo phương pháp Fleury.

2.16. Có gì khác nhau giữa phân tử trung hòa điện và cặp ion (xét về cấu tạo và tính chất).

2.17. Tại sao nhiều cặp ion có thể chiết được (từ dung dịch nước) bằng dung môi hữu cơ ít phân cực?

2.18. Giải thích tại sao pH dung dịch là yếu tố quan trọng nhất đến sự hình thành cặp ion?

2.19. Cetyl pyridin clorid là một base nitơ bậc bốn có thể tạo cặp ion với chỉ thị vàng metyl. Cặp ion này dễ tan trong cloroform. Anh (chị) đề xuất nguyên tắc chiết đo quang để định lượng base này.

2.20. Một phương pháp được diễn đã định lượng cetyl pyridin clorid dưới dạng chuẩn độ hai pha bằng dung dịch chuẩn natri lauryl sulfat 0,004M với chỉ thị vàng metyl (bài 2.19). Hãy vẽ sơ đồ giải thích chuẩn độ này.

Chương 3

CÁC PHƯƠNG PHÁP HOÁ LÝ TRONG KIỂM NGHIỆM THUỐC

MỤC TIÊU HỌC TẬP

- Giải thích được cách hiệu chuẩn máy quang phổ tử ngoại - khả kiến.
- Trình bày được các phương pháp định lượng bằng quang phổ tử ngoại khả kiến.
- Giải thích và vận dụng được kỹ thuật sắc ký pha đảo và pha đảo cặp ion trong công tác kiểm nghiệm thuốc.
- Trình bày được các phương pháp định lượng bằng sắc ký lỏng hiệu năng cao: phương pháp chuẩn ngoại, chuẩn nội.

3.1. PHƯƠNG PHÁP QUANG PHỔ PHÂN TỬ

Phương pháp quang phổ phân tử: Phổ UV-VIS, phổ hồng ngoại, phổ huỳnh quang đóng vai trò quan trọng trong kiểm nghiệm thuốc. Hầu hết các dược điển đã áp dụng phương pháp này trong định tính, định lượng và thử tinh khiết các thuốc và chế phẩm.

3.1.1. Quang phổ hấp thụ UV.VIS

3.1.1.1. Độ hấp thụ

- Khi cho bức xạ đơn sắc đi qua một môi trường có chứa chất hấp thụ thì độ hấp thụ của bức xạ tỷ lệ với nồng độ của chất hấp thụ và chiều dày của môi trường hấp thụ (dung dịch chất hấp thụ). Mối quan hệ này tuân theo định luật Lambert – Beer và được biểu diễn bằng phương trình sau:

$$A = \lg \frac{I_0}{I} = \lg \frac{I_0}{I} = K.C.L \quad (3.1)$$

Trong đó :

T: độ truyền qua

I_0 : cường độ ánh sáng đơn sắc tới

I: cường độ ánh sáng đơn sắc sau khi đã truyền qua dung dịch.

K: là hệ số hấp thụ phụ thuộc λ , thay đổi theo cách biểu thị nồng độ

L: là chiều dày của lớp dung dịch

C: nồng độ chất tan trong dung dịch

- Trường hợp C tính bằng mol/l, L tính bằng cm

$$A = \varepsilon \cdot L \cdot C \quad (3.2)$$

Khi C = 1 mol/l và L = 1 cm thì A = ε (hệ số hấp thụ phân tử)

ε đặc trưng cho bản chất của chất tan trong dung dịch, nó chỉ phụ thuộc vào bước sóng. Định luật Lambert-Beer chỉ đúng khi dùng bức xạ đơn sắc.

$$A = E_{1\%}^{1\text{cm}} \cdot L \cdot C \rightarrow E_{1\%}^{1\text{cm}} = \frac{A}{L \cdot C} \quad 3.3$$

- Trường hợp nồng độ C tính theo %(Kl/TT) và bằng 1%, L = 1cm thì: E (1%, 1cm) là hệ số hấp thụ riêng, nó đặc trưng cho mỗi chất. Trong phân tích kiểm nghiệm hay dùng E (1%, 1cm).

3.1.1.2. Điều kiện áp dụng định luật Lambert-Beer

- Ánh sáng phải đơn sắc,
- Khoảng nồng độ phải thích hợp: định luật Lambert-Beer chỉ đúng trong một giới hạn nhất định của nồng độ.
- Dung dịch phải trong suốt.
- Chất thử phải bên trong dung dịch và bên dưới tác dụng của ánh sáng UV-VIS.

3.1.1.3. Máy quang phổ

Máy quang phổ thích hợp cho việc đo phổ ở vùng tử ngoại và khả kiến bao gồm một hệ quang học có khả năng tạo ánh sáng đơn sắc trong vùng từ 200 đến 800nm và một thiết bị thích hợp để đo độ hấp thụ.

Nguồn sáng cho vùng tử ngoại: đèn deuteri hoặc hydro,

Nguồn sáng cho vùng khả kiến: đèn tungsten.

Hai cốc đo (cuvet) dùng chứa dung dịch thử và dung dịch so sánh phải có đặc tính quang học như nhau.

Ở máy loại 2 chùm tia, cuvet dung môi được đặt ở bên có chùm tia so sánh (reference beam) đi qua.

Cuvet thạch anh (quartz): dùng đo ở vùng tử ngoại và khả kiến.

Cuvet thủy tinh: chỉ đo ở vùng khả kiến.

3.1.1.4. Hiệu chuẩn máy quang phổ (Calibration)

Trong định tính và định lượng các chất bằng phương pháp quang phổ UV-VIS, việc chuẩn hoá máy đóng vai trò quan trọng, đặc biệt là trong kỹ thuật định lượng bằng đo phổ trực tiếp.

Hầu hết được điển các nước (Việt Nam, Anh, Ấn Độ, Nhật Bản, Châu Âu,...) đều yêu cầu kiểm tra 6 chỉ tiêu kỹ thuật của máy quang phổ tử ngoại khả kiến như sau:

- **Kiểm tra thang độ dài sóng:** Bằng cách sử dụng cực đại hấp thụ của dung dịch holmium perchlorate.

Vạch phổ của đèn nguồn hydro, đèn deuteri hoặc các vạch phổ của đèn hơi thủy ngân được chỉ ra dưới đây với dung sai cho phép ở vùng tử ngoại là $\pm 1\text{nm}$, ở vùng khả kiến là $\pm 3\text{nm}$:

241,15 nm	(H ₀)	404,66 nm	(Hg)
253,70 nm	(Hg)	435,83 nm	(Hg)
287,15 nm	(H ₀)	486,00 nm	(D β)
302,25 nm	(Hg)	486,10 nm	(H β)
313,16 nm	(Hg)	536,30 nm	(H ₀)
334,15	(Hg)	546,07 nm	(Hg)
361,50	(H ₀)	576,96 nm	(H ₀)
365,48	(Hg)	579,07 nm	(Hg)

- Đây là phương pháp kiểm tra của DĐVN, DĐ Anh, DĐ Ấn Độ 1996, DĐ Châu Âu 1998.
- DĐ Nhật XII sử dụng bức xạ của đèn Hg áp suất thấp ở bước sóng 253,65 nm, 365,02 nm, 435,84 nm và 546,07 nm hoặc bức xạ của đèn deuteri ở 486,00 và 656,1 nm.
- DĐ Trung Quốc 1997: sử dụng các vạch phổ sau đây của đèn thủy ngân:

237,83nm	;	253,65nm	;	275,28nm	;	296,73nm
313,16nm	;	334,15nm	;	365,02nm	;	404,66nm
435,83nm	;	546,97nm	;	576,96nm	;	

Các cực đại hấp thụ của dung dịch holmium perchlorat khi dùng đèn hydro: 379,79; 456,13 và 656,28 nm.

Đèn deuteri: 486,02 và 656,10nm.

Dùng kính holmium: có các cực đại hấp thụ ở: 279,4; 287,5; 333,7; 360,9; 460,0; 484,5; 536,2 và 637,5nm.

- **Kiểm tra độ hấp thụ**

Để kiểm tra độ hấp thụ, đa số các được điển dùng dung dịch kali dicromat trong acid sulfuric (VN, Anh, Châu Âu, Nhật, Trung quốc...). Mỹ hay dùng dung dịch kali cromat trong kali hydroxyd.

Dưới đây là một số phương pháp chuẩn hóa độ hấp thụ của một số dược điển:

Đo độ hấp thụ của dung dịch kali dicromat ở các độ dài sóng chỉ định ở bảng 3.1. Trong bảng ở mỗi độ dài sóng có một giá trị chính xác của độ hấp thụ riêng E(1%, 1cm) và các giới hạn cho phép.

Bảng 3.1. Độ hấp thụ riêng của dung dịch kali dicromat

Độ dài sóng nm	E(1%, 1cm)	Giới hạn cho phép
235	124,5	122,9 – 126,2
257	144,0	142,4 – 145,7
313	48,6	47,6 – 50,3
350	106,6	104,9 – 109,2

Pha chế dung dịch kali dicromat:

Dược điển VN, DĐ Anh, DĐ Châu Âu, Nhật XII, Trung Quốc qui định như sau: Hoà tan 57,0 đến 63,0 mg kali dicromat đã sấy khô đến khối lượng không đổi ở 130°C trong acid sulfuric 0,005 M/l với thể tích vừa đủ 1000ml.

Dược điển VN, Châu Âu còn cho thêm bảng độ hấp thụ của dung dịch kali dicromat chứa đúng 60,06mg K_2CrO_7 trong vừa đủ 1000ml acid sulfuric 0,005M/l, dùng cuvet dày 1cm (bảng 3.2.).

Bảng 3.2. Độ hấp thụ của dung dịch kali dicromat

Độ dài sóng (nm)	Độ hấp thụ
235	0,748
257	0,864
313	0,292
350	0,640

• **Giới hạn ánh sáng lạc (stray light)**

Ánh sáng lạc là ánh sáng không đi vào mẫu thử mà đi thẳng vào detector.

Ánh sáng lạc có thể được phát hiện ở độ dài sóng đã cho với kính lọc hoặc các dung dịch thích hợp.

DĐ VN, Anh, Châu Âu, Ấn Độ qui định : kiểm tra ánh sáng lạc như sau:

Đo độ hấp thụ của dung dịch kali clorid (TT) 1,2% trong cuvet 1cm ở $\lambda = 200\text{nm}$, so sánh với nước cất, phải lớn hơn 2,0.

DĐ Trung Quốc (1997): kiểm tra ánh sáng lạc với dung dịch natri iodid 1,00% và dung dịch natri nitrit 5,00% (KL/TT).

Độ truyền qua của các dung dịch này được đo so sánh với nước cất trong cuvet thạch anh 1cm phải nhỏ hơn 0,8% ở bước sóng 220nm và 380nm.

- **Độ phân giải** (cho phân tích định tính)

Khi chuyên luận yêu cầu, tiến hành đo độ phân giải của máy như sau: ghi phổ của dung dịch toluen (TT) 0,02% trong hexan (TT) (v/v).

Giá trị tối thiểu của tỷ số giữa cực đại hấp thụ ở 269 nm và cực tiểu hấp thụ ở 266 nm được qui định trong chuyên luận riêng.

- **Độ rộng giải phổ nguồn** (cho phân tích định lượng)

Để tránh sai số gây ra do độ rộng giải phổ nguồn, khi sử dụng máy có độ rộng giải phổ thay đổi ở độ dài sóng đã chọn thì độ rộng của giải phổ phải nhỏ so với nửa độ rộng của băng hấp thụ. Song độ rộng này phải đủ lớn để thu được giá trị cao của cường độ ánh sáng I_0 và việc thu hẹp độ rộng giải phổ phải không làm cho độ hấp thụ tăng lên.

- **Cuvet**

Dung sai của chiều dày lớp dung dịch của các cuvet là $\pm 0,005\text{cm}$. Khi được nạp đầy với cùng một dung môi, các cuvet có ý định để chứa dung dịch thử và dung dịch so sánh phải có độ truyền qua như nhau. Nếu điều này không được đáp ứng thì phải có sự hiệu chỉnh thích hợp.

Các cuvet phải được làm sạch và chăm sóc cẩn thận để tránh bị xước. Có thể bảo quản chúng trong cồn tuyệt đối để tránh mốc.

3.1.1.5. Ứng dụng phổ UV-VIS trong kiểm nghiệm thuốc

- **Định tính và thử tinh khiết**

Các cực đại hấp thụ là đặc trưng định tính của các chất.

Ví dụ:

– Dựa vào cực đại hấp thụ:

Trong dung dịch nước

+ Vitamin B₁₂ có 3 cực đại hấp thụ ở các bước sóng:

278 nm \pm 1 nm

361 nm \pm 1 nm

548 nm \pm 2 nm

+ Vitamin B₂ có 4 cực đại hấp thụ ở các bước sóng:

223nm 375 nm

267nm 444nm

+ Cloramphenicol có 1 cực đại hấp thụ ở bước sóng: 278 nm;

- + Phenoxymethyl penicillin có 2 cực đại hấp thụ ở 268 nm và 274nm.
- Tỷ số giữa các cực đại hấp thụ cũng là đại lượng đặc trưng cho định tính các chất.

Ví dụ:

- + Vitamin B₁₂ (USP XXII) : Có tỷ số

$$A_{361} / A_{278} = 1,79 - 1,90$$

- + Phenoxymethyl penicillin (BP.80):

$$A_{268} / A_{274} = 1,20 - 1,25$$

- Hệ số match: hệ số này đánh giá sự tương đồng giữa 2 phổ, một phổ chuẩn và một phổ thử. Hệ số match (Mat) được tính theo biểu thức sau:

$$Mat = \frac{10^3 \times [\sum x.y - (\sum x.\sum y)^2]}{\left[\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n} \right] \left[\sum y^2 - \frac{(\sum y)^2}{n} \right]} \quad (3.4)$$

Trong đó:

x và y là độ hấp thụ của phổ thứ nhất và phổ thứ hai ở cùng một bước sóng.

n là số điểm đã chọn ở 2 phổ.

Cách đánh giá Mat:

- + < 900: hai phổ khác nhau.
- + 900 - 990: hai phổ có những điểm tương đồng cần cân nhắc khi kết luận.
- + > 990: hai phổ tương tự nhau.
- + Xấp xỉ 1000: hai phổ giống nhau hoàn toàn.

• Định lượng

Chọn điều kiện xây dựng qui trình định lượng

Để xây dựng qui trình định lượng, chúng ta cần khảo sát để chọn các điều kiện thích hợp .

- Chọn bước sóng hoặc kính lọc :
 - + Chọn bước sóng ứng với các cực đại hấp thụ, khi đó đường chuẩn có độ dốc lớn nhất, tức là với cùng một sai số của mật độ quang thì sai số của nồng độ C và bước sóng λ là nhỏ nhất.
 - + Đối với máy dùng kính lọc (quang kế): Màu của kính lọc và màu dung dịch phải phụ nhau. Nhưng cũng có trường hợp có thể chọn kính lọc khác.

- Chọn khoảng nồng độ thích hợp :
Khoảng nồng độ có quan hệ tuyến tính với độ hấp thụ.
- Chọn các điều kiện khác :
 - + Loại trừ ảnh hưởng của chất lạ: chiết chất cần định lượng ra khỏi hỗn hợp phức tạp (các dạng bào chế). Dùng mẫu trắng có các thành phần như dung dịch thử nhưng không có chất cần định lượng.
 - + Chọn pH và dung môi thích hợp
 - + Thực hiện phản ứng màu: sự hấp thụ của các chất lạ, thuốc thử cũng có thể ảnh hưởng tới kết quả định lượng. Vì vậy trong quá trình làm phản ứng tạo màu phải chú ý tới điều kiện và các thành phần tham gia phản ứng.

• **Các phương pháp định lượng**

- *Phương pháp đo phổ trực tiếp*

Đo độ hấp thụ A của dung dịch, tính nồng độ C của nó dựa vào giá trị độ hấp thụ riêng (có trong các bảng tra cứu).

$$A = E_{1cm}^{1\%} \cdot L \cdot C \quad L = 1\text{cm} \rightarrow C = \frac{A}{E_{1cm}^{1\%}} \quad (3.5)$$

Để áp dụng phương pháp này, cần phải chuẩn hoá máy quang phổ cả về bước sóng lẫn độ hấp thụ.

- *Phương pháp gián tiếp*

Các phương pháp gián tiếp như: phương pháp đường chuẩn, so sánh và thêm chuẩn tương tự như các phương pháp hoá lý khác.

Đặc điểm của phương pháp gián tiếp:

- + Phải có chất chuẩn để so sánh,
- + Có thể không cần phải chuẩn máy.

Hầu hết được diễn các nước đều sử dụng cả 2 phương pháp trực tiếp và gián tiếp. Riêng được điển Mỹ (USP XXI, XXII, XXIII, XXIV) qui định chỉ dùng phương pháp so sánh với chuẩn.

- *Phương pháp so sánh*

Theo định luật Lambert-Beer, sau khi đo độ hấp thụ của dung dịch chuẩn so sánh (S) và dung dịch mẫu thử (X) ta có :

$$A_S = K \cdot L \cdot C_S$$

$$A_X = K \cdot L \cdot C_X$$

Ở đây:

- + A_S : là độ hấp thụ của dung dịch chuẩn có nồng độ C_S ,

+ A_X : là độ hấp thụ của dung dịch mẫu thử nồng độ C_X .

Vì hệ số hấp thụ K và bề dày L của cuvet là như nhau nên ta có:

$$\frac{A_X}{A_S} = \frac{C_X}{C_S} \rightarrow C_X = C_S \frac{A_X}{A_S} \quad (3.6)$$

Chú ý: Nồng độ của dung dịch thử C_X và dung dịch chuẩn C_S không được chênh lệch nhau quá nhiều. Các nồng độ này càng gần nhau, kết quả càng chính xác.

– *Phương pháp thêm chuẩn so sánh.*

Trong phương pháp quang phổ, để loại trừ các yếu tố ảnh hưởng gây sai số cho quá trình định lượng: Xử lý mẫu (chiết xuất), sai lệch do thiết bị và hoá chất thuốc thử..., người ta đã áp dụng phương pháp thêm.

* Nguyên tắc tiến hành:

Lấy hai lượng giống nhau của một mẫu thử.

Thêm một lượng chất chuẩn đã biết vào một mẫu. Tiến hành xử lý cả 2 mẫu trong cùng điều kiện (chiết xuất, pha loãng...), thu được 2 dung dịch: Dung dịch thử và dung dịch thử đã thêm chuẩn.

Đo độ hấp thụ của cả 2 dung dịch. Thu được:

A_X : độ hấp thụ của dung dịch thử.

A'_X : độ hấp thụ của dung dịch thử đã thêm chuẩn.

Với C_S là nồng độ của dung dịch chuẩn, ta tính được nồng độ C_X theo phương trình:

$$\frac{A_X}{A'_X} = \frac{C_X}{C_S + C_X} \rightarrow C_X = C_S \frac{A_X}{A'_X - A_X} \quad (3.7)$$

– *Phương pháp đường chuẩn*

Đây là phương pháp cũng hay dùng trong phân tích quang phổ.

Chuẩn bị một dãy chuẩn khoảng 5 dung dịch có các nồng độ chất chuẩn C_S khác nhau.

Đo độ hấp thụ A_S của dãy chuẩn và lập đồ thị của A theo C

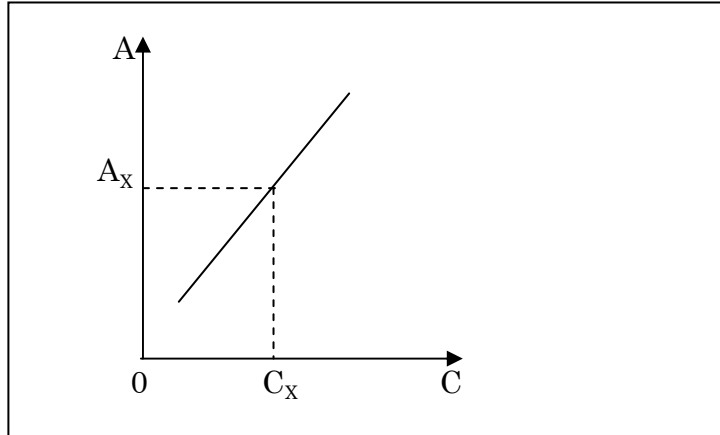
Đo độ hấp thụ A_X của dung dịch mẫu thử và dựa vào đường chuẩn ta xác định được nồng độ mẫu thử C_X .

Chú ý:

Khi xây dựng đường chuẩn nên khảo sát khoảng tuyến tính của nồng độ với độ hấp thụ.

Trường hợp dãy chuẩn không tuân theo định luật Lambert-Beer (đường chuẩn cong) thì cần làm thêm một số điểm chuẩn nữa với các nồng độ gần nhau hơn (khác nhau không quá 10%).

Vẽ đồ thị đi qua các vị trí gần nhất với các điểm thực nghiệm hoặc dựa vào bảng chuẩn để xây dựng phương trình hồi qui tuyến tính hay phi tuyến và tính hệ số tương quan r . Nếu $r \geq 0,995$ là tốt.



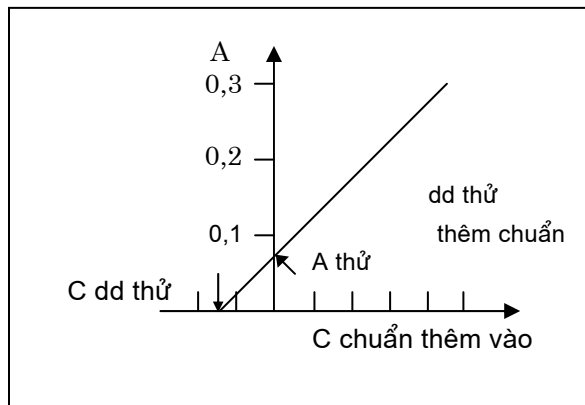
Hình 3.1. Đồ thị của phương pháp đường chuẩn $A = f(C)$

– *Phương pháp thêm đường chuẩn*

Thêm những thể tích giống nhau của dung dịch thử vào dãy chuẩn chứa những lượng khác nhau và chính xác của chất chuẩn

Đo độ hấp thụ của cả dãy rồi vẽ đường chuẩn quan hệ giữa mật độ quang với lượng chất chuẩn thêm vào.

Giao điểm của đường chuẩn với trục hoành (nồng độ) cho ta nồng độ của chất cần định lượng(hình 3.2.)



Hình 3.2. Đồ thị của phương pháp thêm đường chuẩn

– *Kỹ thuật đo quang vi sai theo bước sóng*

Trong kiểm nghiệm các dạng thuốc bào chế, trước tiên phải qua công đoạn chiết hoạt chất ra khỏi tá dược. Dịch chiết khó tránh khỏi mang theo tạp chất. Tạp chất này có thể gây sai số cho quá trình định lượng bằng phương pháp đo quang.

Để loại trừ sai số này, người ta thường sử dụng kỹ thuật đo quang vi sai:

Trên phổ của chất nghiên cứu, chọn 2 bước sóng λ_1 và λ_2 , ở đó hiệu số độ hấp thụ ΔA là lớn nhất .

$$\Delta A_{\max} = A_{\lambda_1} - A_{\lambda_2} \quad (3.8)$$

Chuẩn bị một dãy dung dịch chuẩn với các nồng độ khác nhau và đo độ hấp thụ A ở 2 bước sóng λ_1 và λ_2 .

Khảo sát khoảng nồng độ tuân theo định luật Lambert-Beer của ΔA , vẽ đồ thị quan hệ $\Delta A - C$.

Đo độ hấp thụ A của chất thử ở 2 bước sóng trên.

Dựa vào đồ thị $\Delta A - C$ suy ra nồng độ chất thử trong mẫu.

– *Phương pháp định lượng hỗn hợp*

Do độ hấp thụ có tính cộng tính nên nếu có một dung dịch hỗn hợp gồm n chất thì độ hấp thụ của hỗn hợp bằng tổng độ hấp thụ của n chất riêng rẽ có cùng nồng độ như trong hỗn hợp. Tại một bước sóng xác định ta có:

$$\begin{aligned} A_{hh} &= A_1 + A_2 + \dots + A_n \\ &= E_1 C_1 + E_2 C_2 + \dots + E_n C_n \end{aligned} \quad (3.9)$$

Để thực hiện phương pháp này, cần phải biết hệ số hấp thụ riêng của từng chất ở các bước sóng khác nhau. ($E_i^{\lambda_j}$ = độ hấp thụ riêng của chất thứ i ở λ_j)

Khi số bước sóng bằng số chất ta có hệ n phương trình với n ẩn số.

$$\begin{aligned} A_{hh}^{\lambda 1} &= E_1^{\lambda 1} C_1 + E_2^{\lambda 1} C_2 + \dots + E_n^{\lambda 1} C_n \quad (1) \\ A_{hh}^{\lambda 2} &= E_1^{\lambda 2} C_1 + E_2^{\lambda 2} C_2 + \dots + E_n^{\lambda 2} C_n \quad (2) \\ \dots\dots\dots & \dots\dots\dots \dots\dots\dots \dots\dots\dots \dots\dots\dots \\ A_{hh}^{\lambda n} &= E_1^{\lambda n} C_1 + E_2^{\lambda n} C_2 + \dots + E_n^{\lambda n} C_n \quad (n) \end{aligned} \quad (3.10)$$

Giải hệ phương trình này sẽ tìm được nồng độ của các thành phần trong hỗn hợp: $C_1; C_2; \dots; C_n$

Hiện nay có nhiều chương trình máy tính giải hệ phương trình nhiều ẩn số để xác định nồng độ các thành phần trong dung dịch.

Trường hợp đơn giản nhất là hỗn hợp gồm hai thành phần, ta có:

$$A_{hh} = A_1 + A_2$$

Chọn 2 bước sóng λ_1 và λ_2 và đo độ hấp thụ của hỗn hợp ở 2 bước sóng đó.

$$A_{hh}^{\lambda_1} = E_1^{\lambda_1} C_1 + E_2^{\lambda_1} C_2$$

$$A_{hh}^{\lambda_2} = E_1^{\lambda_2} C_1 + E_2^{\lambda_2} C_2$$

Giải hệ phương trình trên ta tìm được:

$$C_1 = \frac{A_{hh}^{\lambda_1} E_2^{\lambda_2} - A_{hh}^{\lambda_2} E_2^{\lambda_1}}{\Delta}$$

$$C_2 = \frac{A_{hh}^{\lambda_2} E_1^{\lambda_1} - A_{hh}^{\lambda_1} E_1^{\lambda_2}}{\Delta}$$

$$\Delta = E_1^{\lambda_1} E_2^{\lambda_2} - E_1^{\lambda_2} E_2^{\lambda_1}$$

- *Phương pháp phổ đạo hàm*

Phổ đạo hàm là một kỹ thuật bao gồm sự chuyển đổi phổ hấp thụ thành phổ đạo hàm bậc nhất, bậc hai hoặc bậc cao hơn.

* Cơ sở của phương pháp phổ đạo hàm:

Theo định luật Lambert-Beer ta có :

Độ hấp thụ $A = E.C.L$ (C: %, L: cm)

Có thể lấy đạo hàm bậc 1, bậc 2, hoặc bậc cao hơn của A đối với bước sóng λ .

$$A = f(\lambda) \quad (3.11)$$

+ Phổ đạo hàm bậc nhất là đồ thị của tốc độ biến thiên của độ hấp thụ ($dA/d\lambda$) đối với bước sóng .

$$dA/d\lambda = dE/d\lambda .C.L \quad (3.12)$$

+ Phổ đạo hàm bậc hai là đồ thị của độ cong của phổ hấp thụ ($d^2A/d\lambda^2$) đối với bước sóng.

$$d^2A/d\lambda^2 = d^2E/d\lambda^2 .C.L \quad (3.13)$$

Do E là hằng số và L không đổi nên giá trị của đạo hàm của A chỉ còn phụ thuộc tuyến tính với nồng độ C của dung dịch.

* Phổ đạo hàm của hỗn hợp nhiều chất :

Giống như phổ hấp thụ, phổ đạo hàm cũng có tính chất cộng tính

$$A_{hh} = A_1 + A_2 + \dots + A_n = \sum A_i \quad (i = 1 \dots n) \quad (3.14)$$

$$dA_{hh}/d\lambda = dA_1/d\lambda + dA_2/d\lambda + \dots + dA_n/d\lambda$$

$$d^2A_{hh}/d\lambda^2 = d^2A_1/d\lambda^2 + d^2A_2/d\lambda^2 + \dots + d^2A_n/d\lambda^2 \quad (3.15)$$

Theo ý nghĩa toán học của đạo hàm thì :

- Tại các điểm cực trị, đạo hàm bậc 1 bằng 0.
- Tại các điểm uốn, đạo hàm bậc 2 bằng 0.

Tại giá trị 0 của phổ đạo hàm của chất này có thể gặp giá trị khác 0 của phổ đạo hàm của chất kia.

Nếu độ hấp thụ tuân theo định luật Lambert-Beer thì đạo hàm bậc hai ở bước sóng λ bất kỳ nào cũng được liên hệ với nồng độ bởi phương trình sau :

$$\frac{d^2A}{d\lambda^2} = \frac{d^2E}{d\lambda^2} C.L \quad (3.16)$$

Tại một bước sóng xác định, E là một hằng số .

Ở đây:

A: độ hấp thụ ở bước sóng λ

E: độ hấp thụ riêng ở bước sóng λ

C: nồng độ %(kl/tt) của chất hấp thụ

L: bề dày của lớp dung dịch chất hấp thụ (cm)

Ưu điểm của phương pháp phổ đạo hàm:

- Phổ đạo hàm có thể giúp định lượng riêng biệt được các chất có các cực đại hấp thụ gần nhau trong hỗn hợp, trong khi phương pháp đo phổ thông thường không thể giải quyết được.
- Trong một số trường hợp, phổ đạo hàm giúp xác định được hàm lượng của chất thử trong sự có mặt của các tạp chất gây cản trở.

Hiện nay phương pháp phổ đạo hàm đã được một số nước đưa vào được điển: Anh, Ấn Độ 1996, Việt Nam.

3.1.2. Quang phổ hồng ngoại

3.1.2.1. Mở đầu

Phổ hồng ngoại là phương pháp đo sự hấp thụ bức xạ hồng ngoại (IR) khi nó đi qua một lớp chất cần thử, ở các số sóng khác nhau.

Vùng bức xạ hồng ngoại sử dụng trong các máy quang phổ IR thông thường là 600-4000 cm^{-1} .

Các máy hiện nay có thể mở rộng vùng bức xạ (100-10.000 cm^{-1}).

Trong phân tử khi có nhóm nguyên tử nào đó hấp thụ năng lượng và thay đổi trạng thái dao động thì tạo nên một dải hấp thụ trên phổ IR.

Có mối tương quan giữa nhóm nguyên tử và dải hấp thụ nên có thể dựa vào sự có mặt của dải hấp thụ để nhận biết một nhóm chức nào đó.

Nhiều nhóm chức có các dải phổ hấp thụ đặc trưng. Đây là cơ sở của việc phân tích cấu trúc bằng IR (bảng 3.3.).

Việc xác định được sự có mặt của các nhóm chức trong phân tử giúp chúng ta có thể sử dụng phổ IR để định tính một chất.

Trong kiểm nghiệm thuốc hầu hết các dược điển chủ yếu chỉ sử dụng IR vào việc định tính, ít được dùng trong định lượng.

Bảng 3.3. Một số pic hấp thụ hồng ngoại đặc trưng

Nhóm chức		Pic hấp thụ	
		Số sóng (cm^{-1})	Bước sóng μm
O-H	Mạch thẳng, vòng thơm	3600-3000	2,8-3,3
NH ₂	Bậc hai và bậc ba	3600-3100	2,8-3,2
C-H	Thơm	3150-3000	3,2-3,3
C-H	Mạch thẳng	3000-2850	3,3-3,5
C≡N	Nitril	2400-2200	4,2-4,6
C≡C-	Alkyn	2260-2100	4,4-4,8
COOR	Ester	1750-1700	5,7-5,9
COOH	Acid carboxylic	1740-1670	5,7-6,0
C=O	Aldehyd và ceton	1740-1660	5,7-6,0
CONH ₂	Amid	1720-1640	5,8-6,1
C=C-	Alken	1670-1610	6,0-6,2
Ar-O-R	Thơm	1300-1180	7,7-8,5
R-O-R	Mạch thẳng	1160-1060	8,6-9,4

3.1.2.2. Máy

Máy quang phổ ghi phổ trong vùng hồng ngoại bao gồm một hệ quang học có khả năng cung cấp ánh sáng đơn sắc trong dải phổ từ 4000 cm^{-1} đến 670 cm^{-1} (2,5 μm -15 μm) hoặc trong một vài trường hợp tới 200 cm^{-1} (50 μm) và một phương tiện đo tỷ số giữa cường độ ánh sáng truyền qua và ánh sáng tới.

3.1.2.3. Ứng dụng phổ hồng ngoại trong định tính

Phương pháp quang phổ hồng ngoại chủ yếu được ứng dụng trong định tính các chất hữu cơ. Việc định tính này dựa trên 2 nguyên tắc:

- So sánh sự phù hợp giữa phổ chất thử với phổ chuẩn cho sẵn trong sách tra cứu (atlas) hoặc trong thư viện phổ lưu giữ trong máy tính.
- So sánh sự phù hợp giữa phổ chất thử với phổ của hoá chất chuẩn được ghi trong cùng điều kiện.

Phương pháp định tính bằng phổ hồng ngoại của hầu hết các dược điển trên thế giới đều dựa trên hai nguyên tắc này.

• Định tính sử dụng chất chuẩn so sánh

Chuẩn bị mẫu thử và mẫu chất chuẩn so sánh rồi đo phổ của chúng từ 4000cm^{-1} đến 670cm^{-1} ($2,5\mu\text{m}$ - $15\mu\text{m}$) trong cùng điều kiện .

Cực đại hấp thụ ở phổ của chất thử phải tương ứng với phổ của chất chuẩn về vị trí và trị số.

• Định tính sử dụng phổ chuẩn trong atlas hoặc thư viện phổ.

Để có thể so sánh phổ của chất thử với phổ chuẩn tra cứu trong atlas hoặc thư viện phổ của máy tính, trước hết chúng ta cần phải chuẩn hoá máy quang phổ.

Tất cả các dược điển đều chuẩn hoá 2 thông số cơ bản của máy: Độ phân giải và thang số sóng. Tóm tắt cách làm như sau:

- Chuẩn hoá độ phân giải:

Ghi phổ của phim polystyren dày $0,05\text{mm}$

- + Hiệu số giữa phần trăm độ truyền qua ở cực tiểu hấp thụ A ở 2870cm^{-1} ($3,48\mu\text{m}$) và cực đại hấp thụ B ở 2849cm^{-1} ($3,51\mu\text{m}$) phải lớn hơn 18.
- + Hiệu số giữa phần trăm độ truyền qua ở cực tiểu hấp thụ C ở $1589,5\text{cm}^{-1}$ ($6,29\mu\text{m}$) và cực đại hấp thụ D ở 1583cm^{-1} ($6,32\mu\text{m}$) phải lớn hơn 12.

- Chuẩn hoá thang số sóng

Cũng có thể chuẩn hoá thang số sóng bằng cách sử dụng phim polystyren. Phim này có cực tiểu truyền qua (cực đại hấp thụ) ở các số sóng (cm^{-1}) (bảng 3.4.).

Bảng 3.4. Cực đại hấp thụ của phim polystyren (cm⁻¹)

3027,1	(± 0,3)	1583,1	(± 0,3)
2924,0	(± 2)	1181,4	(± 0,3)
2850,7	(± 0,3)	1154,3	(± 0,3)
1944,0	(± 1)	1069,1	(± 0,3)
1871,0	(± 0,3)	1028,0	(± 0,3)
1801,6	(± 0,3)	906,7	(± 0,3)
1601,4	(± 0,3)	698,9	(± 0,5)

3.1.3. Quang phổ huỳnh quang (Fluorometry)

3.1.3.1. Mở đầu

Phổ huỳnh quang là phương pháp phổ phát xạ phân tử. Sau khi hấp thụ năng lượng của bức xạ tử ngoại, khả kiến hoặc các bức xạ điện từ khác (bức xạ kích thích), phân tử bị kích thích sẽ trở lại trạng thái cơ bản và giải phóng năng lượng dưới dạng bức xạ, được gọi là bức xạ huỳnh quang.

Cường độ huỳnh quang F của một dung dịch loãng tỷ lệ thuận với nồng độ C (mol/l) trong điều kiện xác định khi cường độ và bước sóng của bức xạ kích thích là hằng số.

$$F = K \cdot I_0 \cdot \varepsilon \cdot \phi \cdot C \cdot L \quad (3.17)$$

Ở đây :

K : hằng số

I_0 : cường độ của bức xạ kích thích

ϕ : hiệu suất huỳnh quang

$$\phi = \frac{\text{Số photon phát xạ}}{\text{Số photon hấp thụ}} \quad (0 < \phi < 1) \quad (3.18)$$

ε : Hệ số hấp thụ mol của chất ở bước sóng kích thích.

Rút gọn lại ta có: $F = K' \cdot C$.

Ở đây $K' = K \cdot I_0 \cdot \varepsilon \cdot L \cdot \phi$

Việc đo phổ huỳnh quang chỉ nên tiến hành với dung dịch loãng $C < 10^{-4}$ để tránh ảnh hưởng suy giảm cường độ của bức xạ phát ra.

3.1.3.2. Máy

- Nguồn sáng: thường dùng đèn xenon (tạo ánh sáng $\lambda=200-800\text{nm}$), laser.
Đèn xenon cho phổ bức xạ không đều nên kém nhạy hơn nguồn laser.

- Bộ đơn sắc: dùng cách tử
- Cuvet: thường dùng thạch anh (1 x 1cm) có 4 mặt trong suốt.

3.1.3.3. Chuẩn hoá máy

Máy quang phổ huỳnh quang phải được chuẩn hoá thường xuyên với chất chuẩn.

Tiến hành chuẩn máy theo tài liệu hướng dẫn của hãng sản xuất máy.

3.1.3.4. Phương pháp đo

Mẫu thử luôn luôn được đo so sánh với mẫu chuẩn.

Kiểm tra vùng tuyến tính của cường độ huỳnh quang và điều chỉnh độ nhạy của thiết bị với độ pha loãng thích hợp của dung dịch chuẩn .

Ghi cường độ huỳnh quang của dung dịch thử, dung dịch chuẩn và các mẫu trắng tương ứng của chúng.

Tính toán nồng độ của dung dịch thử :

$$C_X = C_S \frac{I_X - I_{OX}}{I_S - I_{OS}} \quad (3.19)$$

Ở đây:

C_X : nồng độ của dung dịch thử

C_S : nồng độ của dung dịch chuẩn

I_X : trị số đo được của dung dịch thử

I_S : trị số đo được của dung dịch chuẩn

I_{OX} và I_{OS} : trị số đo được của các mẫu trắng tương ứng.

Vùng trong đó cường độ huỳnh quang tỉ lệ thuận với nồng độ của chất thường rất hẹp, cho nên tỷ số $(I_X - I_{OX}) / (I_S - I_{OS})$ phải **không được < 0,50 và không > 2,0**. Nếu tỷ số không nằm trong khoảng trên thì phải điều chỉnh nồng độ và tiến hành đo lại.

Trong một số trường hợp, có thể sử dụng cách đo so sánh với chuẩn cố định. *Thí dụ*: dùng kính huỳnh quang hoặc một chất phát huỳnh quang khác.

Nếu cường độ huỳnh quang không tỉ lệ nghiêm ngặt với nồng độ thì nên sử dụng phương pháp đồ thị chuẩn tương quan giữa cường độ và nồng độ.

Độ nhạy của máy có thể được kiểm tra bằng một dung dịch bên của chất huỳnh quang khác với dải sóng kích thích và phát xạ tương tự như dải của chất thử, thay thế cho chất chuẩn.

Ví dụ:

- Quinin trong H_2SO_4 loãng cho huỳnh quang màu xanh,

- Natri fluorescein cho huỳnh quang xanh lá cây,
- Rhodamin B cho huỳnh quang màu đỏ.

Độ tinh khiết của dung môi có thể ảnh hưởng đáng kể tới cường độ huỳnh quang. Nếu cần nên cất lại trong máy cất bằng thủy tinh trước khi dùng.

Sự có mặt của các tiểu phân keo có thể gây nên sự tán xạ ánh sáng, cho nên cần phải loại bỏ chúng bằng ly tâm hoặc lọc bằng màng lọc thủy tinh xốp.

Oxy hoà tan trong dung dịch làm giảm cường độ huỳnh quang rất mạnh, cần phải đuổi nó bằng cách sục khí trơ qua dung dịch.

3.2. PHƯƠNG PHÁP SẮC KÝ LỎNG HIỆU NĂNG CAO

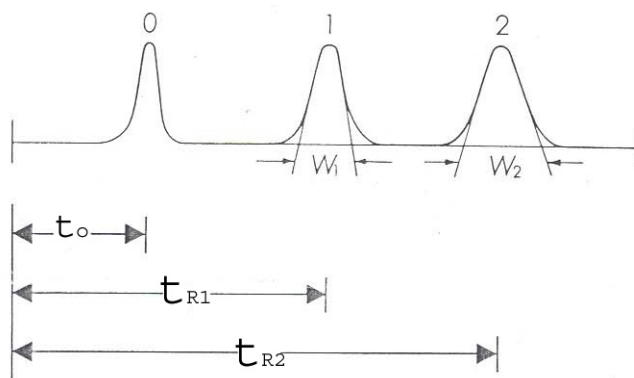
(High- Performance Liquid Chromatography- HPLC)

Sắc ký lỏng hiệu năng cao đôi khi còn được gọi là sắc ký lỏng áp suất cao (High-Pressure) là kỹ thuật phân tích dựa trên cơ sở của sự phân tách các chất trên một pha tĩnh chứa trong cột, nhờ dòng di chuyển của pha động lỏng dưới áp suất cao. Sắc ký lỏng dựa trên cơ chế hấp phụ, phân bố, trao đổi ion hay loại cõ là tùy thuộc vào loại pha tĩnh sử dụng. Khi phân tích sắc ký, các chất được hòa tan trong dung môi thích hợp và hầu hết sự phân tách đều xảy ra ở nhiệt độ thường. Chính vì thế mà các thuốc không bền với nhiệt không bị phân hủy khi sắc ký. Sắc ký thường được hoàn thành trong một thời gian ngắn (khoảng 30 phút). Chỉ những thành phần có hệ số chọn lọc khác nhau mới có thể phân tích được bằng HPLC. Ngày nay HPLC đã và đang được sử dụng nhiều trong lĩnh vực phân tích hoá học nói chung cũng như trong kiểm tra chất lượng thuốc và phân tích sinh dược học nói riêng.

Trong phân tích thuốc bằng phương pháp sắc ký, phần lớn các dược điển đều sử dụng sắc ký phân bố. Nên chúng tôi chủ yếu đề cập tới phương pháp này.

3.2.1. Các thông số đặc trưng của quá trình sắc ký

- *Hệ số dung lượng k' (Capacity factor)*



Hình 3.3. Minh họa các thông số sắc ký

$$k' = K \frac{V_s}{V_m} = \frac{Q_s}{Q_m} = \frac{t'_R}{t_o} = \frac{t_R - t_o}{t_o} \quad (3.20)$$

Ở đây:

K : hệ số phân bố

V_s : thể tích pha tĩnh

V_m : thể tích pha động

Q_s : lượng chất trong pha tĩnh

Q_m : lượng chất trong pha động

t_R : thời gian lưu

t'_R : thời gian lưu hiệu chỉnh

t_o : thời gian chết

Cần chọn cột, pha động ... sao cho k' nằm trong khoảng tối ưu : $1 \leq k' \leq 8$.

- Hệ số chọn lọc α :

$$\alpha = \frac{k'_B}{k'_A} = \frac{t_{RB}}{t_{RA}} \quad (3.21)$$

Qui ước ở đây B là chất bị lưu giữ mạnh hơn A nên $\alpha > 1$

Để tách riêng 2 chất thường chọn $1,05 \leq \alpha \leq 2,0$

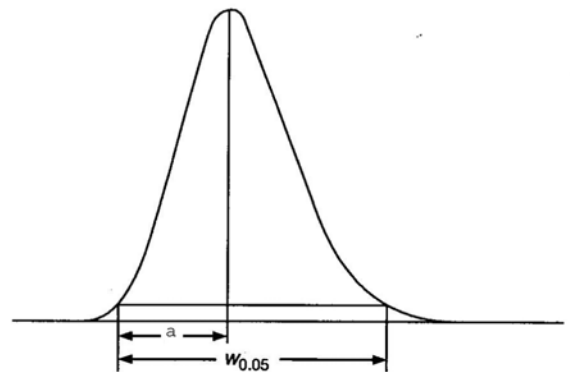
- Hệ số đối xứng của pic F:

$$F = \frac{W}{2a} \quad (3.22)$$

Ở đây:

W: Chiều rộng pic đo ở 1/20 chiều cao pic,

a: Khoảng cách từ đường vuông góc hạ từ đỉnh pic đến mép đường cong phía trước tại vị trí 1/20 chiều cao pic.



Hình 3.4: Xác định hệ số đối xứng

- **Số đĩa lý thuyết và hiệu lực cột N:**

Hiệu lực cột được đo bằng thông số: Số đĩa lý thuyết N của cột

$$N = 16 \frac{t_R^2}{W^2} = 5,54 \frac{t_R^2}{W_{1/2}^2} \quad (3.23)$$

Ở đây:

W: Chiều rộng đo ở đáy pic,

$W_{1/2}$: Chiều rộng pic đo ở nửa chiều cao pic.

- **Độ phân giải R_s :**

$$R_s = \frac{2(t_{RB} - t_{RA})}{W_B + W_A} = \frac{1,18(t_{RB} - t_{RA})}{W_{1/2B} + W_{1/2A}} \quad 3.24$$

Với:

t_{RB}, t_{RA} : Thời gian lưu của 2 pic liên kế nhau (B và A),

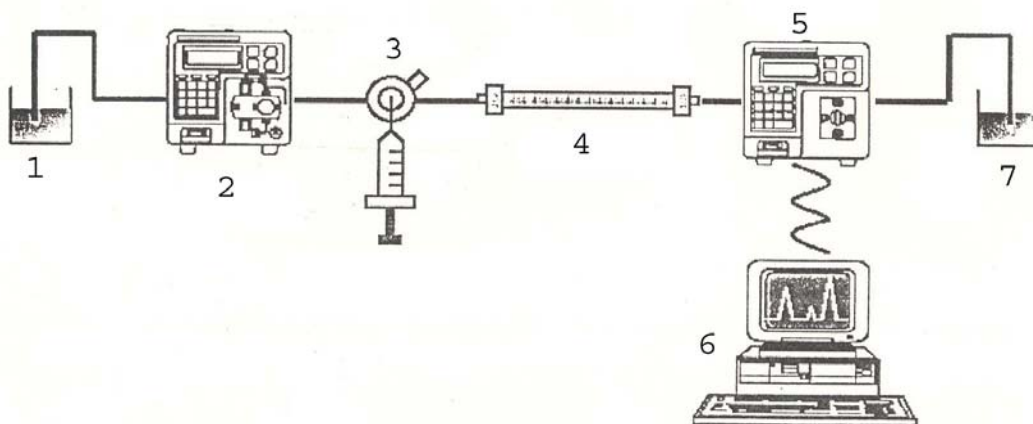
W_B, W_A : Độ rộng pic đo ở các đáy pic,

$W_{1/2B}, W_{1/2A}$: Độ rộng pic đo ở nửa chiều cao pic.

Các giá trị: $t_{RB}, t_{RA}, W_B, W_A, W_{1/2B}, W_{1/2A}$ phải tính theo cùng một đơn vị.

Yêu cầu $R_s > 1$, giá trị tối ưu $R_s = 1,5$.

3.2.2. Máy HPLC



Hình 3.5: Sơ đồ nguyên lý của máy HPLC.

- | | | |
|------------------|-------------------|-------------------|
| 1- Bình dung môi | 4- Cột | 7- Bình nước thải |
| 2- Bơm | 5- Detector | |
| 3- Tiêm mẫu | 6- Phần mềm xử lý | |

Máy sắc ký lỏng hiệu năng cao gồm có các bộ phận sau:

Bình chứa pha động, bơm đẩy pha động qua hệ thống sắc ký ở áp suất cao, hệ tiêm mẫu để đưa mẫu vào pha động, cột sắc ký, detector, máy tính hay máy tích phân hoặc máy ghi.

- **Hệ bơm**

Hệ bơm HPLC có chức năng tạo áp suất cao để đẩy pha động từ bình dung môi qua hệ thống sắc ký.

Hệ bơm hiện đại hiện nay được điều khiển bằng máy tính có thể lập chương trình để thay đổi tỷ lệ của các thành phần pha động theo yêu cầu (sắc ký gradient).

Bơm HPLC cần phải đáp ứng một số yêu cầu :

Tạo được áp suất cao 3000-6000 psi (250-500 atm), lưu lượng bơm khoảng 0,1 đến 10ml/phút, không bị ăn mòn với các thành phần pha động, có tốc độ bơm không đổi.

- **Hệ tiêm mẫu**

Có thể dùng bơm tiêm để tiêm mẫu vào đầu cột. Phương pháp phổ biến là dùng van tiêm có vòng chứa mẫu (sample loop) có dung tích xác định và chính xác, có thể thay đổi vòng chứa mẫu với các dung tích khác nhau.

Một số máy HPLC hiện đại có hệ tiêm mẫu tự động có thể lập trình điều khiển thể tích mẫu, số lần tiêm và chu kỳ rửa vòng chứa mẫu.

- **Cột**

Cột được dùng phổ biến làm bằng thép không gỉ, thông thường có chiều dài 10-30cm, đường kính trong từ 2- 5 mm, hạt chất nạp (packings) cỡ 5-10 μm . Cột có đường kính trong lớn hơn được dùng cho sắc ký điều chế. Cột có thể được làm nóng để đạt hiệu quả phân tách tốt hơn, nhưng hiếm khi tiến hành ở nhiệt độ trên 60° C vì nhiệt có thể làm suy giảm hiệu lực cột hoặc làm pha động bay hơi. Chất nạp thường là silica gel hoặc silica gel có bao một lớp mỏng hữu cơ hoặc liên kết hóa học với các nhóm chức hữu cơ. Bên cạnh silica gel người ta còn dùng các chất liệu khác như: nhôm oxyd, polyme xốp, nhựa trao đổi ion....

- **Detector**

Detector là bộ phận phát hiện và đo các tín hiệu sinh ra khi có chất ra khỏi cột và các tín hiệu này được ghi dưới dạng pic trên sắc đồ.

Các loại detector được dùng hiện nay:

Detector tử ngoại và khả kiến (UV-VIS) có bước sóng tùy chọn được dùng phổ biến nhất.

Detector hiện đại thuộc loại này là detector dãy diod (diode array detector). Detector này luôn luôn có tỷ lệ tín hiệu nhiễu thấp hơn so với detector UV-VIS bình thường.

Các loại detector khác :

- Detector đo chỉ số khúc xạ
- Detector huỳnh quang, điện hoá.

3.2.3. Các kỹ thuật HPLC.

Có 4 kỹ thuật HPLC cơ bản: Sắc ký phân bố, hấp phụ, trao đổi ion và sắc ký loại cỡ (rây phân tử). Trong phạm vi cuốn sách, chủ yếu chúng tôi giới thiệu về sắc ký phân bố, vì đây là kỹ thuật HPLC được sử dụng nhiều nhất trong kiểm nghiệm thuốc. Còn các kỹ thuật khác, chỉ có tính chất giới thiệu tóm tắt.

Sắc ký phân bố hiệu năng cao (Partition Chromatography)

Pha tĩnh

Pha tĩnh trong sắc ký phân bố bao gồm một lớp mỏng pha lỏng hữu cơ bao trên bề mặt của các tiểu phân chất mang silica hoặc các chất liệu khác. Các tiểu phân này thường có đường kính từ 3 đến 10 μm , cỡ hạt có thể tăng đến 50 μm hoặc lớn hơn cho sắc ký điều chế. Sắc ký dùng loại pha tĩnh này được gọi là sắc ký lỏng- lỏng (*Liquid - liquid Chromatography - LLC*). Nhưng kiểu pha tĩnh này có nhược điểm là bị rửa trôi dần theo dòng pha động. Kết quả, hiệu lực cột bị giảm dần trong quá trình sử dụng.

Để khắc phục nhược điểm trên, người ta đã sử dụng kỹ thuật sắc ký pha liên kết (*Bonded- Phase Chromatography - BPC*). Trong kỹ thuật này, pha tĩnh được liên kết hóa học với chất mang. Kỹ thuật này đã nhanh chóng trở thành kỹ thuật phổ biến nhất trong HPLC. Trong loại pha tĩnh này, các nhóm chức hữu cơ liên kết với bề mặt của các tiểu phân silica qua các nhóm silanol. Tính phân cực của loại pha tĩnh này phụ thuộc vào tính phân cực của các nhóm chức liên kết, chúng ở trong vùng từ nhóm không phân cực octadecyl silan đến nhóm rất phân cực nitril.

Dưới đây là một số pha liên kết thường dùng:

Octyl	= Si- (CH ₂) ₇ - CH ₃	C ₈
Octadecyl	= Si- (CH ₂) ₁₇ - CH ₃	C ₁₈
Phenyl	= Si- (CH ₂) _n - C ₆ H ₅	C ₆ H ₅
Cyanopropyl	= Si- (CH ₂) ₃ - CN	CN
Aminopropyl	= Si- (CH ₂) ₃ - NH ₂	NH ₂
Diol	= Si- (CH ₂) ₃ - OCH (OH) - CH ₂ - OH	

Hệ bao gồm pha tĩnh phân cực và pha động không phân cực được gọi là sắc ký pha thuận. Ngược lại, pha động phân cực còn pha tĩnh không phân cực, được gọi là sắc ký pha đảo.

- Khi sử dụng silica, nhôm oxyd hoặc polyme xốp thì các chất được phân tách theo cơ chế hấp phụ nên được gọi là sắc ký hấp phụ.

- Nếu pha tĩnh là nhựa trao đổi ion thì gọi là sắc ký trao đổi ion .
- Nếu pha tĩnh là polyme xốp như dextran..., ta có sắc ký loại cỡ (sắc ký rây phân tử *Size Exclusion Chromatography*).

Pha động

Ái lực của một thành phần đối với pha tĩnh hay nói một cách khác, thời gian lưu giữ của nó ở trên cột được điều khiển bằng cách thay đổi độ phân cực của pha động. Pha động có thể là dung môi đơn hay hỗn hợp của 2, 3 hay 4 thành phần. Người ta có thể thay đổi độ phân cực của pha động bằng cách thay đổi tỷ lệ của các thành phần dung môi trong hỗn hợp. Kỹ thuật thay đổi liên tục thành phần dung môi trong thời gian chạy sắc ký được gọi là rửa giải gradient hoặc chương trình hóa dung môi.

Tuỳ thuộc vào việc sử dụng pha động và pha tĩnh người ta chia sắc ký phân bố thành 2 loại (sắc ký pha thuận và sắc ký pha đảo):

* *Sắc ký pha thuận* (normal phase):

Trong kỹ thuật này người ta sử dụng chất nạp cột (packings) gồm các nhóm phân cực liên kết với chất mang như nhóm alkylnitril $[-(\text{CH}_2)_n\text{CN}]$ và alkylamin $[-(\text{CH}_2)_n\text{NH}_2]$. Dung môi sử dụng là dung môi của sắc ký hấp phụ (sắc ký lỏng rắn - LSC). Kỹ thuật này, sử dụng pha tĩnh phân cực hơn pha động, được gọi là sắc ký phân bố pha thuận. Sự phân tách đạt được bằng sắc ký pha thuận cũng tương tự như ở LSC. Song pha tĩnh trong sắc ký pha liên kết có ưu điểm hơn pha tĩnh trong LSC:

- . Cột nhanh đạt cân bằng nên rất thuận lợi cho phân tách gradient.
- . Cột thích hợp với nhiều dung môi và dễ tái sinh.
- . Cột rất bền.
- . Cột alkylamin có thể có chức năng như một cột trao đổi anion yếu.

Pha động trong sắc ký pha thuận nói chung không phân cực, thường dùng hỗn hợp của các hydrocarbon mạch thẳng như pentan, hexan, heptan, isootan. Các dẫn chất halogen dãy béo cũng được sử dụng như: diclorometan, dicloroetan, butyl clorid và cloroform. Có thể thêm vào các pha khan nước này 1- 2% acid acetic hoặc phosphoric để ngăn cản sự ion hóa của các chất như: các phenol, acid carboxylic. Ngược lại, sự ion hóa của các base yếu có thể được kìm lại bằng cách thêm một lượng nhỏ amoniac hoặc một amin khác (0,1- 1%). Ngoài ra cũng có thể thêm vào pha động những chất cải biến hữu cơ (*organic modifier*) khác như các alcohol, tetrahydrofuran.

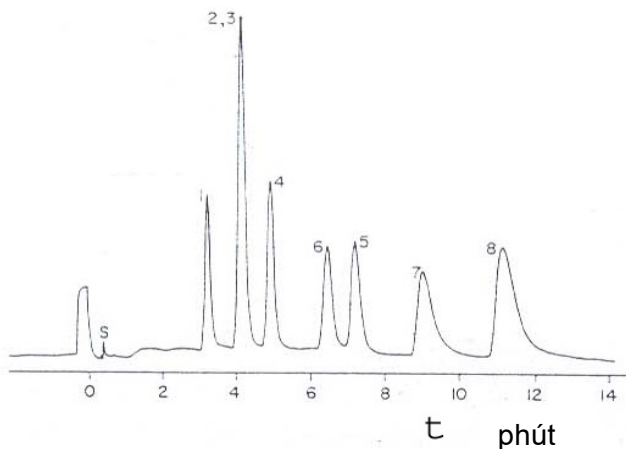
Nói chung, việc đuổi khí hòa tan không thành vấn đề với dung môi pha thuận.

Trong kỹ thuật sắc ký pha thuận các chất không phân cực sẽ được rửa giải sớm. Thứ tự rửa giải sẽ chậm dần theo chiều tăng của độ phân cực của các thành phần trong mẫu thử.

Ví dụ: Tách hỗn hợp steroid bằng sắc ký pha thuận.

Điều kiện sắc ký:

- Cột: MicroPak – NH₂ 2,2 x 150 mm, 5 μm.
- Pha động: hexan chứa 0,2% isopropanol.
- Tốc độ dòng: 1 ml/ phút.
- Detector: UV 254 nm



Hình 3.6: Sắc đồ tách các steroid

- | | |
|---|---------------------|
| 1- Progesterone | 5- Andrenosterone |
| 2- Androstendione | 6- Cortisone acetat |
| 3- Δ ⁴ - pregnon-20-β-ol-one | 7- Cortisone |
| 4- 17-α-hydroxyprogesterone | 8- Hydrocortisone |

* *Sắc ký pha đảo* (reversed phase) :

Trong kiểm nghiệm thuốc bằng phương pháp HPLC, sắc ký phân bố pha đảo được sử dụng nhiều nhất.

Trong kỹ thuật này pha tĩnh bao gồm các nhóm không phân cực như octadecyl (C₁₈), octyl (C₈) hay phenyl (C₆H₅). Pha động là những dung môi phân cực như: nước, methanol (MeOH), acetonitril (ACN). Tóm lại, pha động phân cực hơn pha tĩnh.

Độ chọn lọc của kỹ thuật này khác biệt đáng kể với quá trình tách trên pha thuận. Người ta thấy rằng, một chất càng tan tốt trong nước thì nó được rửa giải khỏi cột càng nhanh. Quy tắc rửa giải này ngược với pha thuận.

Với các chất được rửa giải quá sớm trong sắc ký pha thuận, chúng sẽ rất khó tách rời khỏi nhau. Trong khi đó, ở pha đảo các thành phần này sẽ được rửa giải vào gần cuối của quá trình sắc ký làm cho việc tách dễ dàng hơn (có nghĩa là k' lớn hơn).

Khi một pic nhỏ được rửa giải sau một pic lớn thì thường rất khó định lượng bằng sắc ký pha thuận. Tuy nhiên dãy rửa giải có thể đảo ngược lại bằng cách dùng sắc ký pha đảo. Khi đó pic nhỏ có thể được xác định chính xác hơn.

Thành phần đầu tiên của pha động trong sắc ký pha đảo là nước. Những dung môi hòa lẫn được với nước như methanol, ethanol (EtOH), acetonitril, dioxan, tetrahydrofuran (THF) và dimethylformamid được thêm vào để điều chỉnh độ phân cực của pha động. Một số thành phần khác cũng có thể được thêm vào pha động như: các acid, base, đệm, chất điện hoạt.

Cặp dung môi được sử dụng phổ biến nhất trong sắc ký pha đảo là:

H₂O - MeOH và H₂O - ACN. Điều dễ nhận thấy, MeOH có nhược điểm là độ nhớt cao của nó có thể làm giảm hiệu lực cột. Trong khi ACN có độ nhớt thấp hơn, thích hợp hơn với các chất không phân cực vì thế nó thường được dùng nhiều hơn MeOH. Thời gian lưu sẽ ngắn hơn nếu nồng độ ACN bằng nồng độ MeOH.

Chú ý: Khi pha động có thêm các muối vô cơ hoặc các chất hoạt động bề mặt, nên lọc nó trước khi dùng vì có thể có cặn không tan trong nước gây bẩn cột.

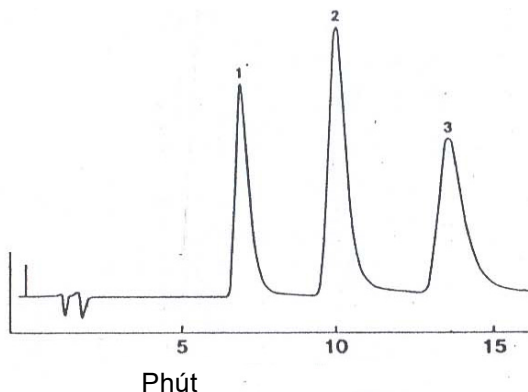
Việc đuổi khí rất quan trọng với pha động pha đảo.

Về thứ tự rửa giải: Trong sắc ký pha đảo các chất phân cực ra trước, các chất ít và không phân cực ra sau.

Ví dụ: Tách hỗn hợp morphin, codein và heroin bằng HPLC pha đảo (hình 3.7).

Điều kiện sắc ký:

- Cột: Zorbax Rx, Sb- C 8, 4,6 x 150 mm, 5µm.
- Pha động: ACN/KH₂PO₄ 25 mM, pH 3,5 7/ 93.
- Tốc độ dòng: 1,5 ml/phút
- Detector: UV 254 nm



Hình 3.7: Sắc đồ tách morphin, codein, heroin.

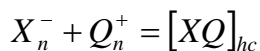
1 - Morphin

2 - Codein

3 - Heroin.

Sắc ký cặp ion (Ion-Pair Chromatography IPC)

Sắc ký cặp ion dựa trên cơ sở sự tạo thành cặp từ ion cần phân tích mang điện và tác nhân tạo cặp mang điện trái dấu (*đôi ion*).



Nhìn chung, IPC thực chất là HPLC pha đảo.

Dung môi: Chính là dung môi trong pha đảo, thường phối hợp H₂O-MeOH và H₂O-ACN. Điểm quan trọng nhất là phải đảm bảo rằng thuốc thử tạo cặp ion đã tan hết trong pha động để tránh kết tủa trong hệ thống.

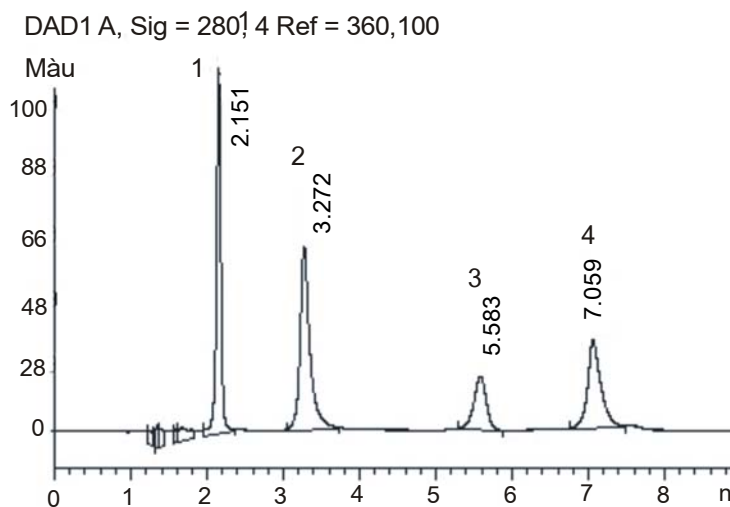
Đôi ion: Đôi ion thường là các amin bậc 4 hoặc các muối sulfonat. Cần phải điều chỉnh pH của pha động với đệm tới giá trị thích hợp. Đồng thời phải kiểm tra độ tan của đệm trong dung môi trước khi bơm qua hệ sắc ký.

Cột: Dùng các chất nạp pha đảo với các nhóm alkyl C₂, C₈, và C₁₈....

Ví dụ: Tách hỗn hợp vitamin tan trong nước bằng HPLC cặp ion pha đảo.

Điều kiện sắc ký:

- Mẫu thử: Vitamin tan trong nước.
- Cột: Zorbax SB C 8, 4,6 x 150 mm, 5 μm.
- Pha động: ACN/ MeOH/ diethylamin 2%/ acid acetic 2% (2/ 3/ 4/ 28) và 1,1 g Na heptan sulfonat/ lit.
- Tốc độ dòng: 1 ml/ phút.
- Detector: UV 280 nm



Hình 3.8: Sắc đồ tách hỗn hợp vitamin tan trong nước.

- | | |
|---------------------------|---------------------------|
| 1. Vitamin PP | 2. Vitamin B ₆ |
| 3. Vitamin B ₂ | 4. Vitamin B ₁ |

Sắc ký hấp phụ hiệu năng cao (Liquid – Solid Chromatography LSC).

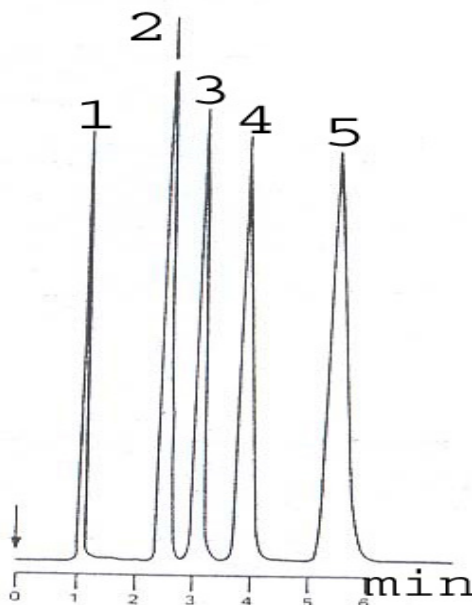
Là kỹ thuật phát triển sớm nhất và được dùng phổ biến. Trong kỹ thuật này, chất cần phân tích bị giữ trên bề mặt pha tĩnh (chất hấp phụ) và bị dung môi đẩy ra (phản hấp phụ).

Pha tĩnh có thể là silicagel, nhôm oxyd ... nhưng silicagel được dùng nhiều hơn. Pha động thường là những dung môi ít hoặc không phân cực. Khi rửa giải, các chất không phân cực sẽ ra trước, các chất càng phân cực càng ra chậm.

Ví dụ: Tách hỗn hợp steroid acetat bằng HPLC hấp phụ

Điều kiện sắc ký:

- Mẫu thử: Hỗn hợp steroid acetat
- Cột: LiChrosorb Si 60 4,6 x 250 mm, 7 μ m.
- Pha động: Chloroform/ methanol 95,5/ 0,5.
- Tốc độ dòng: 1,5 ml/ phút
- Detector: 254 nm



Hình 3.9: Sắc đồ tách hỗn hợp steroid acetat

- | | |
|--|------------------|
| 1. 11- Deoxycorticosteron | 4. Hydrocortison |
| 2. Cortison | 5. Prednisolon |
| 3. 9 α - Fluorohydrocortison acetat | |

Sắc ký trao đổi ion (Ion – Exchange Chromatography IEC)

Sắc ký trao đổi ion được dùng để phân tách các thành phần ion hóa tan trong nước, có phân tử lượng nhỏ hơn 1500. Pha tĩnh là các nhựa trao đổi ion dưới dạng bột mịn. Đó là những hợp chất hữu cơ cao phân tử có chứa nhóm chức có khả năng trao đổi.

- Nhựa có nhóm hoạt động mang điện tích âm, dùng để tách các chất base như các amin.
- Nhựa có nhóm hoạt động tích điện dương để phân tách các chất có nhóm mang điện âm, như các nhóm phosphat, sulfonat, carboxylat.

pH của pha động, nhiệt độ, loại ion, nồng độ ion, và các chất cải biến hữu cơ ảnh hưởng đến cân bằng, nhưng có thể điều chỉnh được để thu được kết quả tách mong muốn.

Sắc ký loại cỡ (Size Exclusion Chromatography SEC)

Phương pháp SEC được ứng dụng chủ yếu để phân tách các chất có phân tử lượng (MW) lớn hơn 2000. Pha tĩnh là những hạt xốp của silicagel hay polyme.

Khi sắc ký, các phân tử của các chất phân tích được lọc theo cỡ của khối lượng phân tử. Khi cho hỗn hợp cần phân tách qua cột, ta thấy:

- Các phân tử có MW quá lớn, chạy nhanh qua cột, chúng không bị lưu giữ.
- Các phân tử có MW nhỏ hơn thì bị lưu giữ trên cột. Khi rửa giải chúng sẽ lần lượt ra khỏi cột với thời gian lưu tăng theo chiều giảm của khối lượng phân tử.

3.2.4. Hướng dẫn chọn kỹ thuật HPLC

Trong HPLC, có 4 kỹ thuật sắc ký cơ bản: phân bố, hấp phụ, trao đổi ion và sắc ký loại cỡ. Muốn chọn một kỹ thuật sắc ký thích hợp để phân tách một hỗn hợp, phải dựa vào các đặc tính lý, hóa học của các chất thành phần:

- + Tính tan: tan hay không tan trong nước.
- + Phân tử lượng (MW).
- + Tính phân cực: ion hóa hay không ion hóa.

Hình 3.10. trình bày sơ đồ chọn kỹ thuật HPLC. Tất nhiên, đây chưa phải là một chỉ dẫn thật chính xác mà chỉ là một định hướng sơ bộ.

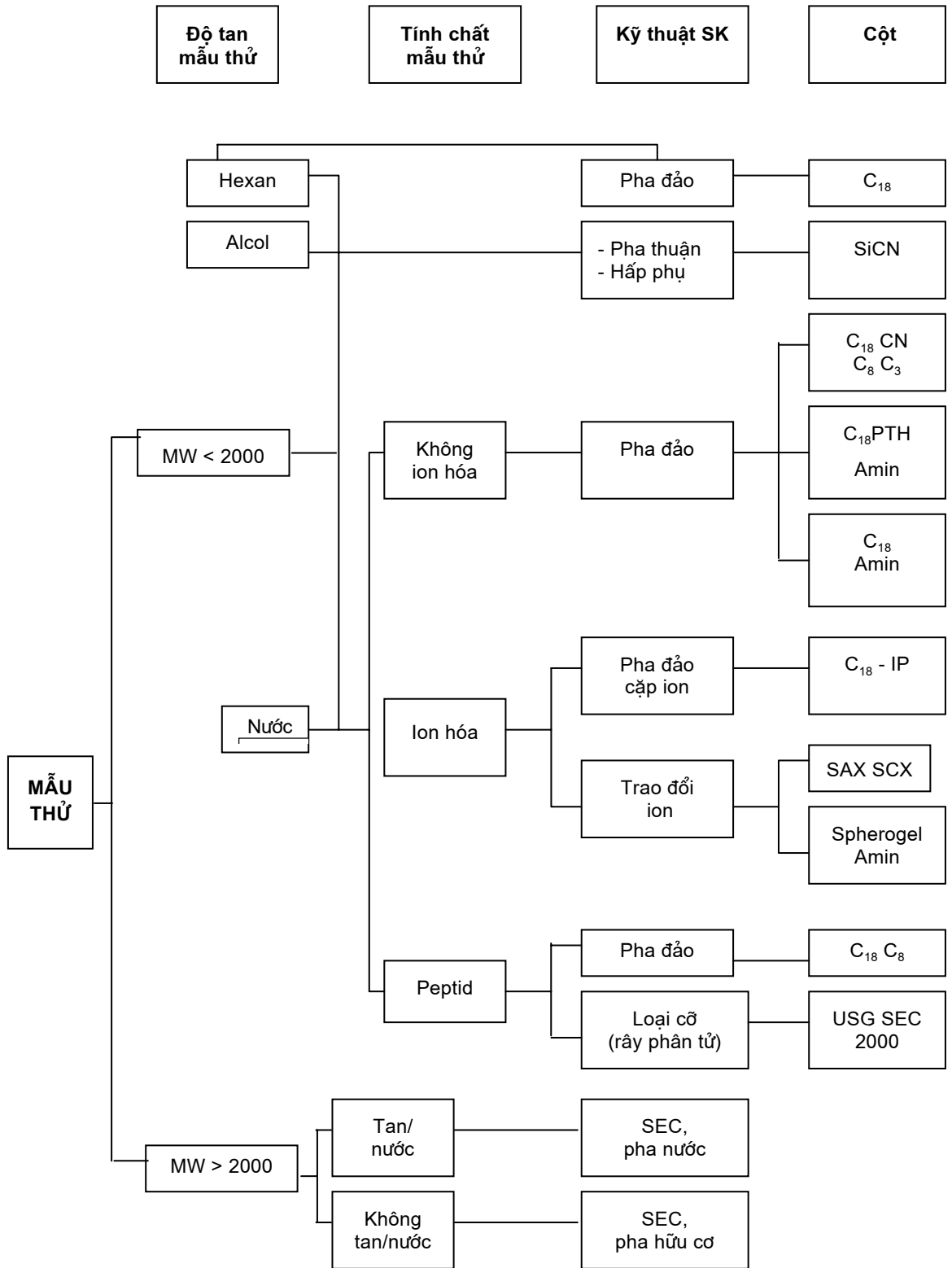
- Nếu phân tử lượng lớn hơn 2000: nên sử dụng sắc ký rây phân tử. Dùng dung môi là nước nếu mẫu thử tan trong nước. Nếu mẫu tan trong dung môi hữu cơ, thì dùng dung môi hữu cơ làm pha động.

Pha tĩnh là Sephadex (dextran) hoặc μ Bondagel Series E thì pha động là nước. Còn Styragel hoặc gel MicroPak TSK thì dùng pha động hữu cơ.

- Nếu phân tử lượng dưới 2000: trước hết phải xác định xem mẫu có tan trong nước hay không.

- + Nếu mẫu tan hoặc ít tan trong nước thì có thể sử dụng sắc ký trao đổi ion hoặc phân bố pha đảo.
- + Nếu độ tan được tăng lên khi thêm acid hoặc kiềm thì dùng kỹ thuật trao đổi ion.
- + Nếu độ tan không bị ảnh hưởng bởi acid hoặc kiềm và dung dịch nước của nó hoàn toàn trung tính thì nên chọn sắc ký phân bố pha đảo.
- + Nếu mẫu không tan trong nước thì nên sử dụng sắc ký phân bố pha thuận hoặc LSC.
- + Để tách các đồng phân, nên dùng LSC.
- + Để tách các đồng đẳng, nên dùng sắc ký phân bố.

Cần phải nhắc lại rằng những thông tin đã dẫn chỉ là những gợi ý ban đầu, không mang tính bắt buộc. Tất nhiên, để đảm bảo việc phân tích sắc ký được thành công nhà kiểm nghiệm cần phải tiến hành khảo sát bằng thực nghiệm.



Hình 3.10: Sơ đồ hướng dẫn chọn kỹ thuật HPLC

Bảng 3.5: Điều kiện phân tích một số thuốc bằng HPLC

Tên thuốc	Cột	Pha động	Detector	Mẫu thử
Acenocumarol	RP - 2	ACN/ H ₂ O/CH ₃ COOH	305	Huyết tương
Acephyllin	C - 18	MeOH/ NaH ₂ PO ₄ 0,01 M	280	Huyết thanh
Acetaminophen Guaifenesin Dextromethorphan	C - 18	HCOONH ₄ / MeOH/H ₂ O 10/ 450/ 540 (pH 4,2)	254	Siro ho
Acetaminophen Aspirin Caffein Codein Phenacetin Salicylamid	C - 18	MeOH/ NaH ₂ PO ₄ 0,01 M 19/ 81 pH 2,3	254	Viên nén
Acetaminophen P - aminophenol	Phenyl	TBA phosphat 0,005 M /ACN 85/15 pH 7,5	254	Viên nén
Acetazolamide	C - 18	ACN / acetat 0,05 M	254	Huyết tương, nước tiểu
Acetazolamide	Silica	Hexan/CHCl ₃ /MeOH/AcOH 65 /25 / 10 / 0,25	254	Nước tiểu
Acid aminocaproic	C - 8	MeOH / H ₂ O / H ₃ PO ₄ 40 / 60 / 0,1	345	Huyết thanh
Acid 5- aminosalicilic	C - 18	MeOH / H ₂ O / H ₃ PO ₄ 40 / 60 / 0,1	345	Huyết tương
Acyclovir	C - 18	NaOAc 0,005 M, Na heptansulfonat 0,0025 M, pH 6,5	300; 418	Huyết tương
Amoxicilin	C - 18	H ₂ O / MeOH / AcOH 85 / 15 / 0,5	395; 485	Nước tiểu
Amoxicilin Ampicilin	C - 8	KH ₂ PO ₄ 0,067 M (pH 4,6) / MeOH 425 / 75	225	Huyết tương Nước tiểu
Antipyrin	C - 18	ACN / AcOH 1% 35/65	254	Huyết tương
Apomorphin	Phenyl	MeOH / ACN / đệm pH 3,5 chứa Na laurylsulfat	273	Huyết thanh
Acid ascorbic	C - 18	H ₃ PO ₄ 0,8% trong nước	254	Nước tiểu
Aspirin	Silica	Heptan/ AcOH 95/ 5	300	Viên nén

Tên thuốc	Cột	Pha động	Detector	Mẫu thử
Aspirin Acid salicylic Acid salicyluric Acid gentisic	C- 18	ACN/ AcOH 1% 20/ 80	280	Huyết tương, nước tiểu
Atenolol	Cyano	Acid heptansulfuric/ triethanolamin 0,2 M / MeOH 2/100/ 1900	220	Huyết tương
Barbiturat	C – 18	MeOH/ NaH ₂ PO ₄ 0,1 M 60/ 40	240	Huyết thanh
Benzocain	C – 18	MeOH/ NaH ₂ PO ₄ 0,1 M 60/ 40	240	Huyết thanh
Benzocain	C – 18	MeOH/ ACN/ H ₂ O	254 ; 294	Dung dịch
Acid benzoic Acid salicylic	C – 18	MeOH/ KH ₂ PO ₄ 10/ 90 pH 6,2	254	Mỡ
Benzoyl peroxyd	C – 18	ACN/ H ₂ O 50/ 50		Mỡ
Beta methason Sodium phosphat	C – 18	MeOH/ KH ₂ PO ₄ 0,09 M 60/ 40	254	Dung dịch
Bromazepam	C – 18	MeOH/ ACN/ H ₂ O (có chứa 20 ml TBAH 10%/ lit 20/ 300/ 70	230	Huyết tương
Caffein	Silica	THF/ CH ₂ Cl ₂ 20/ 80	272	Huyết thanh
Camphor	Silica	Heptan/ CHCl ₃ 60/ 40	254	Dạng phân liểu
Captopril	C – 18	MeOH/ K ₃ PO ₄ (pH 6,5) 52/ 48	340	Huyết tương
Carbamazepin	C - 18	52/ 48 ACN/ H ₂ O 50/50	288	Huyết tương
Chloramphenicol	C – 8	MeOH/ H ₃ PO ₄ 0,05 % 40/ 60	280	Huyết tương
Chlodiazepoxide	C – 18	ACN/ NH ₄ CO ₃ 0,1%	260	Huyết tương
Chloroquin	C – 18	MeOH/ H ₂ O/ AcOH 80/ 19/ 1 Na heptansufonat	340	Huyết tương
Chlopheniramin	Cyano	ACN/ MeOH/ phosphat 0,015 M (pH 6,6) 25/ 25/ 50	254	Nước tiểu
Chlopromazin	Cyano	Acetat 0,05M(pH 6,5)/ ACN	254	Huyết tương

Tên thuốc	Cột	Pha động	Detector	Mẫu thử
Chlorzoxazon	C – 18	MeOH/ H ₂ O 60/40	254	Huyết tương
Cimetidin	C – 18	MeOH/ H ₂ O 60/40	180	Huyết tương
Cimetidin	C – 18	ACN/ H ₂ O/ NH ₄ OH 1000/ 50/ 1		Huyết tương
Codein	C – 18	ACN/ H ₂ O 375/ 625 0,005 M Na dioctylsulfonat, pH 3,3	254	Dạng phân liều
Cortisone và hydrocortison	C – 18	ACN/ H ₂ O 375/ 625 0,005 M Na dioctylsulfonat, pH 3,3	254	Dạng phân liều
Cortisone và hydrocortison	Silica	Hexan/ ethyl acetat 60/ 50	360	Huyết thanh
Dexamethason	C – 18	KH ₂ PO ₄ 0,01 M/ MeOH 50/ 50	254	Dạng phân liều
Dextromethophan	C – 18	ACN/ đệm acetat (pH 4,3) 35/ 65	220	Huyết tương
Diazepam	C – 18	MeOH/ H ₂ O 65/ 35	254	Viên nén
Vitamin D ₃	C – 18	H ₂ O/ MeOH 1/ 9	254	Huyết thanh
Estrogen	C – 18	MeOH/ H ₂ O 60/ 40	280	Viên nén
Fluorouracil	C – 18	MeOH/ acetat 0,01 M (pH 4) 6/ 94	270	Huyết thanh
Acid folic	C – 18	H ₂ O/ MeOH (pH 7,0) 76/ 24 0,015 M phosphat & 0,3 % TBA hydroxyd	280	Dạng phân liều
Furosemid	C – 18	ACN/ Na acetat (pH 5,0) 40/60	254	Viên nén
Gentamicin	C – 18	ACN/ CH ₂ Cl ₂ / H ₂ O/ MeOH 80/ 10/ 8/ 4	230	Huyết thanh
Griseofulvin	Cyano	MeOH/ H ₂ O 40/ 60	254	Viên nén
Heptaminol	C – 8	ACN/ AcNa 0,05% chỉnh tới pH 6,1 45/ 55	338	Huyết thanh, nước tiểu
Heroin	C – 18	ACN/ phosphat 0,015 M 100/ 300 (pH 3,0)	135	Nước tiểu
Histamin	C – 18	NaCl 0,1 M/ MeOH 55/ 45 pH 3,0	350	Huyết tương
Hydrochlorothiazid	C – 18	MeOH/ AcOH 0,01 M. 15/ 85	228	Viên nén
Hydrocortison	Silica	CHCl ₃ / isooctan/ MeOH/ H ₂ O 48,5/ 48,5/ 2,9/ 0,12	254	Huyết tương

Tên thuốc	Cột	Pha động	Detector	Mẫu thử
Ibuprofen	C – 18	ACN/ AcOH 0,05 M 40/ 60	230	Huyết tương
Ketoprofen	C – 8	H ₂ O/ MeOH 85/ 15	255	Huyết tương
Ketoprofen	Silica	CH ₂ Cl ₂ / hexan 60/ 40	254	Huyết tương
Lidocain	Phenyl	ACN/ H ₃ PO ₄ 0,006% 30 / 70	200	Huyết tương
Methyldopa	C – 18	MeOH/ H ₂ O 14/ 86 Na octansulfonat 0,006 M, pH 6,4	GCE + 0,5 V	Huyết tương
Mebendasol	C – 18	ACN/ phosphat 0,05M (pH 6) 27/ 73	313	Huyết tương
Metronidazol	C – 18	ACN/ phosphat 10 ⁻⁵ M pH 4 8/ 92	322	Huyết tương, nước tiểu
Morphine	C – 18	MeOH/ NaH ₂ PO ₄ 60/ 40	254	Dạng tiêm
Acid Nalidixic	C – 18	MeOH/ H ₂ O 70/ 30	313	Huyết tương
Naphazolin Tetrahydrozolin	C – 18	MeOH/ đệm citrat pH 2,2 300/ 700	255	Huyết tương

3.2.5. Chuẩn hoá cột sắc ký lỏng hiệu năng cao

- **Mục đích:**

– Mục đích của việc chuẩn hoá này là để kiểm tra hiệu năng của các cột HPLC và để xác định một cách khách quan xem khi nào chúng cần phải thay thế.

– Tất cả các cột pha đảo (C₁₈, C₈) và các cột silica nói chung mới và cũ đều cần được chuẩn hoá.

Các thông số của cột HPLC cần chuẩn hoá :

+ *Hệ số dung lượng* : k'.

+ *Hiệu lực cột (số đĩa lý thuyết)* : N

+ *Hệ số đối xứng* : F

– Đối với các cột mới: Cần chuẩn hoá ngay khi mới nhận để khẳng định chất lượng của chúng.

– Đối với cột đang sử dụng: Nếu trong thời gian sử dụng, nhận thấy hình dạng của pic bị xấu hơn trước và hiệu lực của cột không thoả mãn cho việc phân tích thì nên chuẩn hoá lại cột và ghi ngày tháng thực hiện vào bảng theo dõi.

- **Chuẩn hoá cột sắc ký pha đảo**

- Chuẩn bị dung dịch các chất chuẩn:

Pha một hỗn hợp dung dịch các chất chuẩn trong methanol 60%(v/v) với các nồng độ như sau:

Uracil	0,02 mg/l
Phenol	1,00 mg/l
Anisol	1,50 mg/l

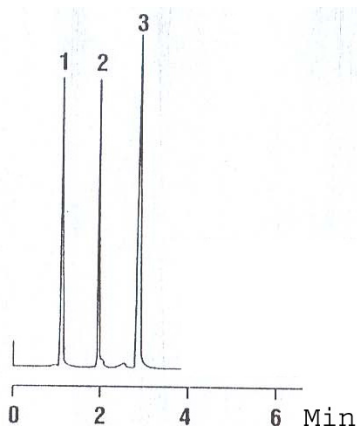
- Điều kiện sắc ký:

Pha động : methanol - nước (60 : 40)

Tốc độ dòng : 1ml/phút

Thể tích tiêm : 20 μ L

Detector : UV 254 nm



Hình 3.11: Sắc đồ tách hỗn hợp uracil, phenol, anisol.

1. Uracil 2. Phenol 3. Anisol

- **Tính toán:**

- Hệ số dung lượng (k')

$$k' = (t_A - t_0)/t_0$$

t_0 : thời gian lưu của uracil

t_A : thời gian lưu của anisol

- Hiệu lực cột (N)

$$N = 5,54 \cdot t_A^2 / W_{1/2}^2$$

t_A : thời gian lưu của anisol

$W_{1/2}$: chiều rộng pic đo ở nửa chiều cao của pic anisol

– Hệ số đối xứng (F)

$$F = W_A / 2a$$

Ở đây:

W_A : chiều rộng pic anisol đo ở 1/20 chiều cao pic

a: khoảng cách từ đường vuông góc hạ từ đỉnh pic đến mép đường cong phía trước của pic ở tại 1/20 chiều cao pic.

• **Chuẩn hoá cột sắc ký pha thuận**

– Chuẩn bị dung dịch: Hoà tan khoảng 0,1 – 0.2 ml n-pentan và 20mg acetophenon trong 100ml hexan có chứa 0,5%(v/v) methanol.

– Điều kiện sắc ký :

Pha động : hexan - methanol (99,5 : 0,5)

Tốc độ dòng : 1,0 ml/phút

Thể tích tiêm : 20 μ L

Detector : UV ở 254 nm

– Tính toán tương tự chuẩn hoá cột pha đảo .

Với:

t_{AC} : thời gian lưu của acetophenon

t_0 : thời gian lưu của n-pentan

$W_{1/2}$: chiều rộng pic đo ở nửa chiều cao của pic acetophenon

Bảng 3.6. Các tiêu chuẩn chấp nhận cho cột

	Cột mới	Cột đã sử dụng
Hệ số dung lượng (K')	$\approx 2,0$	$< 0,7$
Hiệu lực cột (N)	≈ 3000 đĩa lý thuyết hiện nay >10.000	≈ 1000 đĩa
Hệ số đối xứng (F)	0,9 – 2,0	0,9 – 2, 0

3.2.6. Định lượng bằng phương pháp HPLC

Quá trình định lượng bằng HPLC có thể chia thành 4 bước. Mỗi bước đều có ảnh hưởng trực tiếp đến kết quả định lượng. Các bước này là :

- Lấy mẫu thử
- Tiến hành sắc ký
- Đo tín hiệu detector
- Phương pháp định lượng

- **Lấy mẫu**

Sai số do lấy mẫu có thể tăng lên ở ít nhất 3 khâu: Lấy mẫu đại diện, bảo quản mẫu và xử lý mẫu.

Để giảm sai số, việc lấy mẫu phải tôn trọng triệt để các nguyên tắc đã được qui định đối với từng loại đối tượng mẫu để có thể lấy được đại diện.

Quá trình bảo quản mẫu cũng có thể dẫn đến sai số: Với mẫu thử là chất bay hơi, chất có thể phản ứng được với hơi nước hoặc không khí.

Các thành phần vi lượng có thể bị hấp phụ hoặc phản hấp phụ bởi bình chứa trong thời gian bảo quản.

Có thể tiến hành các phản ứng hoá học trên mẫu thử để tạo dẫn chất có độ nhạy cao hơn để có thể đo được bằng detector của máy. Cách này được áp dụng đối với những chất có đáp ứng rất nhỏ hoặc hoàn toàn không có đáp ứng với detector đo độ hấp thụ quang học.

- **Tiến hành tách sắc ký**

Quá trình chạy sắc ký cần chú ý:

Có thể xảy ra sự phân huỷ của chất thử trong khi phân tách.

Có thể xuất hiện pic lạ trên sắc đồ do dung môi dùng hoà tan mẫu thử có chứa tạp chất. Vì vậy cần phải kiểm tra bằng sắc ký các vết tạp đó.

– Chuẩn bị mẫu thử:

Dung môi dùng để hoà tan mẫu thử phải được xem xét cẩn thận. Lý tưởng nhất là dùng pha động làm dung môi để hoà tan nó.

Trừ trường hợp mẫu thử khó tan trong dung môi này thì phải tìm dung môi khác thích hợp hơn.

Dung môi phải đáp ứng các yêu cầu sau :

- + Độ tinh khiết cao để không có pic lạ,
- + Có thể hoà lẫn được với dung môi rửa giải (pha động),
- + Cho đáp ứng rất nhỏ với detector,
- + Dung môi và dung dịch thử phải được lọc qua màng lọc 0,45µm.

– Tiêm mẫu: Có 2 cách tiêm mẫu vào cột:

- + Dùng bơm tiêm và
- + Van tiêm mẫu thể tích xác định.

Dùng van tiêm mẫu cho kết quả chính xác hơn ($\pm 1\%$) so với dùng bơm tiêm ($\pm 1 - 2\%$).

- **Đo tín hiệu detector**

Detector được dùng phổ biến nhất trong HPLC là detector UV-VIS.

- Detector sử dụng phải đáp ứng một số yêu cầu sau :
 - + Hoạt động được ở vùng tuyến tính của nó,
 - + Có độ hấp thụ nhỏ đối với dung môi (độ nhiễu đường nền thấp),
 - + Tránh lọt không khí vào cột và detector,
 - + Giữ sạch cell và làm sạch nó thường xuyên.
- Tín hiệu detector:

Tín hiệu detector đo được khi chất ra khỏi cột sắc ký được máy ghi lại dưới dạng pic.

Ở máy sắc ký cổ điển, việc đo diện tích hoặc chiều cao pic được thực hiện bằng tay. Còn ở các máy sắc ký hiện đại việc đo đạc này được tự động hoá nhờ máy tích phân, máy tính.

3.2.7. Các phương pháp định lượng

Tất cả các phương pháp định lượng bằng sắc ký đều dựa trên nguyên tắc: Nồng độ của chất tỷ lệ với chiều cao hoặc diện tích pic của nó.

Có 4 phương pháp định lượng được sử dụng trong sắc ký :

- **Phương pháp chuẩn ngoại (External Standard)**

Phương pháp chuẩn ngoại là phương pháp định lượng cơ bản, trong đó cả 2 mẫu chuẩn và thử đều được tiên hành sắc ký trong cùng điều kiện.

So sánh diện tích (hoặc chiều cao) pic của mẫu thử với diện tích (hoặc chiều cao) pic của mẫu chuẩn sẽ tính được nồng độ của các chất trong mẫu thử.

Có thể sử dụng phương pháp chuẩn hoá 1 điểm hoặc nhiều điểm.

* *Chuẩn hoá 1 điểm*: Chọn nồng độ của mẫu chuẩn xấp xỉ với nồng độ của mẫu thử.

Tính nồng độ mẫu thử theo công thức:

$$c_X = C_S \frac{S_X}{S_S}$$

Ở đây:

C_X : nồng độ mẫu thử

C_S : nồng độ chất chuẩn

S_X (H_X): diện tích (chiều cao) của pic mẫu thử

S_S (H_S): diện tích (chiều cao) của pic mẫu chuẩn

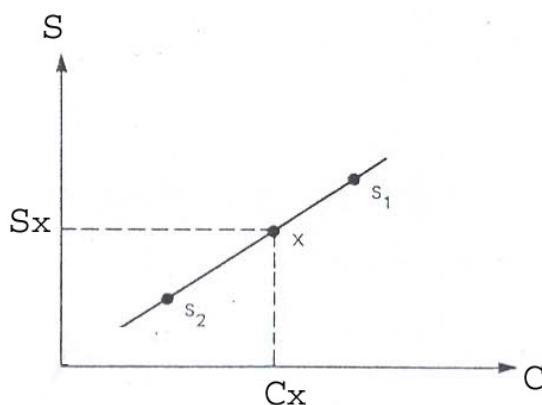
* *Chuẩn hoá nhiều điểm*: Tiến hành qua các bước sau :

Chuẩn bị một dãy chuẩn với các nồng độ tăng dần rồi tiến hành sắc ký. Các đáp ứng thu được là các diện tích hoặc chiều cao pic ở mỗi điểm chuẩn.

Vẽ đồ thị chuẩn biểu diễn sự tương quan giữa diện tích S (hoặc chiều cao H) pic với nồng độ của chất chuẩn (C), xem hình 3.12.

Sử dụng đoạn tuyến tính của đường chuẩn để tính toán nồng độ của chất cần xác định. Có thể thực hiện việc tính toán này theo 2 cách :

- Áp dữ kiện diện tích (hoặc chiều cao) pic của chất thử vào đường chuẩn sẽ suy ra được nồng độ của nó .



Hình 3.12. Đồ thị phương pháp chuẩn ngoại

+ Xây dựng phương trình hồi qui tuyến tính mô tả quan hệ giữa diện tích (hoặc chiều cao) pic với nồng độ của chất cần xác định.

$$Y = a + bC_x \quad 3.25$$

Trong đó :

Y: Diện tích pic

a : Giao điểm của đường chuẩn với trục tung.

b : Độ dốc của đường chuẩn.

C_x : Nồng độ của chất thử .

Dựa vào phương trình hồi quy này ta tính được nồng độ chất thử .

$$C_x = \frac{\hat{Y} - a}{b} \quad 3.26$$

Chú ý : Độ lớn của diện tích (hoặc chiều cao) pic mẫu thử phải nằm trong đoạn tuyến tính của đường chuẩn.

• **Phương pháp chuẩn nội (Internal standard).**

Trong định lượng bằng phương pháp sắc ký, điện di nói chung cũng như HPLC nói riêng, phương pháp chuẩn ngoại (ESTD) tỏ ra có nhiều nhược điểm trong phân tích các mẫu phải xử lý phức tạp (chiết tách...) và đặc biệt là các mẫu vừa phức tạp vừa có hàm lượng thấp của chất cần định lượng. Ví dụ như các mẫu huyết tương trong nghiên cứu dược động học. Phương pháp chuẩn nội (ISTD) giúp khắc phục được những nhược điểm trên của ESTD. Ngoài ra, nó còn có thể giúp cực tiểu hóa được những sai số gây nên do máy móc và kỹ thuật.

Kỹ thuật chuẩn nội có thể được tóm tắt như sau: Người ta thêm vào cả mẫu chuẩn lẫn mẫu thử những lượng bằng nhau của một chất tinh khiết, rồi tiến hành sắc ký trong cùng điều kiện. Chất được thêm này gọi là chuẩn nội.

Từ những dữ kiện về: diện tích (hoặc chiều cao) pic và lượng (hoặc nồng độ) của chuẩn, chuẩn nội và mẫu thử, có thể xác định được hàm lượng của thành phần cần định lượng trong mẫu thử một cách chính xác.

Có một số yêu cầu đặt ra với chất chuẩn nội:

- Trong cùng điều kiện sắc ký, chất chuẩn nội phải được tách hoàn toàn và có thời gian lưu gần với thời gian lưu của chất cần phân tích trong mẫu thử .
- Có cấu trúc hoá học tương tự như chất thử .
- Có nồng độ xấp xỉ với nồng độ của chất thử .
- Không phản ứng với bất kỳ thành phần nào của mẫu thử .
- Phải có độ tinh khiết cao và dễ kiểm .

Vì rằng đáp ứng (response) của chất chuẩn và chuẩn nội với detector không cùng độ nhạy, nên trước hết cần phải xác định hệ số đáp ứng (response factors) để hiệu chỉnh trong tính kết quả.

* *Xác định hệ số đáp ứng F_x :*

Chuẩn bị một hỗn hợp có chứa những lượng (hoặc nồng độ) đã biết của chất chuẩn và chuẩn nội rồi chạy sắc ký. Sắc đồ thu được sẽ cho ta biết các dữ liệu về diện tích của các pic.

Trong phương pháp chuẩn nội, người ta thấy có mối tương quan giữa tỷ số của khối lượng (hoặc nồng độ) của chuẩn và chuẩn nội với tỷ số diện tích của 2 pic. Và hệ số đáp ứng được tính theo phương trình sau:

Tính theo nồng độ ta có:

$$F_x = \frac{m_C}{m_{IS}} \cdot \frac{S_C}{S_{IS}} = \frac{m_C \cdot S_{IS}}{m_{IS} \cdot S_C} \quad (3.27)$$

$$F_x = \frac{C_C \cdot S_{IS}}{C_{IS} \cdot S_C} \quad (3.28)$$

Ở đây:

- m_C, m_{IS} lần lượt là khối lượng của chất chuẩn và chuẩn nội.
- C_C, C_{IS} lần lượt là nồng độ của chuẩn và chuẩn nội.
- S_C, S_{IS} lần lượt là diện tích pic chuẩn và chuẩn nội.

Các sai số sẽ được cực tiểu hóa nếu hệ số F_X xấp xỉ đơn vị, có nghĩa là chất chuẩn và chuẩn nội có cùng đáp ứng với detector. Tuy nhiên trong thực tế điều này thường khó đạt được hoàn hảo.

* *Định lượng thành phần trong mẫu thử.*

- Phương pháp chuẩn 1 điểm: Chuẩn nội được thêm vào cả hai, mẫu chuẩn và mẫu thử, rồi tiến hành sắc ký.

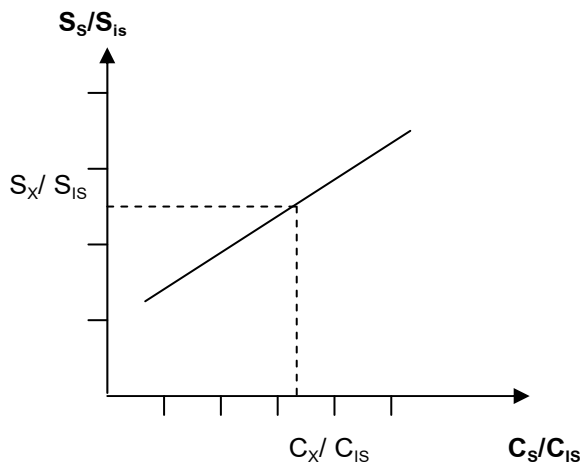
Lượng hoặc nồng độ của thành phần trong mẫu thử được tính như sau:

$$m_T = \frac{S_T}{S_{IS}} m_{IS} F_X \quad (3.29)$$

Tính theo nồng độ ta có:

$$C_T = \frac{S_T}{S_{IS}} C_{IS} F_X \quad (3.30)$$

- Phương pháp chuẩn hóa nhiều điểm: Chuẩn bị một dãy chuẩn có chứa những lượng (hoặc nồng độ) chất chuẩn khác nhau nhưng tất cả cùng chứa một lượng (hoặc nồng độ) chuẩn nội. Sau khi sắc ký và thu được các dữ kiện diện tích, tiến hành vẽ đường chuẩn (hình 3.13.) biểu diễn sự tương quan giữa tỷ số diện tích (hoặc chiều cao) pic của chuẩn trên chuẩn nội (S_S/S_{IS}) với tỷ số của nồng độ chuẩn ngoại trên chuẩn nội (C_S/C_{IS}).



Hình 3.13. Phương pháp đường chuẩn sử dụng chuẩn nội

Song song tiến hành sắc ký mẫu thử cũng được thêm chuẩn nội với lượng (hoặc nồng độ) như thang chuẩn.

Tính tỷ số diện tích (hoặc chiều cao) pic của chất thử trên diện tích (hoặc chiều cao) pic chuẩn nội (S_T/S_{is}) rồi dựa vào đường chuẩn sẽ tìm được nồng độ của chất thử (C_T).

- **Phương pháp thêm chuẩn (Standard addition)**

Kỹ thuật này phối hợp phương pháp chuẩn ngoại và chuẩn nội.

Ưu điểm của kỹ thuật thêm chuẩn là có độ chính xác cao vì nó loại trừ được sai số do các yếu tố ảnh hưởng, đặc biệt là ảnh hưởng của quá trình xử lý mẫu (chiết xuất, tinh chế các chất từ các dạng bào chế...)

Kỹ thuật so sánh tiến hành như sau:

Xử lý mẫu thử rồi tiến hành sắc ký.

Thêm vào mẫu thử những lượng đã biết của các chất chuẩn tương ứng với các thành phần có trong mẫu thử rồi lại tiến hành xử lý mẫu và sắc ký trong cùng điều kiện. Nồng độ chưa biết C_X của mẫu thử được tính dựa vào sự chênh lệch nồng độ ΔC (lượng chất chuẩn thêm vào) và sự tăng của diện tích (hoặc chiều cao) pic ΔS theo công thức:

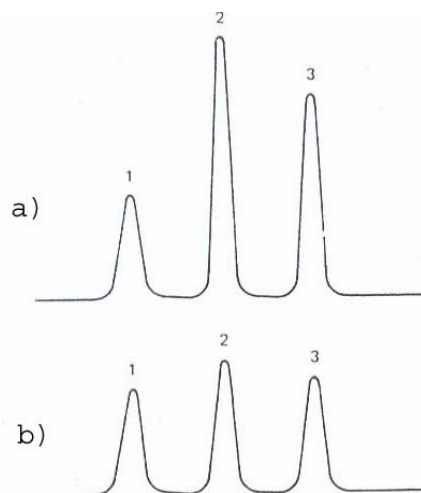
$$c_x = S_x \frac{\Delta C}{\Delta S}$$

Có thể tính toán nồng độ C_X của mẫu thử theo một cách khác:

Tiến hành sắc ký một mẫu thử và mẫu thử đã được thêm chuẩn như trên.

Sử dụng một pic không muốn định lượng của mẫu thử như là một chuẩn nội.

Thí dụ: Tiến hành sắc ký một mẫu thử có 3 thành phần, thu được sắc đồ (a), sắc đồ này có 3 pic được đánh số là 1; 2 và 3. Giả sử không muốn định lượng thành phần thứ nhất. Để định lượng thành phần thứ hai và ba, chúng ta thêm những lượng đã biết của hai thành phần này vào hỗn hợp rồi tiến hành sắc ký lại, thu được sắc đồ (Hình 3.14).



Hình 3.14: Sắc đồ định lượng, phối hợp phương pháp chuẩn ngoại và nội.

Bằng cách sử dụng pic không muốn xác định của mẫu thử như là một chuẩn nội trong phương pháp thêm này, chúng ta sẽ cực tiểu hoá được các sai số gây nên trong quá trình định lượng như đã trình bày ở trên.

Trong trường hợp mẫu thử không chứa pic không muốn xác định thì có thể thêm một chất chuẩn nội vào mẫu thử rồi tiến hành phân tích như trên.

Tính kết quả: Dựa vào diện tích pic (S) hoặc chiều cao (h).

Tính nồng độ của thành phần thứ hai:

$$R_a = S_{2a}/S_{1a} \text{ (ở sắc đồ a)}$$

$$R_b = S_{2b}/S_{1b} \text{ (ở sắc đồ b)}$$

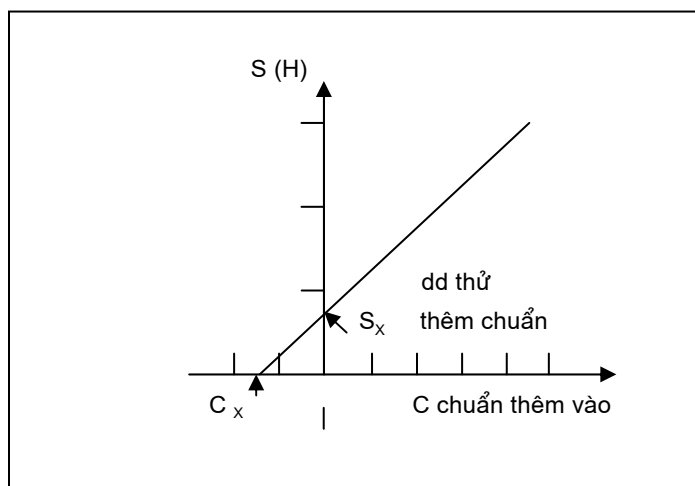
$$R_{\text{thêm}} = R_b - R_a$$

$$Y_{\text{thử}} = (Y_{\text{thêm}}) \cdot (R_a)/R_{\text{thêm}}$$

Nồng độ của thành phần thứ ba: Cách tính tương tự .

• **Kỹ thuật thêm đường chuẩn:**

Nguyên tắc: Chuẩn bị một dãy hỗn hợp gồm các lượng mẫu thử giống nhau và các chất chuẩn (tương ứng với các thành phần cần xác định) với lượng tăng dần. Xử lý mẫu rồi tiến hành sắc ký. Dựng đường chuẩn tương quan giữa diện tích (S) hoặc chiều cao (H) của pic tổng (thử + chuẩn) với lượng hoặc nồng độ của chất chuẩn thêm (ΔC). Giao điểm của đường chuẩn kéo dài với trục hoành chính là nồng độ của chất cần xác định.



Hình 3.15: Đồ thị phương pháp thêm đường chuẩn

• **Phương pháp chuẩn hoá diện tích (Area Normalization)**

Nguyên tắc: Hàm lượng phần trăm của một chất trong hỗn hợp nhiều thành phần được tính bằng tỷ lệ phần trăm diện tích pic của nó so với tổng diện tích của tất cả các pic thành phần trên sắc đồ.

Phương pháp này yêu cầu tất cả các thành phần đều được rửa giải và được phát hiện.

Tất cả các thành phần đều có đáp ứng detector (response) như nhau.

Kỹ thuật này được sử dụng nhiều trong sắc ký khí vì thường có đáp ứng như nhau ở detector ion hoá ngọn lửa (FID).

Trong khi đó lợi ích của kỹ thuật này trong HPLC bị hạn chế vì đáp ứng như nhau là điều thiếu chắc chắn.

Ví dụ :

Phân tách sắc ký một hỗn hợp gồm 3 thành phần : X, Y, Z.

Hàm lượng phần trăm của X được tính như sau :

$$\% X = \frac{S_X \cdot 100}{S_X + S_Y + S_Z} = \frac{S_X \cdot 100}{\sum_{i=1}^n S_i}$$

Trong phương pháp trên nếu xét đến đáp ứng khác nhau của detector thì cần phải xác định các hệ số đáp ứng đối với mỗi chất để hiệu chỉnh sự sai khác đó.

Hệ số đáp liên hệ với chất chuẩn theo công thức:

$$F_X = \frac{S_S \cdot C_X \cdot f_S}{S_X \cdot C_S}$$

Ở đây:

S_S và S_X : diện tích của pic chuẩn và pic thử

C_S và C_X : nồng độ của chất chuẩn và chất thử

f_S : hệ số hiệu chỉnh của chuẩn.

Phương trình tính hàm lượng % của X sẽ là:

$$\% X = \frac{S_X \cdot F_X \cdot 100}{S_X F_X + S_Y F_Y + S_Z F_Z}$$

Trong một số trường hợp có thể ứng dụng phương pháp chuẩn hoá diện tích pic để định lượng các tạp chất trong thuốc.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Trần Tử An, Nguyễn Văn Tuyên (1984). Bài giảng kiểm nghiệm độc chất. NXB Y học. Tr. 85 - 90
2. Dược điển Việt Nam III . Phụ lục 3 , 4 . PL . 75 - PL. 85 .
3. Phạm Gia Huệ, Trần Tử An (1998). Hoá Phân tích II. Đại học Dược Hà Nội. Tr. 4-32; 55 – 104.
4. Viện kiểm nghiệm (1995). Tập huấn kỹ thuật kiểm nghiệm thuốc bằng phương pháp phân tích dụng cụ. Tr. .28 – 30.
5. B.P 2001. Appendix II, Appendix III. A 130 - A.145
6. Bureau of food and drugs (1998). Training course on drug and cosmetic quality control. BFAD. Philippines . P.p. 95 – 107.
7. European Pharmacopoeia (1997). P. p. 25 – 32
8. Indian Pharmacopoeia 1996. P.p .A.72 – A77
9. Johnson E. and Stevenson R. (1978). Basic liquid chromatography. Copyright by Varian Associates.
10. Munson J.W. (1984). High - performance Liquid Chromatography: Instrumentation and pharmaceutical applications in pharmaceutical analysis. Marcel Dekker Inc. P.p. 16 - 136.
11. Pharmacopoeia of the people's Republic of China 1977. P.p. A16 - A19.
12. Skoog D.A. - West D.M. West, Holler F.J (1988). Fundamentals of Analytical Chemistry 5th. ed. Saunders college Publishing. P.p. 557 - 598.
13. U.S.P. 24 . P.p. 1920 - 1924; 1992 - 1997.

CÂU HỎI TỰ LƯỢNG GIÁ

- 3.1. a/. Một dung dịch của một chất thuốc có nồng độ $6,4 \cdot 10^{-5}$ M, đo độ hấp thụ của dung dịch này ở bước sóng 255 nm, dùng cuvet 1cm thu được mật độ quang $A = 0,847$.
- Tính hệ số hấp thụ phân tử ϵ của chất ở 255 nm ?
- b/. Cân chính xác 10,0 mg của thuốc nói trên (có phân tử lượng M_w 200,0), đem hoà tan trong nước vừa đủ 1 lít. Đo độ hấp thụ ở λ 255nm với cuvet 1cm được $A = 0,556$.

Hãy tính độ tinh khiết của mẫu thuốc.

Đáp số: a/. $\epsilon = 1,32 \cdot 10^4$

b/. 84,2%

3.2. Poldin methylsulfat có cực đại hấp thụ ở 257 nm. Chuẩn bị 5 dung dịch của nó trong methanol với nồng độ dưới đây và đo độ hấp thụ của mỗi dung dịch ở $\lambda = 257\text{nm}$, cuvet 1cm.

a/ Hệ này có tuân theo định luật Lambert-Beer không ?

b/ Tính $A_{1\text{cm}}^{1\%}$ ở 257 nm.

c/ Tính hệ số hấp thụ phân tử ϵ . Biết Mw của poldin sulfat là 451.

C(mg/ml)	A_{257}
0,1	0,105
0,2	0,207
0,3	0,318
0,4	0,420
0,5	0,529

d/ Hoà tan 50,0mg Poldin methylsulfat trong methanol trong một bình định mức dung tích 1 lít, thêm methanol tới vạch. Đo độ hấp thụ của dung dịch này ở $\lambda 257\text{nm}$, dùng cuvet 2 cm, được $A = 0,946$. Giả thiết rằng những tạp chất có mặt không hấp thụ ánh sáng ở bước sóng này.

Hãy tính % độ tinh khiết của mẫu thử.

Đáp số : b/ $A_{1\text{cm}}^{1\%} = 10,5$; c/ $\epsilon = 474$; d/ 90,2%

3.3. Tolbutamid có Mw 270,4; $\epsilon = 703$ ở 262 nm. Nếu một viên nén tolbutamid được hoà tan trong nước và hoà loãng tới đủ 2500ml thì độ hấp thụ của nó $A = 0,520$ ở 262 nm, cuvet 1cm.

Hãy tính hàm lượng của tolbutamid trong viên ?

Đáp số : 500mg

3.4. Sự hình thành phổ huỳnh quang và ứng dụng của phương pháp phổ huỳnh quang trong phân tích ?

3.5. Ứng dụng quang phổ hồng ngoại trong định tính các chất hữu cơ ?

3.6. Tính nồng độ của dung dịch Vitamin B₁₂ biết rằng khi pha loãng 200 lần và đo độ hấp thụ ở 361 nm được $A = 0,450$. Cho $A(1\%, 1\text{cm})$ của B₁₂ ở 361nm = 207.

3.7. Sắc ký pha thuận và pha đảo là gì ?

Cho ví dụ về pha tĩnh và pha động dùng trong sắc ký pha thuận và pha đảo.

3.8. Thời gian lưu tương đối của codein, heroin, methadon, morphin và propoxyphen là: 1,00; 1,89; 0,55; 1,16 và 5,90.

Biết t_R của codein là 6 phút. Tính thời gian lưu của các chất khác?

3.9. Dữ kiện sau thu được bằng sắc ký trên cột dài 40cm.

Tên chất	t_R (phút)	$W_{1/2}$ (phút)
Chất không lưu giữ	1,9	-
A	10,0	0,76
B	10,9	0,82
C	13,4	1,06

Hãy tính :

a/. Số đĩa lý thuyết trung bình của cột ?

b/. Chiều cao của đĩa ?

c/. Độ phân giải cho:

+ B và A

+ B và C

+ A và C

3.10. Cho cột sắc ký dài 30 cm. Khi chạy sắc ký tách hỗn hợp 2 chất thu được kết quả:

Chất	t_R (phút)	Chiều rộng đáy pic W (phút)
Chất không lưu giữ	1,30	-
A	16,40	1,11
B	17,63	1,21

Hãy tính :

Độ phân giải của cột

Số đĩa lý thuyết trung bình của cột, chiều cao đĩa.

Nếu chúng ta muốn độ phân giải trong tách 2 chất A và B là $R_{S(m)} = 1,5$ thì:

a/. Yêu cầu cột phải có số đĩa lý thuyết là bao nhiêu ?

b/. Nếu không thay đổi 2 pha, chiều dài cột sẽ phải là bao nhiêu ?

3.11. Khi chạy sắc ký một hỗn hợp 2 chất A và B thu được thời gian lưu lần lượt là: 10,0 và 10,9 trên cột dài 40cm. Một chất không lưu giữ qua cột ở 1,9 phút.

Chiều rộng đáy pic của A và B là 1,52phút và 1,64 phút.

Cho biết thể tích pha tĩnh $V_S = 19,6\text{ml}$ và thể tích pha động $V_M = 62,6\text{ml}$.

Hãy tính :

a/. Hệ số dung lượng k' cho mỗi chất ?

b/. Hệ số phân bố cho mỗi chất ?

c/. Hệ số chọn lọc cho A và B ?

- 3.12. Hãy so sánh sắc ký lỏng hiệu năng cao với sắc ký cột cổ điển ?
- 3.13. Trình bày về sự khác nhau giữa sắc ký trao đổi ion và sắc ký loại cỡ (sắc ký trên gel) ?
- 3.14. Hãy trình bày về các loại bơm sử dụng trong HPLC, ưu, nhược điểm của mỗi loại ?
- 3.15. Nguyên tắc hoạt động của detector dẫn nhiệt và ion hoá ngọn lửa ?
- 3.16. Hãy trình bày về phương pháp sử dụng chuẩn nội trong định lượng bằng sắc ký lỏng hiệu năng cao ?
- 3.17. Hãy nói về phương pháp thêm chuẩn trong định lượng bằng HPLC ?

Chương 4.

KIỂM NGHIỆM THUỐC BẰNG PHƯƠNG PHÁP SINH HỌC

MỤC TIÊU HỌC TẬP

1. *Viết được những đặc điểm cơ bản về hình thái, tính chất nuôi cấy của vi khuẩn, nấm mốc, nấm men để áp dụng trong thử nghiệm vi sinh vật.*
2. *Biết phương pháp làm một môi trường nuôi cấy vi sinh vật và nêu được các phương pháp tiệt trùng.*
3. *Trình bày được mục đích, nguyên tắc, phương pháp thử vô trùng và đếm số lượng vi sinh vật trong 1 gam (1 ml) dược phẩm.*
 - *Nêu được vai trò của phương pháp sinh học trong kiểm nghiệm chất kháng sinh, và trình bày được thử nghiệm định lượng chất kháng sinh bằng phương pháp khuếch tán.*

4.1. MỞ ĐẦU

Trong ngành Dược có nhiều phương pháp khác nhau để kiểm tra chất lượng của thuốc như phương pháp hoá học, phương pháp vật lý, phương pháp sinh học.

Phương pháp hoá, lý tiến hành nhanh chính xác nhưng chỉ áp dụng được với các chất có thành phần hoá học đã biết và không đánh giá được bản chất sinh học của một dược phẩm. Để xác định các đặc tính sinh học theo yêu cầu của một số dược phẩm như: hoạt lực tác dụng của chất kháng sinh, sự vô trùng, độ nhiễm khuẩn, độc tính bất thường của một số loại thuốc, hay hiệu lực và tính an toàn của các vaccin ... người ta phải dùng phương pháp sinh học.

4.1.1. Nguyên tắc

Phương pháp sinh học dựa trên nguyên tắc:

So sánh hiệu lực tác dụng hoặc các đặc tính riêng của chất thử với chất chuẩn tương ứng trong cùng một điều kiện và thời gian thí nghiệm.

Trong lĩnh vực kiểm nghiệm thuốc, hai loại thử nghiệm sinh học được áp dụng nhiều nhất là:

- Kiểm nghiệm thuốc bằng các phương pháp thử trên động vật.
- Kiểm nghiệm thuốc bằng các thử nghiệm vi sinh vật.

4.1.2. Chất chuẩn

Trong thử nghiệm sinh học chất chuẩn là một yếu tố quan trọng để đánh giá chất lượng chất thử. Chất chuẩn được chia làm hai loại:

- *Chất chuẩn gốc*: là những chất đồng nhất có độ tinh khiết cao. Chất chuẩn gốc thường được làm ở các viện nghiên cứu quốc gia hoặc quốc tế riêng về chất chuẩn sinh học.
- *Chất chuẩn thứ cấp*: cũng là chất có độ tinh khiết cao, có hoạt tính sinh học được xác định theo chất chuẩn gốc quốc tế tương ứng.

Chất chuẩn phải được bảo quản trong các ống thủy tinh ở nhiệt độ thích hợp tùy theo mẫu (thường ở nhiệt độ $< 5^{\circ}\text{C}$) trong điều kiện khô, tránh ánh sáng.

4.1.3. Đánh giá kết quả

Thử nghiệm sinh học thường có thời gian thí nghiệm kéo dài và phụ thuộc vào nhiều yếu tố như tính chất đáp ứng của sinh vật thí nghiệm, người làm thí nghiệm, các điều kiện thử nghiệm. Các yếu tố này thường không ổn định. Vì vậy kết quả thử nghiệm sinh học phải được đánh giá bằng toán thống kê. Độ chính xác của phép thử được thể hiện bằng giới hạn tin cậy.

4.2. KIỂM NGHIỆM THUỐC BẰNG PHƯƠNG PHÁP THỬ TRÊN ĐỘNG VẬT

4.2.1. Nguyên tắc

Kiểm nghiệm thuốc bằng các phép thử trên động vật dựa trên sự đáp ứng của động vật thí nghiệm đối với các chế phẩm được đưa vào cơ thể một liều lượng theo quy định của từng thí nghiệm để đánh giá chất lượng của chế phẩm cần thử.

4.2.2. Động vật thí nghiệm

Động vật dùng trong thí nghiệm phải đồng đều, thuần khiết về nòi giống, khoẻ mạnh không nhiễm bệnh, không có thai và được nuôi dưỡng đầy đủ. Mỗi thí nghiệm có nhu cầu khác nhau về giống, trọng lượng, tuổi của động vật. Chất lượng của động vật quyết định độ chính xác của phép thử.

4.2.3. Thử *in vivo* và *in vitro*

- Thử nghiệm được thực hiện trên cơ thể động vật sống gọi là thử *in vivo*. Người ta dựa trên các thông số như nhiệt độ cơ thể, nhịp tim, điện tâm đồ, điện não đồ, sự thay đổi huyết áp, phản xạ hệ thần kinh hoặc tỷ lệ sống, chết của động vật thí nghiệm... để đánh giá tác dụng và chất lượng của thuốc.
- Phép thử có thể được tiến hành trên các cơ quan cô lập của động vật, như tim, tử cung, ruột, máu... gọi là thử *in vitro*.

4.2.4. Liều (Dose)

Liều là lượng chế phẩm thử đưa vào cơ thể động vật một lần cho từng mục đích thí nghiệm. Ví dụ: Liều LD₀, LD₅₀, LD₁₀₀, MLD, liều thử chất hạ áp, liều thử chất gây sốt.

4.2.5. Các thử nghiệm trên động vật được áp dụng trong kiểm nghiệm thuốc

Trong các dược điển thường có các thử nghiệm sau đây được thực hiện bằng các phép thử trên động vật như:

- Thử độc tính bất thường
- Thử chất hạ huyết áp
- Thử chất gây sốt
- Định lượng các hormon: gonadorelin, corticotrophin, insulin, oxytocin, menotrophin, ...
- Kiểm tra tính an toàn của vaccin và sinh phẩm.
- Xác định hiệu lực của các vaccin và antitoxin.

4.3. KIỂM NGHIỆM THUỐC BẰNG CÁC PHÉP THỬ VI SINH VẬT

4.3.1. Đại cương về vi sinh vật

Vi sinh vật là những cơ thể sống có kích thước rất nhỏ mà mắt thường không thể nhìn thấy được. Nếu cần quan sát hình dạng của chúng phải dùng kính hiển vi. Trong tự nhiên, vi sinh vật tồn tại rất phong phú và đa dạng, chúng đóng vai trò tích cực vào vòng tuần hoàn vật chất. Nhiều loại vi sinh vật được ứng dụng trong các lĩnh vực y tế, công nghiệp, nông nghiệp như các vi sinh vật có khả năng lên men rượu, sinh tổng hợp kháng sinh, vitamin, acid amin, vi sinh vật cố định đạm ở thực vật...

Trong quá trình hoạt động sống, bên cạnh những đặc tính có ích, vi sinh vật cũng gây nhiều tác hại cho người, động vật, thực vật như: làm biến đổi chất lượng thuốc, hỏng thực phẩm, một số có khả năng gây bệnh hoặc sinh độc tố có hại.

Để phục vụ cho việc kiểm nghiệm thuốc bằng các thử nghiệm vi sinh vật, ta cần tìm hiểu một số đặc điểm chính của hai nhóm vi sinh vật là vi khuẩn và vi nấm.

4.3.1.1. Vi khuẩn (*Bacteria*)

• Đặc điểm:

Vi khuẩn là những vi sinh vật đơn bào có cấu tạo tế bào tiền nhân (Prokaryote), có kích thước rất nhỏ. Đường kính tế bào phần lớn thay đổi trong khoảng 0,2 → 2,0μm, chiều dài từ 2 - 8μm. Vi khuẩn có nhiều hình dạng khác nhau, như hình cầu, hình que, xoắn, dấu phẩy. Vi khuẩn chỉ sinh sản vô tính,

một số tạo bào tử. Mỗi tế bào vi khuẩn chỉ có một bào tử. Một số vi khuẩn có khả năng di động nhờ sự có mặt của một hoặc nhiều lông (*flagella*).

- **Phân loại:**

Việc phân loại vi khuẩn rất phức tạp, phải dựa vào nhiều đặc điểm, hình thái, sinh lý, sinh hoá để chia vi khuẩn thành các họ, chi, loài khác nhau. Với mục đích phục vụ cho công tác kiểm nghiệm thuốc, ta không đi sâu vào nghiên cứu phân loại, nhưng cần tìm hiểu vi khuẩn, theo các nhóm dựa trên hình thể, tính chất bắt màu thuốc nhuộm Gram và khả năng hô hấp của chúng.

- Theo hình thể:

- + Cầu khuẩn (*Coccus*): Vi khuẩn hình cầu có thể đứng riêng rẽ (*Micrococcus*), thành từng đám (*Staphylococcus*), hoặc chuỗi (*Streptococcus*), hay xếp thành từng đôi (*Diplococcus*).
- + Trục khuẩn (*Bacillus*): Vi khuẩn hình que ngắn đứng riêng lẻ hay thành chuỗi (*Bacillus anthracis*) hoặc hình que hai đầu tròn (*Escherichia coli*).
- + Xoắn khuẩn (*Spirillum*): Vi khuẩn hình lò xo như: *Treponema Pallidum*.
- + Phẩy khuẩn (*Vibrio*): Vi khuẩn hình dấu phẩy như *Vibrio cholerae*.

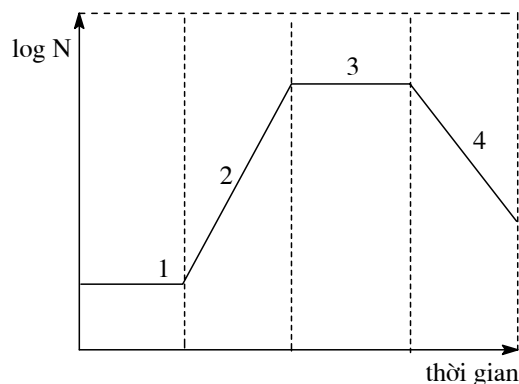
- Theo tính chất bắt màu thuốc nhuộm Gram.

- + Vi khuẩn có màu tím sau khi nhuộm Gram: Vi khuẩn Gram +
- + Vi khuẩn có màu đỏ sau khi nhuộm Gram: Vi khuẩn Gram –

- Theo đặc tính của quá trình hô hấp:

- + Sử dụng oxy tự do trong quá trình hô hấp: Vi khuẩn hiếu khí.
- + Phát triển được cả trong điều kiện hiếu khí và kỵ khí, có quá trình hô hấp nitrat: vi khuẩn kỵ khí không bắt buộc.
- + Chỉ sống trong điều kiện kỵ khí, có quá trình hô hấp sulfat: Vi khuẩn kỵ khí bắt buộc.

- **Sinh sản của vi khuẩn:**



Hình 4.1: Đường cong sinh trưởng của vi khuẩn

- Vi khuẩn sinh sản bằng cách phân đôi tế bào. Sự phân chia tế bào xảy ra rất nhanh. Trong điều kiện môi trường thích hợp và không có các yếu tố kìm hãm thì một tế bào vi khuẩn sau 6 giờ có thể sinh ra 250.000 tế bào mới. Tuy nhiên, sự nhân lên của vi khuẩn không phải là vô tận, nó còn phụ thuộc vào nhiều yếu tố. Trong môi trường nuôi cấy, sự sinh sản của vi khuẩn sau một thời gian nhất định sẽ bị ngừng lại vì nhiều nguyên nhân như: thức ăn bị hết dần, hoặc vi khuẩn có thể tiết ra những chất kìm hãm sự phát triển của chúng.
- Tốc độ phát triển của vi khuẩn trong môi trường nuôi cấy tĩnh thay đổi theo thời gian và tuân theo một quy luật nhất định bao gồm 4 pha: Pha lag, pha logarit, pha ổn định và pha tử vong (Hình 4.1).
- Sự phát triển của vi khuẩn trong môi trường lỏng có thể quan sát sau khoảng 18 - 24 giờ nuôi cấy. Chúng có thể làm đục môi trường, tạo vầng trên bề mặt hoặc lắng cặn ở đáy ống nghiệm.
- Trên các môi trường đặc, khuẩn lạc của các vi khuẩn thường nhỏ hơn khuẩn lạc của vi nấm, bề mặt nhẵn, bóng, ướt hoặc nhăn nheo, ... Khuẩn lạc của vi khuẩn tạo sắc tố với các màu như: trắng (*Staphylococcus albus*), vàng (*Staphylococcus aureus*), hồng (*Micrococcus*), xanh (*Pseudomonas aeruginosa*), ... Mỗi vi khuẩn có đặc tính riêng về hình dạng, kích thước, màu sắc khuẩn lạc. Các đặc tính này giúp cho việc xác định vi khuẩn trong quá trình kiểm nghiệm được phẩm.

4.3.1.2. Vi nấm (Microfungi)

- *Đặc điểm:*

Vi nấm có cấu tạo tế bào nhân thật (*Eucaryote*). Tế bào vi nấm rất nhỏ. Muốn quan sát cần dùng kính hiển vi. Nấm không có chất diệp lục, sống hoại sinh hoặc ký sinh, sinh sản vô tính hoặc hữu tính.

Vi nấm bao gồm hai loại là nấm men và nấm mốc. Trong kiểm nghiệm vi sinh vật, cần phát hiện hai loại này có trong dược phẩm.

- *Nấm men (Yeast):*

- Nấm men có cấu tạo đơn bào, sinh sản chủ yếu bằng nảy chồi. Tế bào nấm men có kích thước, hình dạng khác nhau tùy loài. Chúng có thể hình cầu, bầu dục, hình quả chanh, hình ống...
- Khuẩn lạc nấm men bao gồm nhiều cá thể thường thuộc một loài phát triển từ một cá thể mẹ tạo thành một khối. Khuẩn lạc nấm men thường to hơn khuẩn lạc vi khuẩn, bề mặt có nếp nhăn hoặc trơn nhẵn, không tạo sợi.
- Nấm men được sử dụng nhiều trong công nghiệp thực phẩm như làm bánh mì, bia, rượu... Nhưng nhiều nấm men gây bệnh hoặc làm hỏng thực phẩm, thuốc.

- **Nấm mốc (Mold):**

- Nấm mốc có cấu tạo sợi, sinh sản bằng bào tử, sống hoại sinh, chúng thường phát triển trên bề mặt cơ chất dưới dạng những lớp hình sợi, mạng nhện hoặc khối sợi bông.

Sợi nấm rất nhỏ, đường kính trung bình $5\mu\text{m}$, chiều dài có thể vài chục centimet. Sợi nấm có vách ngăn hoặc không có vách ngăn. Toàn bộ sợi nấm và các nhánh phát triển từ một bào tử nấm rồi đan kết nhau thành một khối gọi là hệ sợi nấm.

- Trên môi trường thạch nuôi cấy, hệ sợi nấm phát triển thành một khối có tiết diện hình tròn hoặc gần tròn gọi là khuẩn lạc. Khuẩn lạc được đặc trưng bởi màu sắc của sợi nấm và của bào tử. Bề mặt khuẩn lạc có thể mượt, dạng hạt, dạng sợi hoặc xốp...
- Nấm sinh sản bằng bào tử: Bào tử vô tính hoặc bào tử hữu tính. Sự sinh sản vô tính và hữu tính luôn đan kết nhau trong quá trình sinh trưởng của nấm. Vì vậy, nấm phát triển rất nhanh trên bề mặt các cơ chất. Nấm mốc thường gây ra những biến đổi về màu sắc, mùi vị, chất lượng của thuốc. Một số sinh các độc tố (Mycotoxin) có hại cho người và động vật.

4.3.1.3. Sự ảnh hưởng của các yếu tố ngoại cảnh đối với quá trình phát triển của vi sinh vật

Sinh trưởng và trao đổi chất của vi sinh vật liên quan chặt chẽ đến các điều kiện của môi trường bên ngoài. Các điều kiện này bao gồm hàng loạt các yếu tố khác nhau, tác động qua lại với nhau. Đa số các yếu tố đều có một đặc tính tác dụng chung biểu hiện ở 3 điểm hoạt động: Tối thiểu, tối ưu, cực đại. Khi một yếu tố có tác dụng tối ưu, vi sinh vật phát triển với tốc độ cực đại. Nếu yếu tố này có tác dụng cực đại, vi sinh vật ngừng sinh trưởng và thường chết.

Các yếu tố bên ngoài có ảnh hưởng đến đời sống của vi sinh vật là vật lý, hoá học và sinh học, trong đó các yếu tố vật lý là đáng chú ý nhất. Yếu tố vật lý bao gồm nhiệt độ, độ ẩm và ánh sáng:

- **Nhiệt độ:**

Nhiệt độ là yếu tố quan trọng nhất đối với đời sống vi sinh vật. Mỗi loài vi sinh vật có một giới hạn nhiệt độ phát triển thích hợp. Nói chung đối với vi sinh vật, nhiệt độ phát triển thường từ $15 - 45^{\circ}\text{C}$.

Ở nhiệt độ cao sẽ làm thay đổi quá trình trao đổi chất của vi sinh vật, vi sinh vật bị chết. Các tế bào sinh dưỡng thường bị chết ở nhiệt độ $60^{\circ}\text{C}/20 - 30$ phút.

Các bào tử chỉ bị tiêu diệt ở nhiệt độ $120^{\circ}\text{C}/30 - 40$ phút. Tính chất này được ứng dụng trong việc tiệt trùng. Nhiệt độ thấp chỉ có tác dụng kìm hãm sự phát triển của vi sinh vật (trừ vi sinh vật ưa lạnh).

- **Độ ẩm:**

Hầu hết các quá trình sống của vi sinh vật có liên quan đến nước. Khi thiếu nước xảy ra hiện tượng loại nước khỏi tế bào vi sinh vật, trao đổi chất bị giảm, tế bào sẽ chết. Vì vậy, để bảo quản được phẩm, được liệu tránh khỏi tác động của vi sinh vật cần có một giới hạn độ ẩm nhất định.

- **Ánh sáng:**

Ánh sáng mặt trời gồm các tia bức xạ như: tia tử ngoại, hồng ngoại, tia gamma có tác dụng phá huỷ tế bào vi sinh vật, đặc biệt là tia tử ngoại. Bức xạ UV bước sóng khoảng 260nm, có tác dụng diệt khuẩn mạnh nhất. Dưới ảnh hưởng của tia UV, vi sinh vật bị chết hoặc đột biến tùy theo liều lượng.

Để ngăn ngừa tác hại của vi sinh vật đối với thuốc các tác nhân vật lý trên cần được vận dụng trong quá trình sản xuất và bảo quản dược phẩm, nhằm hạn chế tối đa số lượng vi sinh vật gây nhiễm ban đầu. Đồng thời các chế phẩm được phải được quy định giới hạn vi sinh vật cho phép.

4.3.2. Môi trường nuôi cấy vi sinh vật

Môi trường nuôi cấy là những chất dinh dưỡng thích hợp nhằm đảm bảo cho vi sinh vật sinh trưởng và phát triển.

Môi trường cần có 3 điều kiện sau: Đầy đủ chất dinh dưỡng theo yêu cầu thí nghiệm, có pH trong khoảng quy định và phải vô trùng.

Môi trường gồm 3 loại:

- Môi trường tự nhiên: nguyên liệu có nguồn gốc từ động vật hay thực vật (như cao thịt, cao men, pepton, tinh bột...). Thành phần có thể thay đổi tùy theo nguồn gốc nguyên liệu.
- Môi trường tổng hợp: bao gồm các hoá chất thuần khiết đã được quy định và thường hoà tan trong nước.
- Môi trường bán tổng hợp: trong thành phần môi trường có cả các nguyên liệu tự nhiên và tổng hợp.

Pha chế môi trường là một khâu rất quan trọng trong các thí nghiệm vi sinh vật.

Độ chính xác của kết quả thí nghiệm phụ thuộc rất nhiều vào chất lượng môi trường.

4.3.2.1. Phương pháp pha chế môi trường

Khi pha chế môi trường cần tiến hành qua 6 bước sau:

- **Chuẩn bị dụng cụ hoá chất:**

Dụng cụ pha chế môi trường tốt nhất là bằng men hoặc thủy tinh. Các dụng cụ phải rửa sạch, hoặc tiệt trùng nóng trước khi sử dụng.

Nguyên liệu pha chế môi trường phải đảm bảo chất lượng, hoá chất phải tinh khiết. Nếu là các dạng bột hoặc tinh thể phải khô, không đổi màu, không chảy nước.

- *Cân đong nguyên liệu:*

Các nguyên liệu phải được cân đong chính xác, nhất là những hoá chất hoặc nguyên tố vi lượng có thể gây ức chế vi khuẩn (muối mật, sắt...) phải được cân bằng cân phân tích.

- *Hoà tan nguyên liệu:*

Thường dùng nước cất hoặc nước khử khoáng để pha môi trường. Các hoá chất được hoà tan nóng hoặc lạnh tùy theo tính chất của chúng. Môi trường không có thạch nên hoà tan lạnh hoặc nóng nhẹ. Môi trường có thạch cần đun cho thạch tan hoàn toàn sau đó mới cho các thành phần khác vào.

- *Điều chỉnh pH:*

Khi điều chỉnh pH của môi trường nên thực hiện ở nhiệt độ 45 - 50°C để pH ít bị thay đổi sau khi tiệt trùng. Các dung dịch NaOH 1N và HCl 1N thường được sử dụng để điều chỉnh pH. Sau khi điều chỉnh pH, cần bổ sung nước cho đủ thể tích quy định.

- *Làm trong môi trường*

Các môi trường lỏng (bao gồm các chất hoà tan) phải trong để dễ quan sát sự phát triển của vi sinh vật. Sau khi hoà tan các chất, nếu môi trường đục cần phải lọc qua vải gạc hoặc giấy.

- *Đóng ống tiệt trùng:*

Môi trường được cho vào ống nghiệm bình nón hoặc bình cầu, tùy theo yêu cầu thí nghiệm. Khi đóng ống, không được để môi trường dính vào miệng ống hoặc bình.

Môi trường cần phải được tiệt trùng ngay sau khi đóng gói. Nếu để lâu, tạp khuẩn sẽ phát triển làm hỏng môi trường.

Các môi trường thông thường được tiệt trùng 110°C/30 phút hoặc 120°C/20 phút.

Môi trường có các chất dễ bị phá huỷ bởi nhiệt, cần tiệt trùng ở nhiệt độ thấp bằng phương pháp Tyndall, Pasteur, hoặc dùng lọc vi khuẩn. Môi trường được lấy ra khỏi nồi hấp ngay sau khi tiệt trùng xong. Nếu để lâu trong nồi hấp môi trường bị chuyển màu và giảm chất lượng.

Pha chế môi trường từ hỗn hợp bột môi trường chế sẵn:

Ở nhiều nước trên thế giới có các loại môi trường dưới dạng bột khô chứa đầy đủ các thành phần theo yêu cầu, các môi trường này được làm từ nguyên liệu, hoá chất tinh khiết nên chất lượng môi trường đảm bảo và ổn định. Khi làm thí nghiệm môi trường được pha với nước theo tỷ lệ quy định, nhưng phải

dùng nước mới cất hoặc nước khử khoáng, trung tính để pha chế. Nếu bột môi trường đã cũ cần phải kiểm tra lại pH sau khi làm môi trường.

4.3.2.2. Bảo quản môi trường

- Môi trường bột khô được giữ ở 10 - 12°C trong điều kiện khô, tránh ánh sáng.
- Môi trường đã pha chế được bảo quản ở 4 – 10°C trong 1 – 2 tháng tùy theo thành phần môi trường.

4.3.2.3. Các phương pháp tiệt trùng

Tiệt trùng là một quá trình làm cho một vật hoặc một sản phẩm không còn vi sinh vật sống được. Tiệt trùng được thực hiện bằng phương pháp vật lý, hoá học.

Chọn phương pháp tiệt trùng phụ thuộc vào tính chất lý hoá và độ bền vững của môi trường.

• Tiệt trùng bằng nhiệt khô:

Phương pháp này dùng để tiệt trùng các dụng cụ thí nghiệm bền với nhiệt như bông, băng, vải, gạc, dụng cụ thủy tinh...

Điều kiện tiệt trùng là: 180°C/ 30 phút hoặc 170°C/ 1 giờ, hoặc 160°C/2 giờ.

Các dụng cụ thủy tinh để đóng môi trường phải được tiệt trùng khô trước khi dùng.

• Tiệt trùng bằng hơi nước:

Phương pháp dùng nhiệt ướt thường được dùng để tiệt trùng môi trường nuôi cấy và các dụng cụ phẫu thuật.

- Môi trường thường được tiệt trùng bằng nồi hấp ở 121°C/ 15 phút.

Các môi trường dễ bị hỏng bởi nhiệt như môi trường có đường, sữa, bia, máu, albumin... cần tiệt trùng ở nhiệt độ thấp bằng các phương pháp sau:

- Tiệt trùng gián đoạn (phương pháp Tyndall):

Môi trường được hấp 3 - 4 lần ở nhiệt độ không quá 100°C trong 30 - 40 phút, cách nhau 24 giờ. Giữa hai lần hấp cho môi trường vào ủ ở 28 - 32°C/ 24 giờ cho bào tử nảy mầm. Các bào tử sống sót nảy mầm sẽ bị tiêu diệt ở lần hấp tiếp theo.

- Khử trùng nhiệt độ thấp (phương pháp Pasteur):

Đun cách thủy môi trường 60°C/ 30 phút, hoặc 73°C/ 15 phút sau đó làm lạnh đột ngột dưới 10°C. Phương pháp này không diệt được bào tử.

• Phương pháp lọc:

Phương pháp lọc được dùng để tiệt trùng các chất dễ bị phá huỷ bởi nhiệt. Cho chất lỏng chảy qua màng lọc có kích thước lỗ lọc $\leq 0,22\mu\text{m}$. Phần

chảy qua phễu được đựng trong các dụng cụ vô trùng. Thiết bị lọc và màng lọc phải được tiệt trùng trước khi dùng.

- *Phương pháp dùng tia bức xạ:*

Tia tử ngoại (UV) được dùng nhiều nhất để tiệt trùng các buồng pha chế, tủ cấy vi sinh vật.

Đèn tử ngoại phải được chiếu trực tiếp, thẳng góc với nơi làm thí nghiệm và liều lượng chiếu phải đủ với diện tích buồng.

Tia UV ít có tác dụng diệt nấm, vì vậy khi khử trùng buồng pha chế cần phối hợp thêm phương pháp dùng hoá chất để khử nấm.

4.3.3. Thử vô trùng

4.3.3.1. Mục đích

Thử vô trùng nhằm mục đích phát hiện sự có mặt của vi khuẩn, vi nấm trong các chế phẩm như dịch tiêm truyền, một số loại thuốc tiêm, thuốc tra mắt và các dụng cụ y tế mà theo tiêu chuẩn riêng cần phải vô trùng.

4.3.3.2. Nguyên tắc

Vi sinh vật có trong chế phẩm thử sẽ phát triển trên các môi trường dinh dưỡng thích hợp, chúng làm đục môi trường lỏng tạo vầng trên bề mặt hoặc lắng cặn ở đáy ống nghiệm. Trên môi trường đặc vi khuẩn, vi nấm mọc thành các khuẩn lạc đặc trưng.

4.3.3.3. Môi trường

Trong nhiều dược điển thường dùng môi trường Thioglycolat lỏng để phát hiện vi khuẩn hiếu khí, kỵ khí và môi trường Casein đậu tương lỏng để phát hiện vi khuẩn, vi nấm. Tuy nhiên, có thể dùng các môi trường khác cho thử nghiệm, với điều kiện các môi trường này thích hợp cho sự phát triển của loại vi sinh vật cần phát hiện. Ví dụ có thể dùng môi trường canh thang cao thịt - pepton để phát hiện vi khuẩn hiếu khí; môi trường Wilson - Blair phát hiện vi khuẩn kỵ khí; môi trường Sabouraud lỏng cho sự phát hiện vi nấm.

- *Kiểm tra chất lượng môi trường:*

- Độ vô trùng:

Lấy 1-2 ống (hoặc bình) môi trường mới làm ủ ở 30 - 35°C ít nhất trong 4 ngày đối với môi trường phát hiện vi khuẩn, và 25 - 28°C ít nhất trong 7 ngày với môi trường phát hiện vi nấm. Sau thời gian nuôi cấy, các ống môi trường không được có vi sinh vật mọc (có thể ủ các ống môi trường song song với các ống được cấy chất thử)

- Khả năng dinh dưỡng:

Cấy vào mỗi ống môi trường thích hợp khoảng 100 tế bào các vi sinh vật sau:

- + Vi khuẩn hiếu khí:
Staphylococcus aureus
Bacillus subtilis
Pseudomonas aeruginosa
- + Vi khuẩn kỵ khí:
Clostridium sporogenes
- + Vi nấm:
Candida albicans
Aspergillus niger

Ống thử vi khuẩn được nuôi cấy 30 - 35°C/ 3 ngày, ống thử vi nấm ủ ở 25 - 28°C/ 5 ngày.

Sau thời gian nuôi cấy vi sinh vật phải phát triển tốt trên các môi trường.

4.3.3.4. Lấy mẫu thử

Trong thử vô trùng, có thể coi toàn bộ số ống hoặc lọ thuốc được khử trùng hoặc được phân bố vô trùng trong cùng một điều kiện là một lô thuốc. Thông thường, khi một lô có ít hơn 100 đơn vị, lấy 3 đơn vị để kiểm nghiệm. Nếu nhiều hơn thì cứ 50 đơn vị lấy thêm một đơn vị nhưng không quá 10.

Tuy nhiên, khi lấy mẫu cũng cần phải dựa vào tiêu chuẩn ngành hoặc tiêu chuẩn cơ sở của từng sản phẩm để lấy mẫu cho thích hợp.

4.3.3.5. Kiểm tra tác dụng ức chế vi sinh vật của chế phẩm thử

Một số thuốc trong quá trình sản xuất được thêm các chất bảo quản. Những chất này có thể ảnh hưởng đến sự phát hiện vi sinh vật có trong chế phẩm.

Một chế phẩm chưa biết có tác dụng ức chế hay không thì cần phải kiểm tra tác dụng ức chế đối với các vi sinh vật sau:

Lấy ít nhất 2 ống của mỗi loại môi trường phát hiện vi khuẩn hiếu khí, kỵ khí, vi nấm, cấy vào một trong hai ống chế phẩm cần thử.

Cấy khoảng 100 tế bào (0,1 ml nhũ dịch vi sinh vật được pha khoảng ở nồng độ thích hợp) *Staphylococcus aureus* (vi khuẩn hiếu khí), *Clostridium sporogenes* (vi khuẩn kỵ khí), *Candida albicans* (vi nấm) vào cả hai ống của các môi trường tương ứng. Nuôi cấy 30 - 35°C/4 ngày đối với vi khuẩn và 25 - 28°C/7 ngày đối với vi nấm.

Trong thời gian nuôi cấy, nếu vi sinh vật phát triển giống nhau (mọc nhanh và phong phú) trong cái ống chứng và ống kiểm tra, chế phẩm thử được coi là không có tác dụng ức chế.

Nếu các ống có chất thử, vi sinh vật phát triển yếu hoặc không phát triển so với ống không có chất thử, chế phẩm có chất ức chế.

Tác dụng ức chế của chất thử phải được loại bỏ bằng cách pha loãng, trung hoà, hoặc dùng phương pháp màng lọc.

4.3.3.6. Phương pháp thử

Thử vô trùng có thể được thực hiện theo hai phương pháp tùy theo tính chất của mẫu thử:

- Phương pháp lọc qua màng lọc vi khuẩn .
- Phương pháp nuôi cấy trực tiếp.

• Phương pháp dùng màng lọc:

Thiết bị lọc thường bằng thuỷ tinh, thép không rỉ hoặc nhựa gồm hai bộ phận có thể tháo rời, ở giữa có lưới đỡ màng lọc. Màng lọc có thành phần là nitrat cellulose thường dùng lọc nước, dầu, và dung dịch alcol yếu. Màng ecetat cellulose để lọc các dung dịch alcol mạnh. Lỗ màng lọc có nhiều kích thước khác nhau, trong thử vô trùng thường dùng màng có đường kính khoảng 50mm và đường kính lỗ màng lọc $\leq 0,45\mu\text{m}$.

Thiết bị lọc và màng lọc phải được tiệt trùng trước khi thí nghiệm .

- Dung dịch chất thử chảy qua màng lọc, các vi sinh vật được giữ lại trên màng, cấy màng lọc vào các môi trường thích hợp để phát hiện vi khuẩn, vi nấm.
- Phương pháp màng lọc kiểm nghiệm được các thuốc có tác dụng ức chế vi sinh vật, đặc biệt là thuốc kháng sinh, nhưng đòi hỏi thiết bị tốt và điều kiện vô trùng cao.

• Phương pháp nuôi cấy trực tiếp:

Phương pháp nuôi cấy trực tiếp có kỹ thuật đơn giản, nhưng khả năng phát hiện vi sinh vật giảm khi số lượng vi sinh vật có ít và phân phối trong một thể tích chất thử lớn. Phương pháp này không thực hiện được với các chế phẩm có tác dụng ức chế và các chất kháng sinh, vì khi thí nghiệm chất thử được cấy trực tiếp vào các môi trường nuôi cấy thích hợp cho các vi khuẩn, vi nấm.

• Lượng mẫu thử dùng trong thí nghiệm:

Lượng mẫu thử cần cấy vào các môi trường tùy thuộc vào từng loại mẫu (bảng 4.1.).

- Chất lỏng là dầu hay dung dịch dầu phải thêm vào môi trường nuôi cấy 1% tween 80 hoặc các chất nhũ hoá khác với nồng độ thích hợp.
- Mẫu thử là dạng mỡ hay kem được hoà loãng vào dung dịch pepton 0,1% vô trùng theo tỷ lệ 1/10 trước khi cấy vào môi trường, (dung dịch pepton, cần thêm tween 80 với tỷ lệ 1ml/ 1lít).

- **Kỹ thuật thử:**

- Mẫu thử là dược phẩm:

Dùng dụng cụ vô trùng cấy trực tiếp chế phẩm thử vào các môi trường phát hiện vi khuẩn, vi nấm theo số lượng quy định. Chất rắn là dạng bột có thể cho trực tiếp vào môi trường hoặc làm thành dung dịch hay nhũ dịch 1% sau đó cấy vào môi trường.

Bảng 4.1. Lượng mẫu thử dùng cho thí nghiệm nuôi cấy trực tiếp

Lượng chế phẩm trong một đơn vị đóng gói	Lượng tối thiểu cho một môi trường nuôi cấy	Thể tích môi trường (ml)
<i>- Chất lỏng:</i>		
Thể tích $V < 1$ ml	Toàn bộ một ống	10
$1 \text{ ml} \leq V < 4 \text{ ml}$	1/2 ống	15
$4 \text{ ml} \leq V < 20 \text{ ml}$	2ml	20
$20 \text{ ml} \leq V < 50 \text{ ml}$	5ml	40
$50 \text{ ml} \leq V < 100 \text{ ml}$	10ml	80
$V \geq 100 \text{ ml}$	Thường 10%	100
<i>- Chất rắn:</i>		
Khối lượng $P < 50 \text{ mg}$	Toàn bộ một đơn vị đóng gói	20
$50 \text{ mg} < P < 200 \text{ mg}$	1/2 khối lượng của một đơn vị đóng gói	40
$P \geq 200 \text{ mg}$	100mg	80

- Mẫu thử là băng gạc, chỉ khâu phẫu thuật nếu kích thước và hình dạng cho phép, nhúng toàn bộ mẫu thử vào 100ml môi trường.
- Mẫu thử là dây truyền dịch: Cho dung dịch pepton 0,1% vô trùng chảy qua để thu được ít nhất 15ml và cấy vào 100ml môi trường.

Môi trường phát hiện vi khuẩn được nuôi cấy ở 30 - 35°C ít nhất trong 4 ngày, và ở 25 - 28°C ít nhất trong 7 ngày đối với vi nấm.

(Mỗi loại môi trường làm 2 - 3 ống thử song song).

- **Nhận định kết quả:**

Mẫu thử được coi là vô trùng nếu sau thời gian nuôi cấy không có vi khuẩn, vi nấm phát triển.

Nếu có 1 hoặc nhiều ống có vi sinh vật mọc cần làm lại lần thứ hai (Trước khi làm lại thử nghiệm lần 2 cần phân lập xác định đặc tính hình thái của vi sinh vật ở các ống thử dương tính):

- Nếu không có vi sinh vật → mẫu vô trùng.
- Nếu có vi sinh vật giống với lần một → mẫu thử không vô trùng.
- Nếu có vi sinh vật khác với lần một → thí nghiệm được làm lại lần 3 với số lượng mẫu gấp đôi:
 - + Không có vi sinh vật phát triển → mẫu vô trùng.
 - + Có vi sinh vật mọc → mẫu không vô trùng.

4.3.4. Thử giới hạn vi sinh vật

Các dược phẩm trong quá trình sản xuất thường bị nhiễm vi khuẩn, vi nấm do các nguyên nhân như:

- Do bản chất nguyên liệu, nếu nguyên liệu có nguồn gốc từ động vật, thực vật thì mức độ nhiễm khuẩn cao hơn nhiều so với các hoá chất.
- Các tá dược như tinh bột, đường, mật là môi trường chứa nhiều vi sinh vật, vì vậy dễ gây nhiễm bẩn cho thuốc.
- Cơ sở sản xuất, trang thiết bị, bao bì đóng gói, người sản xuất cũng là nguyên nhân gây nhiễm khuẩn.
- Dạng bào chế như viên hoàn mềm có độ ẩm cao thường tạo điều kiện cho vi sinh vật phát triển hơn viên nén, viên hoàn cứng.

Vì vậy, thử giới hạn vi sinh vật là một thử nghiệm bắt buộc cho các dược phẩm từ nguyên liệu đến thành phẩm không được tiết trùng trong quá trình sản xuất.

4.3.4.1. Mục đích

Thử độ nhiễm vi sinh vật nhằm mục đích xác định giới hạn tối đa của số lượng vi khuẩn hiếu khí, vi nấm có trong 1g (hoặc 1ml) chế phẩm thử. Đồng thời phát hiện các vi khuẩn chỉ điểm vệ sinh quy định không được có trong thuốc là:

Staphylococcus aureus, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, các loài *Salmonella*, vi khuẩn kỵ khí *Clostridia*.

4.3.4.2. Nguyên tắc

Phép thử được dựa trên nguyên tắc:

Đếm số vi khuẩn hiếu khí, nấm mốc, nấm men có trong dược phẩm được thể hiện bằng các khuẩn lạc đặc trưng trên đĩa thạch dinh dưỡng thích hợp. Căn cứ vào các đặc tính hình thái, sinh lý, sinh hoá của từng loại vi khuẩn để xác định vi khuẩn gây bệnh. Trên cơ sở kết quả thí nghiệm đánh giá chất lượng của thuốc theo tiêu chuẩn dược điển hoặc tiêu chuẩn cơ sở.

4.3.4.3. Phương pháp thử

- *Môi trường:*

Đa số các được điển thường dùng môi trường thạch casein đậu tương để đếm vi khuẩn hiếu khí, môi trường thạch Sabouraud - kháng sinh để đếm vi nấm. Cũng có thể dùng môi trường thạch thường để thử vi khuẩn hiếu khí vì môi trường này rất thích hợp cho sự phát triển của đa số vi khuẩn hiếu khí (theo Dược điển Trung Quốc 1997)

- *Chuẩn bị mẫu thử:*

Mẫu thử theo quy định chung được lấy 10g (hoặc 10 ml) để thí nghiệm.

- Mẫu thử là chất rắn hay chất lỏng có thể làm thành dung dịch hay nhũ dịch trong nước, được pha loãng vào dung dịch đệm phosphat pH =7,2 hoặc dung dịch NaCl 0,9% để được nồng độ 10^{-1} sau đó pha các nồng độ tiếp theo 10^{-2} , 10^{-3} ... tùy theo yêu cầu thí nghiệm.
- Mẫu thử là chất lỏng không hoà lẫn vào nước như dạng dầu, kem, hoặc thuốc mỡ. Cần chế tạo nhũ dịch bằng cách thêm một lượng chất nhũ hoá vô trùng thích hợp như tween 20, tween 80, làm nóng nhẹ 45°C để tạo một nhũ dịch đồng nhất.

- *Kiểm tra chất ức chế:*

Kết quả thí nghiệm sẽ không có giá trị nếu trong mẫu thử có chất bảo quản hoặc các thành phần có ảnh hưởng đến sự phát triển của vi sinh vật. Vì vậy, cần kiểm tra chất ức chế trước khi đếm số lượng vi sinh vật.

- Vi sinh vật chỉ thị:

Staphylococcus aureus (đại diện vi khuẩn G +).

Escherichia coli (đại diện vi khuẩn G -).

Candida albicans (đại diện vi nấm).

Các chủng trên được nuôi cấy trong các môi trường dinh dưỡng thích hợp sau 18 - 24 giờ (đối với vi khuẩn) và 24 đến 48 giờ đối với vi nấm, được làm thành nhũ dịch có khoảng 100 tế bào/ ml.

- Cách tiến hành:

Đĩa thử 1: Cho 1ml chất thử ở nồng độ thích hợp.

Đĩa thử 2: 1 ml chất thử + 1ml nhũ dịch vi sinh vật.

Đĩa chứng: 1ml nước cất vô trùng + 1ml nhũ dịch vi sinh vật

Cho vào mỗi đĩa 15 - 20 ml môi trường dinh dưỡng thích hợp đã để nguội dưới 45°C .

Ủ $30 - 35^{\circ}\text{C}$ / 24 - 48 giờ đối với vi khuẩn và $25 - 28^{\circ}\text{C}$ /48 - 72 giờ đối với *C. albicans*.

- Nhận xét kết quả:

Đếm số khuẩn lạc vi sinh vật trên các đĩa thí nghiệm.

Gọi A là số khuẩn lạc ở đĩa 1

Gọi B là số khuẩn lạc ở đĩa 2

Gọi C là số khuẩn lạc ở đĩa chứng

Nếu $B \approx A + C \rightarrow$ mẫu thử không có chất ức chế.

Nếu $B \approx A$ hoặc $B \ll A + C \rightarrow$ mẫu thử có chất ức chế vi sinh vật. Chất ức chế phải được xử lý bằng cách tăng thể tích môi trường, trung hoà chất ức chế bằng các chất trung hoà thích hợp như tween 20 4%. Nếu mẫu có chất ức chế quá mạnh phải thử bằng phương pháp màng lọc.

* Kiểm tra chất ức chế cũng có thể được thực hiện theo cách sau:

Cấy khoảng 100 tế bào các vi khuẩn vào các ống môi trường chọn lọc không có mẫu thử và có mẫu thử ở nồng độ thích hợp cho *E. coli Salmonella*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*.

Mẫu thử không có tác dụng ức chế nếu vi khuẩn mọc tốt như nhau ở cả hai ống môi trường.

- **Đếm số lượng vi sinh vật:**

- Đối với vi khuẩn:

Cho vào mỗi đĩa petri 1ml chất thử ở nồng độ thích hợp sao cho không quá 300 khuẩn lạc trong 1ml. Thêm 15 - 20ml môi trường thạch casein - đậu tương hoặc môi trường thạch thường đã để nguội dưới 45°C, xoay nhẹ đĩa để chất thử trộn đều vào môi trường. Nuôi cấy 30 - 35°C trong 1 - 2 ngày.

- Đối với vi nấm:

Cho vào mỗi đĩa petri 1ml chất thử ở nồng độ thích hợp sao cho không quá 100 khuẩn lạc vi nấm trong 1ml. Thêm 15-20ml thạch Sabouraud + kháng sinh.

- Nuôi cấy 25 - 28°C trong 4 - 5 ngày.

- Thí nghiệm được thực hiện với 1 hay 2 nồng độ pha loãng cuối cùng. Mỗi nồng độ được làm 2 - 3 đĩa thử để lấy giá trị trung bình. Sau thời gian nuôi cấy, các đĩa có số khuẩn lạc vi khuẩn nhỏ hơn 300 và vi nấm nhỏ hơn 100 được đếm để tính số lượng.

- **Tính kết quả:**

Tổng số vi khuẩn hiếu khí, vi nấm trong 1g (1ml) được tính theo công thức:

$$X = \frac{A_1 k_1 + A_2 k_2}{2}$$

(Phép thử thực hiện với 2 nồng độ).

- A_1 : Số khuẩn lạc vi sinh vật trung bình ở nồng độ pha loãng k_1 .
 A_2 : Số khuẩn lạc vi sinh vật trung bình ở nồng độ pha loãng k_2 .
 k_1, k_2 : Độ pha loãng.

Các được điển có quy định: mẫu thử có ít hơn 10 vi sinh vật/1g (1ml) nếu không có khuẩn lạc mọc trên đĩa thử ở nồng độ 10^{-1} .

4.3.5. Xác định hoạt lực chất kháng sinh bằng các phép thử vi sinh vật

4.3.5.1. Mục đích

- Trong lĩnh vực kiểm nghiệm, để định lượng kháng sinh người ta có thể sử dụng các phương pháp khác nhau. Một số chất kháng sinh có thể được định lượng bằng phương pháp hoá học, phương pháp hóa lý. Tuy nhiên, phương pháp sinh học vẫn đóng vai trò quan trọng trong việc đánh giá hoạt tính sinh học của thuốc và kiểm tra được sự giảm hay mất hoạt lực của chất kháng sinh mà các phương pháp lý, hoá không thực hiện được.
- Các chất kháng sinh có cấu trúc phức tạp hoặc thành phần có tác dụng gồm một hỗn hợp nhiều thành phần, thường phải dùng thử nghiệm vi sinh vật để xác định hoạt lực của thuốc.
- Phép thử trên vi sinh vật còn cho biết độ nhạy cảm của vi khuẩn gây bệnh đối với các chất kháng sinh được thử, và mức độ kháng thuốc của chúng. Trên cơ sở đó có thể chọn kháng sinh thích hợp cho bệnh nhân trong điều trị.

4.3.5.2. Nguyên tắc

Hoạt lực của một chất kháng sinh được xác định bằng cách so sánh khả năng ức chế của chủng vi sinh vật chỉ thị, bởi những nồng độ đã biết của kháng sinh thử (chưa biết hoạt lực) và nồng độ đã biết của kháng sinh chuẩn (đã biết rõ hoạt lực).

4.3.5.3. Chủng chỉ thị

Chủng chỉ thị là chủng vi sinh vật thuần khiết, nhạy cảm đối với một chất kháng sinh, chủng chỉ thị thường được phân lập từ các bảo tàng giống Quốc gia, được bảo quản trong ống đông khô hoặc trong môi trường thích hợp ở 4 - 10°C. Tùy theo được điển của mỗi nước, mỗi chất kháng sinh có thể có một vài chủng chỉ thị khác nhau.

• Chế tạo nhũ dịch vi sinh vật không có bào tử:

- Các chủng vi khuẩn:
Staphylococcus aureus
Sarcina lutea

Escherichia coli

Micrococcus luteus

Klebsiella faecalis.

– Chủng vi nấm:

Saccharomyces cerevisiae.

Đối với các chủng vi sinh vật không có bào tử, khi thử nghiệm cần sử dụng chủng sau 16 - 24 giờ nuôi cấy để được các chủng chỉ thị đang ở giai đoạn phát triển logarit.

Chủng chỉ thị là vi khuẩn trước khi sử dụng được cấy sang môi trường thạch dinh dưỡng (pepton 10g, cao thịt 1,5g, cao men 3g, glucose 1g, thạch 15g, nước cất 1000 ml). Sau 16 - 18 giờ nuôi cấy ở 35 - 37°C các vi khuẩn được làm thành một nhũ dịch có nồng độ thích hợp với NaCl 0,9% để tạo vòng vô khuẩn rõ rệt trong phương pháp khuếch tán và có độ đục thích hợp trong phương pháp đo độ đục.

Chủng chỉ thị là vi nấm được nuôi cấy trên môi trường thạch Sabouraud ở 28 - 30°C trong 24 giờ và cũng được làm thành một nhũ dịch có nồng độ thích hợp.

• **Chế tạo nhũ dịch bào tử:**

Các chủng chỉ thị có bào tử:

Bacillus subtilis

Bacillus pumilus

Bacillus cereus

Nếu chủng chỉ thị có bào tử nên chế tạo dạng bào tử để sử dụng, vì dạng bào tử được bảo quản dưới 4°C có thể tồn tại trong một thời gian rất dài.

Các chủng vi khuẩn trên được cấy vào bình môi trường thạch dinh dưỡng có bề mặt thạch rộng (pepton 6g, cao thịt 1,5g, cao men 3g, glucose 1g, K_2HPO_4 3,68g, KH_2PO_4 1,32g, thạch 15g, nước cất 1000ml)

Môi trường này được thêm $MnSO_4$ với hàm lượng 0,001g/lít để thúc đẩy sự hình thành bào tử. Nuôi cấy 35 - 37°C trong vòng 7 ngày với *B. cereus* nuôi cấy ở 30°C. Dùng nước cất vô trùng rửa lớp bào tử trên bề mặt môi trường để tạo một nhũ dịch. Đun cách thủy nhũ dịch này 70°C/ 30 phút, pha loãng nhũ dịch đến nồng độ 10^7 - 10^8 bào tử trong 1ml.

4.3.5.4. Chất chuẩn và đơn vị hoạt lực

• **Chất chuẩn:**

Chất chuẩn là những chất có độ tinh khiết cao, có thể dùng chất chuẩn gốc hoặc chất chuẩn thứ cấp có hoạt lực được xác định theo mẫu chuẩn quốc tế

tương ứng. Chất chuẩn được đóng trong ống thủy tinh hàn kín bảo quản khô, tránh ánh sáng, dưới 0°C.

- **Đơn vị hoạt lực:**

Hoạt lực của một chất kháng sinh được tính bằng đơn vị hoạt lực quốc tế (viết tắt là U hoặc UI, IU).

Một đơn vị hoạt lực là hoạt lực đặc trưng của một lượng nhất định chất kháng sinh chuẩn sinh học quốc tế hoặc chế phẩm đối chiếu sinh học với chuẩn quốc tế. Ví dụ 1U gentamicin là hoạt lực của 0,0056mg gentamicin.

Đơn vị hoạt lực của các chất kháng sinh được xác định bởi các viện nghiên cứu lớn của tổ chức y tế thế giới về chất chuẩn sinh học.

Hoạt lực của các chất kháng sinh có thể được thể hiện bằng μg hoạt lực. Đối với chất kháng sinh hoàn toàn tinh khiết, trong đa số các trường hợp μg hoạt lực tương đương với μg khối lượng của chất kháng sinh. Khi chất kháng sinh chưa hoàn toàn tinh khiết, hoặc là hỗn hợp của nhiều thành phần tương tự nhau về hoá học nhưng khác nhau về hoạt tính sinh học thì μg hoạt lực không nhất thiết tương đương với μg khối lượng của chất kháng sinh.

4.3.5.5. Môi trường và dung môi

- Tùy theo chất kháng sinh và vi sinh vật chỉ thị để chọn các môi trường thích hợp cho thí nghiệm.
- Dung môi và các chất pha loãng không được ảnh hưởng đến sự phát triển của vi sinh vật. Các chất pha loãng như: nước cất, dung dịch HCl, ethanol, methanol, dung dịch đệm có pH khác nhau... được sử dụng tùy thuộc vào độ tan của các chất kháng sinh. Các vấn đề này cần tham khảo được điển.

4.3.5.6. Định lượng chất kháng sinh bằng phương pháp khuếch tán

Có hai phương pháp vi sinh vật để định lượng chất kháng sinh là:

- Phương pháp đo độ đục: (Turbidimetric method)
- Phương pháp khuếch tán: (Diffusion method)

Phương pháp khuếch tán thường được sử dụng nhiều trong định lượng kháng sinh.

- **Nguyên tắc:**

Chất kháng sinh khuếch tán vào môi trường dinh dưỡng đặc đã cấy vi sinh vật chỉ thị, tạo các vùng ức chế vi sinh vật có đường kính tỷ lệ thuận với logarit nồng độ tương ứng. Hoạt lực của chất thử được so sánh với chất chuẩn theo phương pháp thống kê.

- **Pha dung dịch chuẩn và dung dịch thử:**

Pha chuẩn: Cân một lượng chất chuẩn thích hợp hoà vào dung môi để có một dung dịch gốc nồng độ khoảng 1000 UI/ ml. Từ dung dịch gốc pha thành 3 nồng độ cuối cùng theo cấp số nhân hệ số hai là s_1, s_2, s_3 hoặc hai nồng độ s_1, s_2 ($s_1 < s_2 < s_3$).

Chất thử được pha như chất chuẩn với giả định chất thử có hoạt lực tương đương chất chuẩn. Chất thử có 3 nồng độ cuối cùng là t_1, t_2, t_3 (hoặc t_1, t_2).

Phương pháp khuếch tán chỉ cho kết quả tốt khi chất chuẩn và chất thử có cùng bản chất hóa học. Sự không đồng nhất giữa chuẩn và thử làm thay đổi tính song song của hai đường thẳng biểu thị sự tương quan giữa đường kính vùng ức chế và logarit nồng độ. Vì hai chất có hai hệ số khuếch tán riêng. Vì vậy không so sánh chất kháng sinh ở các dạng muối khác nhau như erythromycin stearat và erythromycin propionat, oxytetracyclin và clotetracyclin.

Khi pha dung dịch chuẩn và dung dịch thử cần lưu ý: nếu chọn khoảng nồng độ cuối cùng để định lượng không thích hợp, hoặc hoạt lực giả định của thử quá xa hoạt lực của chuẩn, thì sẽ làm thay đổi tính chất của sự tương quan giữa đường kính vùng ức chế và logarit nồng độ. Kết quả định lượng sẽ không chính xác.

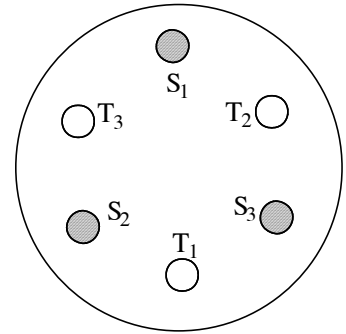
- **Tiến hành thí nghiệm:**

– Đổ vào các đĩa Petri một lượng môi trường dinh dưỡng đã được cấy chủng chỉ thị để tạo một lớp đồng nhất có độ dày từ 2-5mm. Chiều dày lớp thạch mỏng hay dày quá, hoặc không đồng đều có thể làm cho quan hệ giữa đường kính vùng ức chế và logarit nồng độ không còn là đường thẳng. Cũng có thể làm 2 lớp môi trường, nhưng chỉ lớp trên được cấy vi sinh vật chỉ thị. Chủng chỉ thị là loại không có bào tử, phải cấy vào môi trường được để nguội dưới 45°C, nếu là dạng có bào tử nhiệt độ cho phép khi cấy chủng là 65 - 70°C. Cẩn cấy vào môi trường một lượng vi sinh vật chỉ thị sao cho có vùng ức chế rõ nét với kích thước đường kính thích hợp tương ứng với các nồng độ kháng sinh đã chọn. Nếu lượng chủng quá ít, vùng ức chế sẽ quá to, vi sinh vật mọc thưa thớt, khó xác định được vùng ức chế. Nếu lượng chủng quá nhiều, vùng ức chế nhỏ sẽ khó đo và kém chính xác.

– Các đĩa môi trường được để khô ở nhiệt độ phòng thí nghiệm trong 30 phút trước khi dùng. Bề mặt thạch ướt sẽ làm cho vùng ức chế bị nhòe.

– Đối với thử nghiệm 3 liều: dùng 6 ống trụ bằng thép không rỉ có kích thước như nhau (chiều cao khoảng 10mm, đường kính trong khoảng 6mm). Đặt các ống trụ lên bề mặt đĩa thạch theo sơ đồ, cho chất thử và chuẩn vào các ống trụ với một lượng bằng nhau. Có thể thay ống trụ bằng cách đục các lỗ trên đĩa thạch có đường kính từ 6 - 8mm hoặc dùng các khoảng giấy tẩm kháng sinh có độ dày thích hợp, đường kính khoảng 6 mm.

Để tạo vùng ức chế to nhất cần thực hiện giai đoạn tiên khuếch tán bằng cách để các đĩa thử ở nhiệt độ phòng trong 2 giờ cho kháng sinh khuếch tán vào môi trường (đối với colistin, polymyxin B thời gian để khuếch tán dài hơn từ 3 – 4 giờ). Sau thời gian khuếch tán, các đĩa thử được ủ ở nhiệt độ thích hợp trong 16 – 18 giờ. Trong quá trình ủ nhiệt độ phải ổn định và phải đồng đều ở mọi nơi. Các đĩa thử nên để một lớp trong tủ ấm sao cho vị trí của các nồng độ t và s có sự khác nhau ít nhất về nguồn nhiệt.



Đo đường kính vùng ức chế tạo bởi các nồng độ chuẩn và thử bằng thước đo có độ chính xác đến 0,1mm.

Một thí nghiệm được tiến hành với 10 đĩa thử song song.

• **Tính kết quả:**

(Thử nghiệm 3 liều)

Tỷ lệ phần trăm hoạt lực của kháng sinh thử so với chuẩn được tính theo công thức:

$$R = \text{Anti log} \left[2 + \frac{4}{3} \frac{A}{B} \log I \right] \quad (P = 0,95)$$

$$A = (T_1 + T_2 + T_3) - (S_1 + S_2 + S_3)$$

$$B = (T_3 - T_1) + (S_3 - S_1)$$

$T_1, T_2, T_3, S_1, S_2, S_3$ là tổng giá trị đường kính vòng vô khuẩn tính bằng mm của các nồng độ $t_1, t_2, t_3, s_1, s_2, s_3$. I là tỷ số của hai nồng độ pha loãng kế tiếp nhau, $I = 2$. Vậy

$$R = \text{Anti log} \left[2 + \frac{4}{3} \log 2 \cdot \frac{A}{B} \right]$$

$$R = \text{Anti log} \left[2 + 0,4013 \cdot \frac{A}{B} \right]$$

$$\text{Hoạt lực của mẫu thử} = \frac{R \times \text{hoạt lực chuẩn}}{100}$$

• **Muốn phép thử có giá trị, thí nghiệm phải đạt được các điều kiện sau:**

- Hoạt lực của chất thử được giả thiết gần sát với thực tế để kết quả đọc được nằm trong phạm vi đường cong chuẩn.

$$T_a < t_a \cdot V$$

- Độ dốc của đường biểu diễn logarit nồng độ với đường kính vòng vô khuẩn phải có ý nghĩa.

$$T_b \gg t_b \cdot V$$

- Các đường biểu diễn logarit nồng độ của chất thử và chất chuẩn với đường kính vòng vô khuẩn phải song song.

$$T_{ab} < t_{ab} \cdot V$$

- Trong khoảng nồng độ đã chọn sự phụ thuộc giữa logarit của nồng độ với đường kính vòng vô khuẩn tương ứng là tuyến tính.

$$\begin{cases} T_c < t_c \cdot V \\ T_{ac} < t_{ac} \cdot V \end{cases}$$

V: là tổng của các hiệu giá trị đường kính lớn nhất và nhỏ nhất của một nồng độ.

$$T_a = (T_1 + T_2 + T_3) - (S_1 + S_2 + S_3)$$

$$T_b = (T_3 + S_3) - (T_1 + S_1)$$

$$T_{ab} = (S_1 + T_3) - (S_3 + T_1)$$

$$T_c = (S_1 + S_3 + T_1 + T_3) - 2(S_2 + T_2)$$

$$T_{ac} = (2S_2 + T_1 + T_3) - (2T_2 + S_1 + S_3)$$

$t_a, t_b, t_c, t_{ab}, t_{ac}$ là các hệ số tra bảng theo số vòng vô khuẩn (n) do được của một nồng độ.

Giá trị t:

Số vòng vô khuẩn (n)	Giá trị t (P = 0,95)				
	t_a	t_b	t_c	t_{ab}	t_{ac}
5	0,80	0,66	1,14	0,66	1,14
6	0,80	0,66	1,14	0,66	1,14
7	0,81	0,66	1,14	0,66	1,14
8	0,82	0,67	1,16	0,67	1,16
9	0,83	0,68	1,17	0,68	1,17
10	0,84	0,68	1,19	0,68	1,19

• **Xác định giới hạn tin cậy:**

- Độ lệch chuẩn:

$$S_M = \frac{2,666.Hn.\sqrt{n(A^2 + 1,5B^2)}}{B^2}$$

Hn: Hệ số vòng đo phụ thuộc vào n.

n: Số vòng vô khuẩn đo được của một nồng độ.

- Giới hạn tin cậy:

$$M_{1,2} = 0,4013 \frac{A}{B} \pm 0,301S_M$$

Phần trăm giới hạn tin cậy trên:

$$R_1 = \text{Antilog} (2 + M_1)$$

Phần trăm giới hạn tin cậy dưới;

$$R_2 = \text{Antilog} (2 + M_2)$$

- Sai số thử nghiệm:

$$e\% = \frac{R_1 - R_2}{2R} \times 100$$

Kết quả định lượng có giá trị với $e \leq 5\%$.

- Giá trị H_n

N	3	4	5	6	7	8	9	10
H_n	1,27	1,03	0,90	0,81	0,75	0,69	0,65	0,65

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Bộ y tế (2002). Dược điển Việt Nam III. NXB Y học, Hà Nội
2. Nguyễn Lâm Dũng và cộng sự (1997). Vi sinh vật học. Hà Nội
3. British Pharmacopoeia 2001.
4. Collins C.H. and Patricia M.L (1976). Microbiological methods, London.
5. Pharmacopoeia of the People's Republic of China (1997).
6. The United States Pharmacopoeia XXIV (2000).

CÂU HỎI TỰ LƯỢNG GIÁ

- 4.1. Trình bày những đặc điểm chính về hình thái và tính chất nuôi cấy của vi khuẩn, nấm mốc, nấm men?
- 4.2. Nêu cách phân loại vi khuẩn theo hình thể và đặc tính hô hấp?
- 4.3. Phân tích những yếu tố ngoại cảnh ảnh hưởng đến sự phát triển của vi sinh vật?
- 4.4. Trình bày phương pháp làm môi trường nuôi cấy vi sinh vật?
- 4.5. Mô tả các phương pháp tiệt trùng?
- 4.6. Trình bày thử nghiệm thử vô trùng bằng phương pháp nuôi cấy trực tiếp?
- 4.7. Nêu mục đích, nguyên tắc của thử nghiệm thử vô trùng và thử giới hạn vi sinh vật?
- 4.8. Trình bày thử nghiệm đếm số lượng vi sinh vật trong 1g (1ml) được phẩm bằng phương pháp đĩa thạch?
- 4.9. Viết tên những chủng chỉ thị được sử dụng để thử chất ức chế trong thử nghiệm thử vô trùng và thử giới hạn vi sinh vật. Nêu sự khác nhau về chủng chỉ thị trong hai phép thử và giải thích?
- 4.10. Vai trò của phương pháp sinh học trong kiểm nghiệm chất kháng sinh?
- 4.11. Trình bày phương pháp chuẩn bị nhũ dịch vi sinh vật trong định lượng kháng sinh. Tại sao đối với những chủng chỉ thị không có bào tử trước khi sử dụng cần phải cấy truyền vào môi trường thích hợp?
- 4.12. Cách pha dung dịch chuẩn và dung dịch thử trong định lượng kháng sinh bằng phương pháp khuếch tán. Nêu những điểm cần chú ý trong quá trình pha các dung dịch này?
- 4.13. Mô tả cách tiến hành định lượng chất kháng sinh bằng phương pháp khuếch tán?
- 4.14. Nêu những nguyên nhân trong các giai đoạn làm thử nghiệm ảnh hưởng đến sự chính xác của phương pháp khuếch tán?
- 4.15. Nêu những điều kiện thử nghiệm cần đạt được trong định lượng kháng sinh để phép thử có giá trị?
- 4.16. Viết các công thức tính kết quả định lượng kháng sinh với thử nghiệm ba liều và công thức xác định giới hạn tin cậy?

4.17. Trình bày phương pháp xác định số lượng tối đa vi khuẩn hiếu khí, vi nấm trong một gam sáp bôi môi Lip Ice. Cho biết mẫu thử có chất bảo quản riêng của nhà sản xuất?

4.18. Trình bày phương pháp định lượng bột Gentamicin sulphat bằng thử nghiệm vi sinh vật(phương pháp khuếch tán), với chỉ thị *Bacillus pumilus* NCTC 8241.

Cho biết: Gentamicin sulphat chuẩn có 680 U/ ml, dung môi pha loãng là nước.

Ba nồng độ là: S1= 4 U/ ml; S2=8 U/ ml; S3=16 U/ ml.

Chương 5.

KIỂM NGHIỆM CÁC DẠNG BÀO CHẾ

MỤC TIÊU HỌC TẬP:

1. Trình bày được các yêu cầu kỹ thuật và phương pháp thử để đánh giá chất lượng các dạng bào chế: Thuốc bột, thuốc viên nén, viên nang, thuốc tiêm, thuốc tiêm truyền, thuốc nhỏ mắt, thuốc mỡ, thuốc uống dạng lỏng, thuốc đạn, thuốc trứng.
2. Đánh giá được kết quả kiểm nghiệm đối với một mẫu kiểm nghiệm thành phẩm cụ thể của các dạng bào chế trên.

Khi tiến hành kiểm nghiệm một mẫu chế phẩm thuộc một dạng bào chế cụ thể (thuốc bột, viên nén, viên nang, thuốc tiêm, ...) theo chuyên luận riêng của chế phẩm đó trong Dược điển, thông thường yêu cầu ghi ở phần đầu của chuyên luận là chế phẩm phải đáp ứng các *yêu cầu chung của dạng bào chế* đó và các yêu cầu riêng của dược chất, của chế phẩm đó như tính chất, định tính, định lượng, tạp chất (nếu có), ... Còn nếu tiêu chuẩn kiểm nghiệm là tiêu chuẩn của nhà sản xuất (TCCS) thì trong tiêu chuẩn kiểm nghiệm có đầy đủ yêu cầu kỹ thuật và phương pháp thử cụ thể cho chế phẩm đó, một số tiêu chí đặc trưng cho dạng bào chế của chế phẩm đó được tiến hành thử theo hướng dẫn của Dược điển.

Trong tài liệu này, chúng tôi đề cập tới yêu cầu kỹ thuật và phương pháp thử của các dạng bào chế thông dụng như thuốc bột, thuốc viên nén, viên nang, thuốc tiêm, thuốc tiêm truyền, thuốc nhỏ mắt, thuốc mỡ, thuốc uống dạng lỏng, thuốc đạn, thuốc trứng. Tài liệu tham khảo chính được sử dụng là Dược điển Việt Nam III, đồng thời chúng tôi cũng sử dụng Dược điển của một số nước khác như Dược điển Anh, Dược điển Mỹ, Dược điển Trung Quốc và một số tài liệu kiểm nghiệm các dạng bào chế khác.

5.1. KIỂM NGHIỆM THUỐC BỘT

5.1.1. Yêu cầu kỹ thuật và phương pháp thử

5.1.1.1. Tính chất

Bột phải khô tơi, không bị ẩm, vón, màu sắc đồng nhất. Mùi vị tùy theo từng loại chế phẩm của các nhà sản xuất.

Cách thử: Trải một lượng bột vừa đủ thành một lớp mỏng trên một tờ giấy trắng mịn. Quan sát màu sắc bằng mắt thường, dưới ánh sáng tự nhiên.

5.1.1.2. Độ ẩm

Các thuốc bột không được chứa hàm lượng nước quá 9,0%, trừ chỉ dẫn khác.

Cách thử: theo “Xác định mất khối lượng do làm khô” - Phụ lục 5.16 - ĐĐVN III.

5.1.1.3. Độ mịn

Thuốc bột phải đạt độ mịn quy định trong chuyên luận riêng.

Nếu không có chỉ dẫn khác, phép thử này dùng cho tất cả các thuốc bột kếp, các thuốc bột dùng để đắp, thuốc bột dùng để pha chế thuốc dùng cho mắt, tai.

Các cỡ bột được quy định dựa vào các số của rây. Rây có lưới rây và lưới rây có thể làm bằng sợi kim loại hoặc sợi các vật liệu thích hợp khác được dệt thành những mắt vuông. Lưới rây dùng để rây bột thuốc được phân loại bằng những con số biểu thị kích thước lỗ rây, quy định tính bằng μm theo bảng 5.1.

Cách thử: Chọn cỡ rây thích hợp theo qui định của tiêu chuẩn. Cân một lượng thuốc bột, đem rây qua rây có cỡ qui định.

Đối với bột thô hoặc nửa thô: lấy 25g -100 g bột. Cho vào rây thích hợp, lắc rây theo chiều ngang quay tròn ít nhất 20 phút và rây tới khi xong. Cân chính xác số lượng còn lại ở trên rây và số thu được trong hộp hứng.

Đối với bột nửa mịn, mịn hay rất mịn: lấy không quá 25 g bột, cho vào rây thích hợp, lắc rây theo chiều ngang quay tròn ít nhất 30 phút rồi rây tới khi xong. Cân chính xác số lượng còn lại ở trên rây và số thu được trong hộp hứng.

Đối với chất có dầu hay bột có xu hướng bít mắt rây thì trong quá trình rây thỉnh thoảng chải cẩn thận mắt rây, tách rời những đồng tụ lại khi rây.

Thuốc bột đạt tiêu chuẩn về độ mịn nếu:

- Khi quy định dùng 1 rây để xác định cỡ bột thì không được có dưới 97% khối lượng thuốc bột qua được cỡ rây đó.
- Khi quy định dùng 2 rây để xác định cỡ bột thì để một rây lên trên rây kia và tiến hành rây; không được có dưới 95% khối lượng thuốc bột qua rây có số rây cao hơn và không được quá 40% khối lượng thuốc bột qua rây có số rây thấp hơn.

Bảng 5.1. Qui định số rây

Số rây (μm)	Cỡ mắt rây (mm)	Đường kính sợi rây (mm)
1400	1,400	0,710
710	0,710	0,450
355	0,355	0,224
250	0,250	0,160
180	0,180	0,125
125	0,125	0,090
90	0,090	0,063

Các ký hiệu quy định cỡ bột:

- Bột thô (1400/355)
- Bột nửa thô (710/250)
- Bột nửa mịn (355/180)
- Bột mịn (180/125)
- Bột rất mịn (125/90)

5.1.1.4. Độ đồng đều khối lượng

Những thuốc bột không quy định thử độ đồng đều hàm lượng thì phải thử độ đồng đều khối lượng. Riêng thuốc bột để pha tiêm hoặc truyền tĩnh mạch, nếu khối lượng nhỏ hơn hoặc bằng 40 mg thì không phải thử độ đồng đều khối lượng nhưng phải đạt yêu cầu độ đồng đều hàm lượng.

Cách thử: Cân từng đơn vị trong số 5 đơn vị đóng gói nhỏ nhất được lấy bất kỳ. Khối lượng thuốc phải nằm trong giới hạn cho phép theo bảng 5.2.

Bảng 5.2. Giới hạn cho phép chênh lệch khối lượng đối với thuốc bột

Khối lượng ghi trên nhãn	Phần trăm chênh lệch
Dưới hoặc bằng 0,50g	± 10
Trên 0,50 - 1,50g	± 7
Trên 1,50 - 6,00g	± 5
Trên 6,00g	± 3

Tất cả các đơn vị phải đạt qui định trong bảng trên.

Nếu có một đơn vị có khối lượng lệch ra ngoài quy định này thì thử lại với 5 đơn vị khác, nếu lần thử lại có quá một đơn vị không đạt thì lô thuốc không đạt yêu cầu.

Đối với các chế phẩm đóng gói trong hộp, lọ thì sau khi cân cả vỏ phải bỏ hết thuốc ra, dùng bông lau sạch thuốc, cân vỏ rồi tính theo lượng thuốc trong từng hộp hoặc lọ.

Độ chênh lệch được tính theo tỉ lệ phần trăm so với khối lượng trung bình bột thuốc trong một đơn vị đóng gói.

5.1.1.5. Độ đồng đều hàm lượng

Trừ khi có chỉ dẫn khác, phép thử này áp dụng cho các thuốc bột để uống, để tiêm được trình bày trong các đơn vị đóng gói một liều có chứa một hoặc nhiều hoạt chất, trong đó có các hoạt chất có hàm lượng dưới 2 mg hoặc dưới 2% (kl/kl) so với khối lượng thuốc một liều.

Phép thử đồng đều hàm lượng được tiến hành sau phép thử định lượng và hàm lượng hoạt chất đã ở trong giới hạn quy định.

Cách thử: Lấy 10 đơn vị đóng gói nhỏ nhất bất kỳ, xác định hàm lượng hoạt chất từng gói theo phương pháp định lượng chỉ dẫn trong chuyên luận.

Cách đánh giá:

Chế phẩm đem kiểm tra đạt yêu cầu phép thử nếu không quá một đơn vị có giá trị hàm lượng nằm ngoài giới hạn 85 - 115% của hàm lượng trung bình và không có đơn vị nào nằm ngoài giới hạn 75 - 125% của hàm lượng trung bình.

Chế phẩm không đạt yêu cầu phép thử nếu quá 3 đơn vị có giá trị hàm lượng nằm ngoài giới hạn 85 - 115% của hàm lượng trung bình hoặc 1 đơn vị trở lên nằm ngoài giới hạn 75 - 125% của hàm lượng

Nếu hai hoặc ba đơn vị có giá trị hàm lượng nằm ngoài giới hạn 85 -115% nhưng ở trong giới hạn 75 - 125% của hàm lượng trung bình thì thử lại trên 20 đơn vị khác, lấy ngẫu nhiên. Chế phẩm đạt yêu cầu, nếu không quá 3 đơn vị trong tổng số 30 đơn vị đem thử có giá trị hàm lượng nằm ngoài giới hạn 85 - 115% của hàm lượng trung bình và không có đơn vị nào có giá trị hàm lượng nằm ngoài giới hạn 75 - 125% của hàm lượng trung bình.

5.1.1.6. Định tính

Tiến hành định tính theo các phương pháp được qui định trong tiêu chuẩn, thuốc bột phải cho các phản ứng của các hoạt chất có trong chế phẩm

5.1.1.7. Định lượng

Lấy thuốc của 5 đơn vị đóng gói nhỏ nhất bất kỳ, trộn đều. Tiến hành định lượng theo các phương pháp được qui định trong tiêu chuẩn, hàm lượng của từng hoạt chất trong chế phẩm phải nằm trong giới hạn cho phép theo bảng 5.3.

5.1.1.8. Giới hạn nhiễm khuẩn

Thuốc bột có nguồn gốc dược liệu phải đạt yêu cầu “Giới hạn nhiễm khuẩn”.

Cách thử: Nếu không có qui định riêng thì tiến hành thử và đánh giá theo "Thử giới hạn vi sinh vật" - phần 4.3.4, trang 119-121.

Bảng 5.3. Giới hạn cho phép về hàm lượng hoạt chất đối với thuốc bột

Lượng ghi trên nhãn	Phần trăm chênh lệch
Tới 100 mg	± 15
Trên 100 mg tới 1g	± 10
Trên 1 g đến 5 g	± 5
Trên 5 g	± 1

5.1.2. Các loại thuốc bột

5.1.2.1. Thuốc bột để uống

Thuốc bột để uống phải đáp ứng các yêu cầu chất lượng chung của thuốc bột.

Thuốc bột sủi bọt phải đạt thêm yêu cầu về độ tan.

Cách thử: Thả một lượng thuốc bột tương ứng với một liều vào một cốc thủy tinh có chứa 200 ml nước ở nhiệt độ 15 -20°C, xuất hiện nhiều bọt khí bay ra. Khi hết bọt khí bay ra, thuốc phải tan hoàn toàn. Thử như vậy với 6 liều đơn. Mẫu thử đạt yêu cầu nếu mỗi liều thử đều tan trong vòng 5 phút, trừ khi có chỉ dẫn riêng.

5.1.2.2. Thuốc bột dùng ngoài

Thuốc bột dùng ngoài phải đáp ứng các yêu cầu chất lượng chung của thuốc bột. Ngoài ra, phải đạt các yêu cầu riêng sau:

– Độ vô khuẩn: thuốc bột để đắp, dùng cho vết thương rộng hoặc trên da bị tổn thương nặng, thuốc bột dùng cho mắt phải vô khuẩn.

Cách thử: Nếu không có qui định riêng thì tiến hành thử và đánh giá theo "Thử vô trùng" - phần 4.3.3, trang 115-118.

5.1.2.3. Thuốc bột pha tiêm

Thuốc bột pha tiêm đáp ứng các yêu cầu chất lượng chung của thuốc bột và yêu cầu đối với thuốc tiêm, thuốc tiêm truyền dạng bột như: độ vô khuẩn, chất gây sốt ...

Cách thử: Theo cách thử ở chuyên luận thuốc tiêm.

Ví dụ: Thuốc tiêm benzylpenicilin - ĐVN III trang 32 - 33.

5.2. KIỂM NGHIỆM THUỐC VIÊN NANG

5.2.1. Yêu cầu kỹ thuật và phương pháp thử

5.2.1.1. Tính chất

Nang cứng hoặc nang mềm chứa bột hoặc cốm hoặc chất lỏng.

Cách thử: Thử bằng cảm quan.

5.2.1.2. Độ đồng đều khối lượng

Cân khối lượng của một nang: Với viên nang cứng thì tháo rời hai nửa vỏ nang thuốc đó ra, dùng bông lau sạch vỏ rồi cân khối lượng của vỏ; với viên nang mềm, cắt mở nang, bóp thuốc ra hết rồi dùng ether hoặc dung môi hữu cơ thích hợp rửa sạch vỏ nang, để khô tự nhiên tới khi hết mùi dung môi, cân khối lượng vỏ. Khối lượng thuốc trong nang là hiệu giữa khối lượng nang thuốc và vỏ nang. Làm như vậy với 19 nang khác được lấy bất kỳ. Độ chênh lệch khối lượng của từng viên với khối lượng trung bình phải đạt theo bảng 5.4.

Nếu có yêu cầu thử độ đồng đều hàm lượng thì không phải thử độ đồng đều khối lượng.

Bảng 5.4. Giới hạn cho phép chênh lệch khối lượng đối với viên nang

Khối lượng trung bình nang	Phần trăm chênh lệch
Nhỏ hơn 300 mg	±10
Lớn hơn hoặc bằng 300 mg	±7,5

5.2.1.3. Độ đồng đều hàm lượng

Nghiền mịn bột thuốc riêng từng viên và tiến hành thử và đánh giá như đối với thuốc bột.

5.2.1.4. Độ rã

Nếu không có qui định riêng thì tiến hành thử và đánh giá theo "Phương pháp thử độ rã viên nén và viên nang" - phần 5.10, trang 154 - 157.

Viên không cần thử độ rã khi phép thử độ hòa tan được thực hiện.

5.2.1.5. Độ hòa tan

Trong ĐĐVN III, nhiều chế phẩm thuốc viên đã yêu cầu đánh giá độ hòa tan. Khi có yêu cầu sẽ chỉ dẫn trong chuyên luận riêng.

Cách thử: Tiến hành theo "Phương pháp thử tốc độ hòa tan của viên nén và viên nang" - phần 5.9, trang 160 - 165.

5.2.1.6. Định tính

Tiến hành định tính theo các phương pháp được qui định trong tiêu chuẩn, viên nang phải cho các phản ứng của các hoạt chất có trong chế phẩm

5.2.1.7. Định lượng

Cân thuốc trong 20 viên, tính khối lượng trung bình viên, làm đồng nhất bằng cách nghiền (đối với viên nang chứa bột hoặc cốm) hoặc trộn đều (đối với nang chứa chất lỏng). Tiến hành định lượng theo các phương pháp được qui định trong tiêu chuẩn, hàm lượng của từng hoạt chất trong chế phẩm phải nằm trong giới hạn cho phép theo bảng 5.5.

Bảng 5.5. Giới hạn cho phép về hàm lượng đối với thuốc viên nang, viên nén

Lượng ghi trên nhãn	Phần trăm chênh lệch
Tới 50 mg	± 10
Trên 50 mg tới 100 mg	± 7,5
Trên 100 mg	± 5

5.2.1.8. Tạp chất (nếu có)

Khi có yêu cầu sẽ chỉ dẫn trong chuyên luận riêng.

5.2.2. Các loại viên nang

Các loại viên nang phải tuân theo yêu cầu chung của thuốc viên nang và yêu cầu riêng đối với từng loại.

Thuốc nang cứng phải đạt các yêu cầu chất lượng chung của viên nang.

5.2.2.1. Thuốc nang cứng

Thuốc nang cứng có vỏ nang gồm hai phần hình trụ lồng khít vào nhau, mỗi phần có một đầu kín, đầu kia hở. Thuốc đóng trong nang thường ở dạng rắn như bột hoặc cốm.

Ví dụ: Viên nang Cephalexin - DĐVN III. Trang 53 - 54.

5.2.2.2. Thuốc nang mềm

Thuốc nang mềm có vỏ nang là một khối mềm với các hình dạng khác nhau. Thuốc đóng trong nang thường ở dạng dung dịch, hỗn dịch hoặc nhũ tương.

Ví dụ: Viên nang mềm vitamin A - DĐVN III. Trang 291 - 292.

5.2.2.3. Thuốc nang tan trong ruột

Thuốc nang tan trong ruột là các nang cứng hoặc nang mềm có vỏ nang bền vững với dịch dạ dày, chỉ tan trong dịch ruột; hoặc các nang có đóng cốm được bao lớp chỉ tan trong dịch ruột.

5.2.2.4. Thuốc nang giải phóng hoạt chất đặc biệt

Thuốc nang giải phóng hoạt chất đặc biệt là các nang cứng hoặc nang mềm có vỏ nang hay thuốc trong nang hoặc cả vỏ nang và thuốc trong nang được bào chế đặc biệt, để kiểm soát hay chương trình hoá tốc độ hoặc vị trí giải phóng hoạt chất trong cơ thể.

Thuốc nang giải phóng hoạt chất đặc biệt phải đạt các yêu cầu chất lượng chung của viên nang, riêng “Độ rã” không phải thử và bắt buộc thử “Độ hòa tan” theo yêu cầu riêng của từng chuyên luận.

5.3. KIỂM NGHIỆM THUỐC VIÊN NÉN

5.3.1. Yêu cầu kỹ thuật và phương pháp thử

5.3.1.1. Tính chất

Viên nén thường có dạng hình trụ dẹt, hai đáy phẳng hoặc cong, có thể khắc chữ, ký hiệu hoặc rãnh. Cạnh và thành viên lành lặn. Màu sắc đồng nhất.

Cách thử: Bằng cảm quan.

5.3.1.2. Độ rã

Nếu không có qui định riêng thì tiến hành thử và đánh giá theo "Phép thử độ rã viên nén và viên nang" - phần 5.10, trang 154 - 157.

Viên không cần thử độ rã khi phép thử độ hòa tan được thực hiện.

5.3.1.3. Độ đồng đều khối lượng

Cân chính xác 20 viên bất kỳ và xác định khối lượng trung bình của viên. Cân riêng khối lượng từng viên và so sánh với khối lượng trung bình, tính độ lệch theo tỷ lệ phần trăm của khối lượng trung bình từ đó tính ra khoảng giới hạn của giá trị trung bình. Không được quá 2 viên có khối lượng chênh lệch quá khoảng giới hạn của khối lượng trung bình và không được có viên nào có chênh lệch quá gấp đôi độ lệch tính theo tỷ lệ phần trăm, theo bảng 5.6.

Bảng 5.6. Giới hạn cho phép chênh lệch khối lượng đối với viên nén

Khối lượng trung bình viên	Phần trăm chênh lệch
Tới 80 mg	± 10
Trên 80 mg đến 250 mg	± 7,5
Trên 250 mg	± 5

Nếu có yêu cầu thử độ đồng đều hàm lượng thì không phải thử độ đồng đều khối lượng.

5.3.1.4. Độ đồng đều hàm lượng

Nghiên mìn riêng từng viên và tiến hành thử và đánh giá như đối với thuốc bột.

5.3.1.5. Độ hòa tan

Chỉ thực hiện khi có yêu cầu được chỉ dẫn trong chuyên luận riêng.

Nếu không có qui định riêng thì tiến hành thử và đánh giá theo "Phép thử độ hòa tan của viên nén và viên nang" - phần 5.9, trang 149 - 154.

5.3.1.6. Định tính

Tiến hành định tính theo các phương pháp được qui định trong tiêu chuẩn, viên nén phải cho các phản ứng của các hoạt chất có trong chế phẩm.

5.3.1.7. Định lượng

Cân 20 viên, xác định khối lượng trung bình viên. Nghiên mìn. Tiến hành định lượng theo các phương pháp được qui định trong tiêu chuẩn, hàm lượng của từng hoạt chất trong chế phẩm phải nằm trong giới hạn cho phép, theo bảng 5.5.

5.3.1.8. Tạp chất (nếu có)

Khi có yêu cầu sẽ chỉ dẫn trong chuyên luận riêng.

5.3.2. Các loại viên nén

Các loại viên nén phải tuân theo yêu cầu chung của thuốc viên nén và yêu cầu riêng đối với từng loại.

5.3.2.1. Viên nén không bao (Uncoated tablets)

Gồm các viên nén được bào chế bằng cách nén các hạt gồm dược chất, tá dược. Viên nén loại này không chứa một thành phần nào để thay đổi sự giải phóng hoạt chất trong đường tiêu hóa. Khi bẻ gãy viên nén một lớp và quan sát bằng kính lúp thì thấy đồng nhất, không có lớp bao ngoài.

5.3.2.2. Viên bao (Coated tablets)

Viên bao có bề mặt nhẵn, thường có màu, được đánh bóng. Lấy một phần viên đã bẻ gãy, quan sát dưới kính lúp, thấy rõ nhân được bao bằng một lớp hay nhiều lớp.

5.3.2.3. Viên bao bên với dịch vị dạ dày (Gastro - resistant tablets)

Viên được bao bằng lớp bao bên với dịch vị dạ dày nhưng lại tan được trong dịch ruột do sử dụng các chất bao là cellacephate (cellulose acetat phtalate) và các polymer.

5.3.2.4. Viên nén sủi bọt (Effervescent tablets)

Là viên nén không bao có chứa các acid và carbonat hoặc hydrocarbonat, chúng phản ứng với nhau rất nhanh khi có mặt của nước và giải phóng CO₂, đồng thời hoà tan hay phân tán hoạt chất trong nước trước khi dùng.

5.3.2.5. Viên ngậm (Tablets for use in the mouth)

Viên ngậm thường là viên nén không bao được điều chế để các thành phần và hoạt chất giải phóng dần và tác dụng tại chỗ, giải phóng và hấp thụ ở dưới lưỡi hoặc ở các phần khác trong miệng.

5.3.2.6. Viên nén tan trong nước (Soluble tablets)

Viên nén tan trong nước là viên nén không bao, hòa tan trong nước. Dung dịch tạo thành có thể hơi đục nhẹ.

5.3.3.7. Viên nén phân tán trong nước (Dispersible tablets)

Viên nén phân tán trong nước là viên nén không bao phân tán trong nước thành các tiểu phân.

5.3.2.8. Viên nén thay đổi giải phóng hoạt chất (Modified release tablets)

Thường là viên bao hoặc không bao, được điều chế bằng cách thêm các tá dược đặc biệt hoặc điều chế theo phương pháp đặc biệt nhằm thay đổi tốc độ giải phóng hoặc vị trí giải phóng của thuốc.

Viên nén thay đổi giải phóng hoạt chất thường không yêu cầu thử độ rã mà phải thử tốc độ hòa tan.

Ví dụ: Viên nén acid ascorbic - ĐĐVN III trang 6

Viên bao ibuprofen - ĐĐVN III trang 141.

5.4. KIỂM NGHIỆM THUỐC TIÊM, THUỐC TIÊM TRUYỀN

Chế phẩm dùng để tiêm (parenteral preparations) có 5 loại là thuốc tiêm (injections), thuốc tiêm truyền (infusions), dung dịch đậm đặc dùng tiêm hoặc truyền (concentrates for injections and infusions), thuốc bột dùng tiêm hoặc truyền (powders for injections and infusions), thuốc cấy (implants).

Trong phạm vi của chương trình đại học, chúng tôi chỉ đề cập tới yêu cầu kỹ thuật và phương pháp kiểm nghiệm thuốc tiêm và thuốc tiêm truyền.

5.4.1. Tính chất

Dạng dung dịch nước hoặc dầu, nhũ dịch hoặc dịch treo, bột... tùy theo từng chế phẩm.

Cách thử: Bằng cảm quan.

5.4.2. Độ trong

Dung dịch để tiêm khi kiểm tra bằng mắt thường ở điều kiện qui định phải trong và hầu như không có tạp cơ học - Theo phụ lục 8.9, mục B - ĐĐVN III.

Dung dịch thuốc tiêm truyền tĩnh mạch có liều truyền từ 100ml trở lên phải đáp ứng yêu cầu về giới hạn kích thước và số lượng các tiểu phân - Theo phụ lục 8.9, mục A - ĐĐVN III.

Nhũ tương phải không thấy dấu hiệu của sự tách lớp.

Hỗn dịch để tiêm có thể lắng cặn nhưng phải phân tán ngay khi lắc đều và giữ được sự đồng đều khi lấy đủ liều ra khỏi ống thuốc tiêm.

5.4.3. Màu sắc

Không màu hoặc có màu do hoạt chất tùy theo từng chuyên luận. Tiến hành so với màu mẫu - Phụ lục 5.17 - ĐĐVN III.

5.4.4. pH

pH phải nằm trong giới hạn qui định.

Tiến hành đo pH bằng máy đo pH - Phụ lục 5.9 - ĐĐVN III.

5.4.5. Độ vô khuẩn

Thuốc tiêm phải vô khuẩn.

Cách thử: Nếu không có qui định riêng thì tiến hành thử và đánh giá theo "Thử vô trùng" - phần 4.3.3, trang 115 - 118.

5.4.6. Nội độc tố vi khuẩn

Phép thử nội độc tố vi khuẩn thực hiện khi có yêu cầu được qui định trong chuyên luận riêng. Thử theo Phụ lục 10.3 - ĐĐVN III.

Khi đã thử nội độc tố vi khuẩn thì không phải thử chất gây sốt, trừ khi có qui định khác.

5.4.7. Chất gây sốt

Thuốc tiêm phải không có chất gây sốt. Thử theo Phụ lục 10.5-ĐĐVN III.

Phép thử này được tiến hành đối với:

- Thuốc tiêm đóng liều đơn lẻ có thể tích từ 15 ml trở lên và không có qui định phép thử nội độc tố.
- Thuốc tiêm đóng liều đơn lẻ có thể tích nhỏ hơn 15 ml nhưng trên nhãn có ghi "không có chất gây sốt" và không có qui định phép thử nội độc tố.

5.4.8. Thể tích (Đối với thuốc tiêm, tiêm truyền dạng lỏng)

Cách thử: Thuốc tiêm được để thẳng bằng với nhiệt độ phòng và phải được phân tán đồng đều trước khi thử.

- Đối với thuốc tiêm có thể tích nhỏ hơn hoặc bằng 5 ml:
 - + Lấy 6 ống thuốc, tráng bơm tiêm bằng 1 ống, thử trên 5 ống.
 - + Kiểm tra bằng cảm quan 5 ống thuốc, thấy các ống thử chứa thể tích ngang nhau.
 - + Dùng bơm tiêm khô sạch có dung tích không lớn hơn 2,5 lần so với thể tích cần đo, có gắn kim tiêm thích hợp. Lấy thuốc sao cho trong bơm tiêm không có bọt khí và trong kim tiêm vẫn chứa đầy thuốc tiêm. Lần lượt lấy thuốc của từng ống tiêm theo cách đó.

Tính kết quả thể tích trung bình của 5 ống.

- Đối với thuốc tiêm có thể tích lớn hơn 5 ml, thuốc tiêm truyền:
 - + Lấy 4 ống thuốc, tráng bơm tiêm bằng 1 ống, thử trên 3 ống.
 - + Cách tiến hành như đối với thuốc tiêm có thể tích không lớn hơn 5 ml.

Tính kết quả thể tích trung bình của 3 ống.

- Đối với thuốc tiêm nhiều liều trong 1 lọ thì thể tích phải lớn hơn so với số liều qui định được lấy ra.

Thể tích của chế phẩm phải nằm trong giới hạn cho phép theo bảng 5.7.

Bảng 5.7. Giới hạn cho phép về thể tích của thuốc tiêm, thuốc tiêm truyền

Thể tích ghi trên nhãn (ml)	Phần trăm chênh lệch
Tới 5 ml	+ 15
Từ 5ml tới 50 ml.	+ 10
Trên 50 ml	+ 5

5.4.9. Độ đồng đều khối lượng (Đối với chế phẩm dạng bột)

Loại bỏ hết nhãn, rửa sạch và làm khô bên ngoài, loại bỏ hết các nút và cân ngay khối lượng cả thuốc và vỏ; lấy hết thuốc ra, dùng bông lau sạch, nếu cần thì rửa bằng nước, sau đó rửa bằng ethanol 96% rồi sấy ở 100 - 105°C trong 1 giờ; nếu vỏ đựng không chịu được nhiệt độ thì làm khô ở điều kiện

thích hợp và cân. Hiệu số khối lượng hai lần cân là khối lượng của thuốc. Làm như vậy với 9 đơn vị khác lấy bất kỳ.

Cho phép không quá một đơn vị có khối lượng chênh lệch khỏi bảng 5.2.

5.4.10. Độ đồng đều hàm lượng

Trừ khi có chỉ dẫn khác, chế phẩm có hàm lượng hoạt chất dưới 2 mg hoặc dưới 2% (kl/kl) so với khối lượng thuốc của toàn bộ. Thuốc tiêm, thuốc tiêm truyền dạng bột đóng gói có khối lượng nhỏ hơn hoặc bằng 40 mg.

Phép thử đồng đều hàm lượng được tiến hành sau phép thử định lượng và hàm lượng hoạt chất đã ở trong giới hạn quy định.

Cách thử: Lấy 10 đơn vị đóng gói nhỏ nhất bất kỳ, xác định hàm lượng hoạt chất từng ống theo phương pháp chỉ dẫn trong chuyên luận.

Cách đánh giá: Chế phẩm đạt yêu cầu phép thử nếu hàm lượng đều nằm trong giới hạn 85 - 115% của hàm lượng trung bình.

Chế phẩm không đạt yêu cầu nếu có quá 1 đơn vị có giá trị hàm lượng nằm ngoài giới hạn 85 - 115% của hàm lượng trung bình hoặc có một đơn vị có hàm lượng nằm ngoài giới hạn 75 - 125% của hàm lượng trung bình.

Nếu một đơn vị có giá trị hàm lượng nằm ngoài giới hạn 85 -115% nhưng ở trong giới hạn 75 - 125% của hàm lượng trung bình thì thử lại trên 20 đơn vị khác, lấy ngẫu nhiên. Chế phẩm đạt yêu cầu, nếu không quá 1 đơn vị trong tổng số 30 đơn vị đem thử có giá trị hàm lượng nằm ngoài giới hạn 85 -115% của hàm lượng trung bình và không có đơn vị nào có giá trị hàm lượng nằm ngoài giới hạn 75 - 125% của hàm lượng trung bình.

5.4.11. Định tính

Tiến hành định tính theo các phương pháp được qui định trong tiêu chuẩn, thuốc tiêm và thuốc tiêm truyền phải cho các phản ứng của các hoạt chất có trong chế phẩm theo từng chuyên luận.

5.4.12. Định lượng

Lấy thuốc trong số lọ thuốc như đối với phép thử “thể tích” (chế phẩm dạng lỏng) hoặc như đối với phép thử “độ đồng đều khối lượng” (chế phẩm dạng bột), trộn đồng nhất. Tiến hành định lượng theo các phương pháp được qui định trong tiêu chuẩn, hàm lượng của từng hoạt chất trong chế phẩm phải nằm trong giới hạn cho phép theo bảng 5.8.

Bảng 5.8. Giới hạn cho phép về hàm lượng đối với thuốc tiêm, thuốc tiêm truyền

Lượng ghi trên nhãn	Phần trăm chênh lệch
Dạng dung dịch	± 5
Dạng bột	± 10

5.5. KIỂM NGHIỆM THUỐC NHỎ MẮT

5.5.1. Tính chất:

Thể chất, màu sắc tùy theo từng chuyên luận.

Cách thử: Bằng cảm quan.

5.5.2. Độ trong

Thuốc nhỏ mắt dạng dung dịch phải trong, không có các tiểu phân khi quan sát bằng mắt thường và đạt yêu cầu về độ trong theo từng chuyên luận.

Thuốc nhỏ mắt dạng hỗn dịch có thể lắng đọng, nhưng khi lắc phải phân tán dễ dàng và đồng nhất trong toàn khối.

Cách xác định: Độ trong được xác định bằng cách so sánh các dung dịch đó với các hỗn dịch mẫu đối chiếu. Thử theo phụ lục 5.12 - ĐĐVN III.

5.5.3. Thể tích

Thể tích thuốc nhỏ mắt phải nằm trong giới hạn 100 - 110% so với thể tích ghi trên nhãn đối với mọi thể tích đóng gói.

Cách thử: Lấy 5 đơn vị đóng gói bất kỳ. Xác định thể tích của từng đơn vị bằng bơm tiêm chuẩn hoặc ống đong chuẩn sạch, khô, có độ chính xác phù hợp (Thể tích không lớn hơn 2,5 lần thể tích cần xác định).

Thể tích mỗi đơn vị phải nằm trong giới hạn cho phép.

Nếu có một đơn vị không đạt thì phải kiểm tra lại lần thứ hai giống như lần đầu. Nếu lần thứ hai có quá một đơn vị không đạt thì lô thuốc không đạt yêu cầu.

5.5.4. pH

pH phải nằm trong giới hạn qui định.

Đo bằng máy đo pH - Phụ lục 5. 9 - ĐĐVN III.

5.5.5. Độ vô khuẩn

Thuốc nhỏ mắt phải vô khuẩn.

Cách thử: Nếu không có qui định riêng thì tiến hành thử và đánh giá theo "Thử vô trùng" – phần 4.3.3, trang 115 - 118.

5.5.6. Giới hạn các tiểu phân

Thử nghiệm này chỉ yêu cầu đối với thuốc nhỏ mắt dạng hỗn dịch.

Cho một thể tích chế phẩm thích hợp vào cốc đo hay vật kính của kính hiển vi. Quan sát bằng kính hiển vi một diện tích tương ứng 10 μg pha rắn.

Kết quả:

- Không được có quá 20 tiểu phân có kích thước lớn hơn 25 μm .
- Không được có quá 2 tiểu phân có kích thước lớn hơn 50 μm .
- Không được có tiểu phân nào có kích thước lớn hơn 90 μm .

5.5.7. Định tính

Tiến hành định tính theo các phương pháp được quy định trong tiêu chuẩn, thuốc nhỏ mắt phải cho các phản ứng của các hoạt chất có trong chế phẩm.

5.5.8. Định lượng

Lấy thuốc của 5 đơn vị đóng gói nhỏ nhất bất kỳ, trộn đều. Tiến hành định lượng theo các phương pháp được quy định trong tiêu chuẩn, hàm lượng của từng hoạt chất trong chế phẩm phải nằm trong giới hạn cho phép quy định trong chuyên luận.

5.6. KIỂM NGHIỆM THUỐC UỐNG DẠNG LỎNG

5.6.1. Yêu cầu kỹ thuật và phương pháp thử

5.6.1.1. Tính chất

Thế chất, màu sắc, mùi vị tùy theo từng chuyên luận.

Cách thử: Bằng cảm quan.

5.6.1.2. Độ trong

Thuốc uống dạng dung dịch phải đạt yêu cầu về độ trong theo từng chuyên luận.

Cách xác định: Giống như đối với thuốc nhỏ mắt.

5.6.1.3. Thế tích

Cách xác định: Giống như đối với thuốc nhỏ mắt.

Thế tích thuốc phải nằm trong giới hạn cho phép theo bảng 5.9.

5.6.1.4. pH

Một số chế phẩm có yêu cầu thì pH phải nằm trong giới hạn quy định.

Đo bằng máy đo pH - Phụ lục 5.9 - ĐĐVN III.

Bảng 5.9. Giới hạn cho phép thể tích thuốc uống dạng lỏng

Dạng thuốc	Thể tích ghi trên nhãn (ml)	Phần trăm chênh lệch
Thuốc nước để uống	Tới 20	+ 10
	Trên 20 - 50	+ 8
	Trên 50 - 150	+ 6
	Trên 150	+ 4
Siro	Tới 100	+ 10
	Trên 100 - 250	+ 8
	Trên 250	+ 6

5.6.1.5. Độ nhiễm khuẩn

Độ nhiễm khuẩn phải đạt giới hạn qui định cho chế phẩm theo từng chuyên luận.

Cách thử: Nếu không có qui định riêng thì tiến hành thử và đánh giá theo "Thử giới hạn vi sinh vật" - phần 4.3.4, trang 119-121.

5.6.1.6. Tỷ trọng

Tỷ trọng của chế phẩm phải nằm trong giới hạn qui định theo từng chuyên luận.

Cách thử: Theo "Xác định tỷ trọng chất lỏng" - phụ lục 5.15 - ĐĐVN III.

5.6.1.7. Độ đồng đều hàm lượng

Một số chế phẩm yêu cầu thì phải tiến hành phép thử này.

Cách thử và đánh giá giống như đối với thuốc bột.

5.6.1.8. Định tính

Tiến hành định tính theo các phương pháp được qui định trong tiêu chuẩn, chế phẩm thuốc phải cho các phản ứng của các hoạt chất có trong chế phẩm.

5.6.1.9. Định lượng

Lấy thuốc của 5 đơn vị đóng gói nhỏ nhất bất kỳ, trộn đều. Tiến hành định lượng theo các phương pháp được qui định trong tiêu chuẩn, hàm lượng của từng hoạt chất trong chế phẩm phải nằm trong giới hạn cho phép theo bảng 5.10.

5.6.2. Các dạng thuốc uống dạng lỏng

Thuốc uống dạng lỏng phải đạt yêu cầu tiêu chuẩn kỹ thuật chung đối với thuốc uống dạng lỏng và yêu cầu riêng tùy từng chuyên luận.

Bảng 5.10. Giới hạn cho phép về hàm lượng đối với thuốc uống dạng lỏng

Dạng thuốc	Phần trăm chênh lệch
Thuốc đặc A, B	± 5
Thuốc thường	± 10

5.6.2.1. Cồn thuốc

Cồn thuốc là những chế phẩm lỏng được điều chế bằng cách ngâm chiết dược liệu thực vật, động vật hoặc bằng cách hòa tan cao thuốc, dược chất theo tỷ lệ qui định trong ethanol ở các nồng độ khác nhau.

5.6.2.2. Siro

Siro là dung dịch đậm đặc (không dưới 60%) của đường trắng (Saccharose) trong nước, có chứa các dược chất hoặc các dịch chiết từ dược liệu và các chất làm thơm.

5.6.2.3. Potio

Potio là dạng thuốc nước có vị ngọt, chứa một hay nhiều dược chất, dùng uống từng thìa. Potio có thể ở dạng hỗn dịch hoặc nhũ dịch.

Dung môi của potio có thể là nước, nước thơm, nước hãm hay nước sắc dược liệu. Potio thường chứa 20% siro.

5.6.2.4. Dung dịch uống (Oral solution)

Dung dịch uống là những chế phẩm lỏng trong suốt, chứa một hay nhiều dược chất hòa tan trong một dung môi hay hỗn hợp nhiều dung môi thích hợp dùng bằng cách uống.

Dung môi của dung dịch có thể là nước, dầu, ethanol, glycerin...

5.6.2.5. Thuốc uống giọt (Oral drop)

Thuốc uống giọt là thuốc uống được dùng với thể tích nhỏ bằng dụng cụ phân liều là ống nhỏ giọt.

5.6.3. Dung dịch thuốc dùng ngoài dạng lỏng

Thuốc dùng ngoài dạng lỏng là các chế phẩm lỏng đồng nhất, thường là dung dịch, cồn thuốc, hỗn dịch hoặc nhũ dịch của một hay nhiều hoạt chất trong chất dẫn thích hợp để dùng ngoài.

Các thuốc dùng ngoài dạng lỏng phải đạt theo các yêu cầu kỹ thuật chung của thuốc uống dạng lỏng và riêng từng dạng thuốc có những yêu cầu riêng. Riêng yêu cầu "độ nhiễm khuẩn" không phải làm.

5.7. KIỂM NGHIỆM THUỐC MỠ

5.7.1. Yêu cầu kỹ thuật và phương pháp thử

5.7.1.1. Tính chất

- Thể chất: thuốc mỡ phải mịn, đồng nhất, không cứng lại hoặc tách lớp ở điều kiện thường, không chảy lỏng ở nhiệt độ 37°C và phải bắt dính được trên da hay niêm mạc khi bôi.
- Màu sắc, mùi: tùy từng chế phẩm.

Cách thử: Bằng cảm quan.

5.7.1.2. Độ đồng đều khối lượng

Cách thử và đánh giá: Giống như đối với thuốc bột. Độ chênh lệch khối lượng phải đạt theo bảng 5.11.

Bảng 5.11. Giới hạn cho phép chênh lệch khối lượng đối với thuốc mỡ

Khối lượng ghi trên nhãn (gam)	Phần trăm chênh lệch
Dưới 10,0	± 15
Từ 10,0 - 20,0	± 10
Trên 20,0 - 50,0	± 8
Trên 50,0	± 5

5.7.1.3. Độ đồng nhất

Các tiểu phân phải phân tán đồng đều.

Cách thử: Lấy 4 đơn vị đóng gói, mỗi đơn vị khoảng 0,02 -0,03 g, trải chế phẩm lên 4 tiêu bản, bên trên đặt một phiến kính. Đậy mỗi phiến kính bằng một phiến kính khác và ép mạnh cho đến khi tạo thành một vết có đường kính khoảng 2 cm. Quan sát vết thu được bằng mắt thường, 3 trong 4 tiêu bản không được nhận thấy các tiểu phân. Nếu có các tiểu phân nhìn thấy ở trong phần lớn số các vết thì phải làm lại với 8 đơn vị đóng gói. Trong số các tiêu bản này, các tiểu phân cho phép nhận thấy không được vượt quá 2 tiêu bản.

5.7.1.4. Định tính

Tiến hành định tính theo các phương pháp được qui định trong tiêu chuẩn, thuốc mỡ phải cho các phản ứng của các hoạt chất có trong chế phẩm.

5.7.1.5. Định lượng

Cân thuốc trong 5 đơn vị đóng gói nhỏ nhất, tính khối lượng trung bình, trộn đồng nhất. Cân một lượng chế phẩm như chỉ dẫn trong chuyên luận,

tiến hành định lượng. Hàm lượng hoạt chất phải nằm trong giới hạn qui định theo bảng 5.12.

Bảng 5.12. Giới hạn cho phép về hàm lượng đối với thuốc mỡ

Nồng độ hàm lượng ghi trên nhãn	Phần trăm chênh lệch
Tới 200 mg	± 15
Trên 200 mg - 1 g	± 10
Trên 1 - 5 g	± 7,5
Trên 5 g	± 3

5.7.2. Thuốc mỡ tra mắt

Đạt các yêu cầu của thuốc mỡ và những yêu cầu riêng của thuốc mỡ tra mắt như sau:

5.7.2.1. Độ vô khuẩn

Thuốc mỡ tra mắt phải vô khuẩn và không được có *Staphylococcus aureus* và *Pseudomonas aeruginosa*.

Cách thử: Nếu không có qui định riêng thì tiến hành thử và đánh giá theo "Thử vô trùng" - phần 4.3.3, trang 115-118.

5.7.2.2. Các phần tử kim loại

Số lượng các phần tử kim loại phải nằm trong giới hạn cho phép.

Cách thử: Lấy 10 ống thuốc, bóp hết thuốc chứa bên trong vào từng đĩa petri riêng có đường kính 6 cm, đáy bằng, không có các vết xước và các phần tử lạ nhìn thấy được. Đậy các đĩa, đun nóng đến 80 -85°C trong 2 giờ và để cho thuốc mỡ phân tán đồng đều. Làm nguội và làm đông lạnh thuốc mỡ, lật ngược mỗi đĩa đặt lên bản soi của kính hiển vi thích hợp; chiếu sáng từ trên xuống bằng một ngọn đèn chiếu đặt ở góc 45° so với mặt phẳng của bản soi. Quan sát và đếm các phần tử kim loại sáng bóng, lớn hơn 50 µm ở bất kỳ kích thước nào. Không được có quá một ống trong 10 ống thuốc đem thử chứa nhiều hơn 8 phần tử và không được quá 50 phần tử tìm thấy trong 10 ống. Nếu chế phẩm không đạt ở lần thử thứ nhất thì làm lại lần thứ hai với 20 ống thuốc khác. Mẫu thử được coi là đạt yêu cầu nếu không có quá 3 ống chứa quá 8 phần tử trong mỗi ống và tổng số không quá 150 phần tử trong 30 ống thử.

5.7.2.3. Giới hạn kích thước các phần tử

Không được có phần tử nào của thuốc có kích thước lớn hơn 75 µm.

Cách thử: Trải một lượng nhỏ chế phẩm thành một lớp mỏng trên bản soi của kính hiển vi, phủ phiến kính lên trên và soi.

5.8. KIỂM NGHIỆM THUỐC ĐẠN, THUỐC TRỨNG

5.8.1. Tính chất

Thuốc đạn có hình nón hoặc hình con suốt, khối lượng 1 - 3 g, dài 3- 4 cm. Thuốc trứng có hình cầu hoặc hình trái xoan, khối lượng 2 - 4 g.

Thế chất, màu sắc, mùi đạt theo chuyên luận riêng.

Cách thử: Bằng cảm quan.

5.8.2. Độ đồng đều khối lượng

Cách thử: Như đối với viên nén

Đánh giá kết quả: Khối lượng của mỗi viên (ở mọi khối lượng) phải nằm trong khoảng khối lượng trung bình $\pm 5\%$.

Cho phép không quá 2 đơn vị lệch ra ngoài giới hạn, nhưng không được có đơn vị nào lệch gấp hai lần giới hạn cho phép.

5.8.3. Độ rã

Độ rã của thuốc đạn và thuốc trứng là khả năng tan rã hoặc mềm ra của thuốc đạn và thuốc trứng trong môi trường thử, bằng thiết bị thử độ rã đã được qui định trong thời gian nhất định đã được qui định ở từng chuyên luận.

Cách tiến hành: Thử trên 3 viên, theo phụ lục 8.5 - ĐDVN III.

Mẫu thử được coi là đạt yêu cầu về độ rã

Đối với thuốc đạn:

- Hòa tan hoàn toàn; hoặc
- Phân tán thành những tiểu phân và tập trung trên mặt nước (các chất mỡ), chìm xuống đáy (bột không tan) hay hòa tan trong nước (thành phần hòa tan được); hoặc
- Trở nên mềm ra kèm theo biến dạng mà không nhất thiết phải bị phân tán hoàn toàn thành những tiểu phân, nhưng khi dùng đĩa thủy tinh chọc vào thì phải không được có nhân rắn.

Thuốc đạn có tá dược thân mỡ phải rã trong thời gian dưới 30 phút.

Thuốc đạn tan trong nước phải rã trong thời gian dưới 60 phút.

Đối với viên nang đặt trực tràng:

Vỏ nang gelatin vỡ ra và giải phóng các chất chứa bên trong.

Thời gian rã phải trong vòng 30 phút.

Đối với thuốc trứng:

Vỏ nang gelatin vỡ ra và giải phóng các chất chứa bên trong.

Thời gian rã phải trong vòng 30 phút.

Đối với viên nén đặt âm đạo:

- Không được còn cặn trên đĩa kim loại; hoặc
- Nếu còn cặn trên đĩa kim loại thì đó chỉ là khối mềm hay rỗng xốp, khi dùng đũa thủy tinh chọc vào thì phải không được có nhân rắn.

Thời gian rã phải trong vòng 30 phút.

5.8.4. Định tính

Tiến hành định tính theo các phương pháp được qui định trong tiêu chuẩn, thuốc đạn và thuốc trứng phải cho các phản ứng của các hoạt chất có trong chế phẩm.

5.8.5. Định lượng

Cân thuốc trong 20 viên, tính khối lượng trung bình viên, làm đồng nhất. Tiến hành theo phương pháp qui định trong tiêu chuẩn, hàm lượng của từng hoạt chất trong chế phẩm phải nằm trong giới hạn cho phép như ở bảng 5.5.

5.9. PHÉP THỬ ĐỘ HOÀ TAN CỦA VIÊN NÉN VÀ VIÊN NANG

(Dissolution test for tablets and capsules)

5.9.1. Khái niệm

Độ hoà tan của một chế phẩm là tỷ lệ hoạt chất được giải phóng ra khỏi dạng thuốc theo thời gian với các điều kiện qui định trong từng chuyên luận.

Với mỗi chế phẩm có các qui định cụ thể về thiết bị thử, môi trường hòa tan, thời gian thử nghiệm và phần trăm hoạt chất được giải phóng (Chỉ số Q).

5.9.2. Thiết bị

Tùy thiết bị có thể có một bình hoặc 6 - 8 bình thử.

5.9.2.1. Thiết bị kiểu giỏ quay (Basket apparatus)

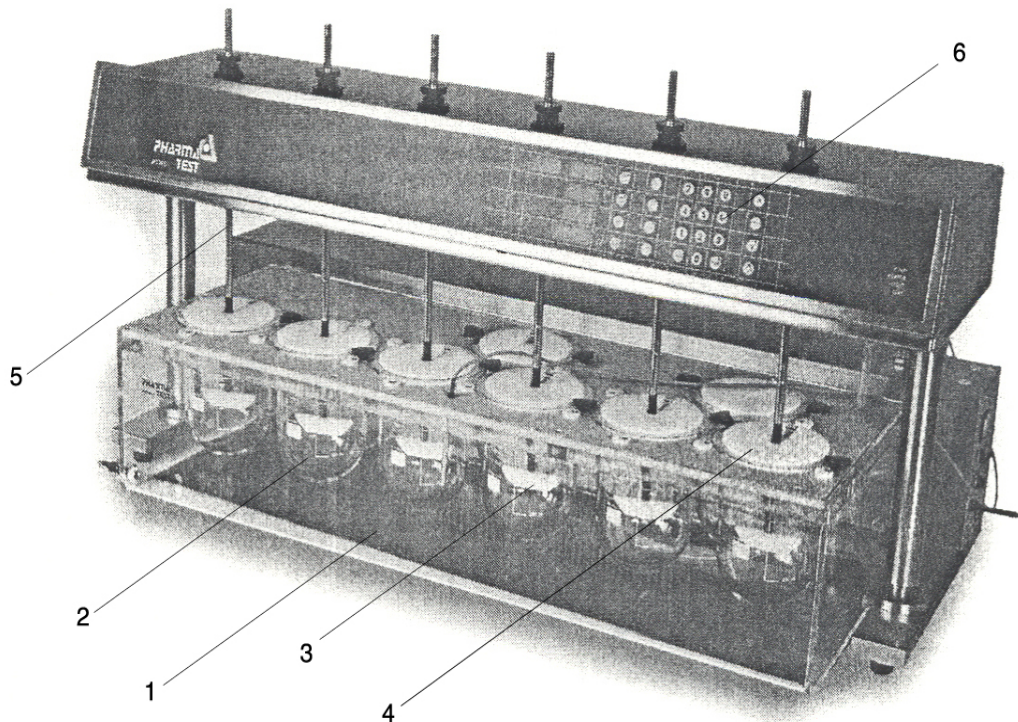
Thiết bị bao gồm:

1. Một cốc hình trụ C bằng thủy tinh borosilicat hoặc bằng chất liệu trong suốt thích hợp, có đáy hình bán cầu và có dung tích 1000ml, hình 5.1 và hình 5.2. Miệng bình có viền rộng, được đậy bằng nắp có một số lỗ nhỏ, trong đó có một lỗ ở tâm của nắp.

2. Một động cơ với bộ phận điều tốc có khả năng duy trì tốc độ quay của giỏ trong phạm vi $\pm 4\%$ tốc độ đặt. Động cơ này gắn với một bộ phận khuấy bao gồm trục quay A và giỏ hình ống trụ B. Trụ kim loại phải quay được một cách nhẹ nhàng, không bị lắc lư nhiều trong khi quay. Bộ phận giỏ gồm có 2 phần:

- Phần nắp trên có một lỗ thoát nhỏ được gắn với trục. Nắp này được lắp 3 cái nhíp đàn hồi, hoặc bằng cách thích hợp để có thể giữ chắc chắn phần dưới của giỏ đồng trục với trục của bình trong khi quay và có thể tháo phần dưới ra dễ dàng khi cần cho chế phẩm thử vào giỏ.
- Phần dưới tháo lắp được là một giỏ hình ống trụ được làm bằng vải rây kim loại, mép khâu được hàn liền, đường kính sợi dây là 0,254 mm, có cạnh hình vuông của lỗ rây là 0,381 mm; giỏ hình ống trụ này có vành kim loại bao quanh đáy trên và đáy dưới. Giỏ có thể được mạ một lớp vàng kim loại dày 2,5 μm để không bị hỏng khi thử trong môi trường acid. Khoảng cách từ giỏ đến đáy trong của bình luôn được giữ trong khoảng 23 - 27 mm trong quá trình thử.

3. Một chậu cách thủy để duy trì môi trường hoà tan ở nhiệt độ $37^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$.



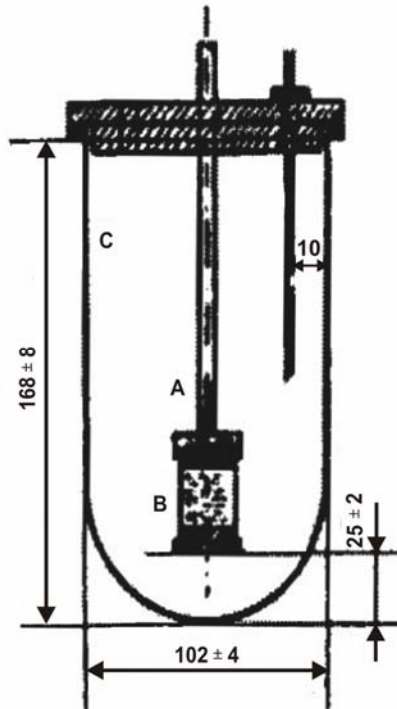
Hình 5.1. Thiết bị thử độ hòa tan của viên nén, viên nang của Pharma TEST

- | | |
|------------------------------|-----------------------|
| 1. Bể điều nhiệt | 4. Đĩa đáy |
| 2. Cốt đỡ môi trường hòa tan | 5. Trục khuấy |
| 3. Cánh khuấy | 6. Bộ phận điều khiển |

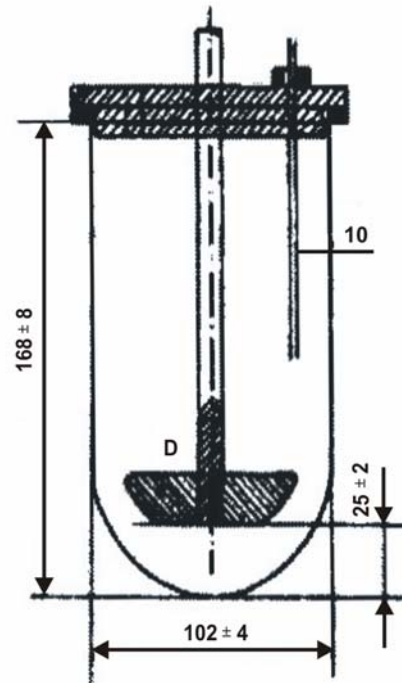
5.9.2.2. Thiết bị kiểu cánh khuấy (Paddle apparatus)

Thiết bị này giống như thiết bị giỏ quay mô tả ở trên, chỉ khác là giỏ được thay bằng cánh khuấy D hình 5.1 và hình 5.3. Cánh khuấy được lắp đặt sao

cho đi qua tâm của trục và cạnh dưới của nó ngang bằng với mặt đáy của trục. Trục cánh khuấy được lắp đặt ở vị trí sao cho không lệch quá 2 mm so với trục của bình và cạnh đáy của cánh khuấy cách mặt đáy trong của bình từ 23 - 27 mm. Thiết bị được vận hành sao cho cánh khuấy quay tròn một cách nhẹ nhàng và không có rung động rõ rệt.



Hình 5.2. Thiết bị kiểu giỏ quay
(kích thước tính bằng mm)



H. 5.3. Thiết bị kiểu cánh khuấy
(kích thước tính bằng mm)

5.9.3. Cách thử

5.9.3.1. Chuẩn bị môi trường hòa tan

Môi trường hòa tan được chỉ dẫn trong từng chuyên luận riêng. Nếu là dung dịch đậm thì pH phải điều chỉnh để sai khác không quá 0,05 đơn vị. Môi trường hòa tan phải loại khí trước khi dùng.

Cho một thể tích quy định môi trường hòa tan đã đuổi khí vào bình (thể tích qui định $\pm 1\%$). Làm ấm môi trường hòa tan đến nhiệt độ $37 \pm 0,5$ °C.

5.9.3.2. Cho viên vào thiết bị thử

Nếu không có chỉ dẫn gì khác thì thử đồng thời trên 6 viên, cho mỗi viên vào một bình trụ hoặc một giỏ quay.

- *Khi dùng thiết bị giỏ quay:* Cho viên nén hay viên nang vào trong giỏ khô. Hạ thấp giỏ vào đúng vị trí rồi cho giỏ quay.

- *Khi dùng thiết bị kiểu cánh khuấy*: Cho viên nén hay viên nang chìm xuống đáy bình trước khi cho cánh khuấy quay; có thể dùng một dây xoắn bằng kim loại hay thủy tinh để giữ cho viên thuốc nằm ngang dưới đáy bình. Cần loại trừ bọt không khí khỏi bề mặt viên.

5.9.3.3. Vận hành thiết bị

Vận hành thiết bị ngay ở tốc độ quay được chỉ dẫn trong chuyên luận riêng.

5.9.3.4. Lấy mẫu

Tuỳ theo chỉ dẫn ở chuyên luận mà lấy mẫu ra để thử ở phút thứ 45 hoặc sau những khoảng thời gian quy định, hoặc lấy mẫu ra liên tục; cho phép chênh lệch so với thời gian qui định là $\pm 2\%$. Vị trí hút mẫu ở khoảng giữa bề mặt môi trường hoà tan và mặt trên của giỏ quay hay cạnh trên của cánh khuấy; điểm này phải cách thành bình ít nhất 10 mm. Trừ trường hợp phân tích mẫu liên tục, do mẫu tự động khi đó mẫu lấy ra sau khi phân tích lại trở về bình hoà tan, cũng như trong trường hợp lấy mẫu phân tích một lần; còn các trường hợp khác phải thêm một thể tích môi trường hoà tan bằng thể tích mẫu thử đã lấy ở nhiệt độ $37 \pm 0,5^\circ\text{C}$, hoặc có thể dùng phép tính hiệu chỉnh.

5.9.3.5. Xác định lượng hoạt chất

Mẫu thử lấy ra có thể được lọc bằng giấy lọc, màng lọc hoặc thiết bị thích hợp. Dung dịch thu được có thể được dùng riêng biệt hoặc gộp lại để xác định phần trăm hoạt chất giải phóng.

Xác định lượng hoạt chất chứa trong dịch lọc bằng phương pháp được chỉ dẫn trong chuyên luận riêng.

5.9.3.6. Đánh giá kết quả

- Lượng hoạt chất được giải phóng của cả 6 viên thử phải không dưới 70% lượng hoạt chất qui định, trừ khi có chỉ dẫn trong chuyên luận riêng. Nếu có 1 viên không đạt thì thử với 6 viên khác, lần này cả 6 viên đều phải đạt yêu cầu (theo ĐĐVN III).
- Hoặc phần trăm dược chất giải phóng so với hàm lượng ghi trên nhãn được đánh giá theo bảng 5.13 và bảng 5.14 (theo USP 24).
- Nếu vỏ viên nang ảnh hưởng tới kết quả phân tích, lấy ít nhất 6 viên nang, loại bỏ toàn lượng thuốc trong nang, hoà tan vỏ nang rỗng trong một thể tích môi trường hoà tan được chỉ dẫn trong chuyên luận rồi tính hiệu chỉnh. Hệ số hiệu chỉnh không được lớn hơn 25% hàm lượng ghi trên nhãn.

Bảng 5.13. Giới hạn về phần trăm được chất giải phóng đối với viên nén, viên nang đánh giá theo từng viên (Theo USP 24 - trang 1943)

Lần	Số viên thử	Yêu cầu kết quả (Phần trăm hoạt chất hòa tan)	Kết luận - Giải pháp
1	6	Mỗi viên phải $\geq Q + 5\%$	– Đạt: Mẫu thử đạt yêu cầu về độ hòa tan. Dừng thử nghiệm. – Không đạt: Làm lần 2
2	6	Trung bình của 12 viên phải $\geq Q$ và không có viên nào $< Q - 15\%$	– Đạt: Mẫu thử đạt yêu cầu về độ hòa tan. Dừng thử nghiệm. – Không đạt: Làm lần 3
3	12	Trung bình của 24 viên phải $\geq Q$ và có dưới hai viên $< Q - 15\%$ và không có viên nào $< Q - 25\%$	– Đạt: Mẫu thử đạt yêu cầu về độ hòa tan. – Không đạt: Mẫu thử không đạt yêu cầu về độ hòa tan.

Bảng 5.14. Giới hạn về phần trăm được chất giải phóng đối với viên nén, viên nang đánh giá theo cách gộp dịch lọc của các viên thử (Theo USP 24 - trang 1943)

Lần	Số viên thử	Yêu cầu kết quả (Phần trăm hoạt chất hòa tan)	Kết luận - Giải pháp
1	6	Trung bình của 6 viên phải $\geq Q + 10\%$	– Đạt: Mẫu thử đạt yêu cầu về độ hòa tan. Dừng thử nghiệm. – Không đạt: Làm lần 2
2	6	Trung bình của 12 viên phải $\geq Q + 5\%$	– Đạt: Mẫu thử đạt yêu cầu về độ hòa tan. Dừng thử nghiệm. – Không đạt: Làm lần 3
3	12	Trung bình của 24 viên phải $\geq Q$.	– Đạt: Mẫu thử đạt yêu cầu về độ hòa tan. – Không đạt: Mẫu thử không đạt yêu cầu về độ hòa tan.

5.9.4. Thử tốc độ hòa tan của viên nén và viên nang bao tan ở ruột

Tiến hành các bước như trên. Riêng môi trường và thời gian như sau:

- Giai đoạn 1: dùng 1000 ml dung dịch acid hydrocloric 0,1 M làm chất lỏng. Thử trong 2 giờ.
- Giai đoạn 2: 1000ml dung dịch đệm phosphat pH 6,8. Thử trong 45 phút.

Đánh giá kết quả:

- + Lượng hoạt chất được giải phóng của cả 6 viên thử phải không dưới 70% lượng hoạt chất qui định, trừ khi có chỉ dẫn trong chuyên luận riêng. Nếu có 1 viên không đạt thì thử với 6 viên khác, lần này cả 6 viên đều phải đạt yêu cầu (theo ĐĐVN III).

Hoặc

Trong môi trường acid hydrocloric 0,1 M: theo bảng 5.15.

Trong môi trường đệm pH 6,8: Đánh giá như ở bảng 5.13 và 5.14.

Bảng 5.15. Giới hạn về phần trăm được chất giải phóng đối với viên bao, viên nang tan trong ruột (môi trường thử là HCl 0,1M) - Theo USP 24 - trang 1947

L	Số viên thử	Yêu cầu kết quả (Phần trăm hoạt chất hòa tan)	Kết luận - Giải pháp
1	6	Không có viên nào vượt 10% so với hàm lượng ghi trên nhãn	- Đạt: Mẫu thử đạt yêu cầu. Dừng thử nghiệm. - Không đạt: Làm lần 2
2	6	Trung bình của 12 viên phải nhỏ hơn 10% so với hàm lượng ghi trên nhãn	- Đạt: Mẫu thử đạt yêu cầu. Dừng thử nghiệm. - Không đạt: Làm lần 3
3	12	Trung bình của 24 viên phải nhỏ hơn 10% so với hàm lượng ghi trên nhãn	- Đạt: Mẫu thử đạt yêu cầu. - Không đạt: Mẫu thử không đạt yêu cầu về độ hòa tan.

Vi dụ:

- *Viên nang Cephalexin* (ĐĐVN III, trang 53 - 54)

Thiết bị: Giỏ quay

Môi trường hòa tan: 1000 ml nước

Tốc độ: 100 vòng/ phút

Thời gian: 45 phút

Lấy và xử lý mẫu: Lọc dung dịch sau khi hòa tan. Pha loãng dịch lọc bằng nước để được dung dịch cephalexin có nồng độ 25 µg/ml.

Đo độ hấp thụ của dung dịch thu được ở bước sóng 262 nm với mẫu trắng là nước.

Song song làm một mẫu chuẩn cephalexin có cùng nồng độ.

Yêu cầu: Không được ít hơn 80% lượng cephalexin ($C_{16}H_{17}N_3O_4S$) ghi trên nhãn được hòa tan trong 45 phút.

- *Viên bao Ibuprofen* (ĐĐVN III, trang 141)

Thiết bị: Cánh khuấy

Môi trường hòa tan: 900 ml dung dịch đệm phosphat pH 7,2 (Phối hợp 250 ml dung dịch KH_2PO_4 0,2 M với 175 ml dung dịch NaOH 0,2 M, thêm nước vừa đủ 1000 ml).

Tốc độ: 50 vòng/ phút

Thời gian: 60 phút

Lấy và xử lý mẫu: Lọc dung dịch sau khi hòa tan. Pha loãng dịch lọc với dung dịch đệm phosphat pH 7,2 để được dung dịch ibuprofen có nồng độ thích hợp.

Đo độ hấp thụ của dung dịch thu được ở bước sóng 221 nm trong cuvet thạch anh có chiều dày 1 cm với mẫu trắng là dung dịch đệm phosphat pH 7,2.

Tính hàm lượng ibuprofen theo A (1%, 1cm) là 449 ở bước sóng 221 nm.

Yêu cầu: Không được ít hơn 85% lượng ibuprofen ($C_{13}H_{18}O_2$) ghi trên nhãn được hòa tan trong 60 phút.

5.10. THỬ ĐỘ RÃ CỦA VIÊN NÉN VÀ VIÊN NANG

(Disintegration test for tablets and capsules)

5.10.1. Khái niệm

Độ rã của viên nén, viên nang là khả năng tan rã của chúng trong môi trường thử theo qui định (thường là nước), bằng thiết bị thử độ rã đã được qui định (Máy thử độ rã Erweka hay một thiết bị tương đương) trong thời gian nhất định đã được qui định ở từng chuyên luận.

5.10.2. Thiết bị

Thiết bị bao gồm: (Hình 5.4, hình 5.5)

1. Một giá đỡ ống thử thích hợp, đỡ 6 ống thủy tinh hình trụ có chiều dài 75,0 - 80,0 mm, đường kính trong 21,5 mm và chiều dày thành ống khoảng 2 mm.

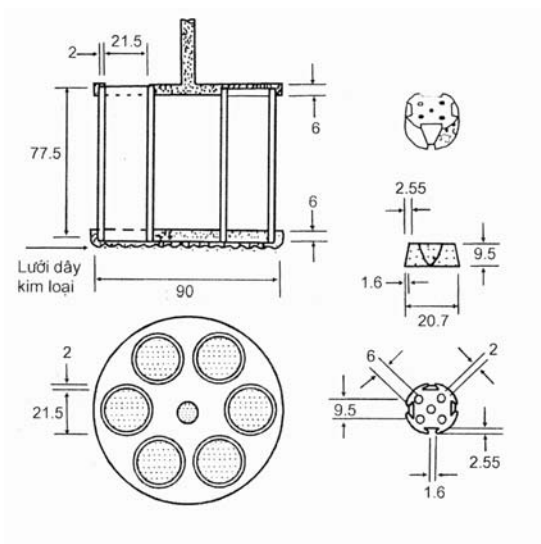
2. Một đĩa hình trụ đặt trên mỗi ống, có đường kính 20,55 - 20,85 mm và chiều dày 9,35 - 9,65 mm, được làm bằng chất dẻo trong suốt có tỷ trọng 1,18 - 1,20. Đĩa có 5 lỗ hồng, đường kính mỗi lỗ là 2 mm, 1 lỗ ở giữa còn 4 lỗ còn lại đặt cách đều nhau trên một vòng tròn có bán kính 6 mm từ tâm đĩa. Có 4 rãnh cách đều nhau được cắt bên cạnh đĩa sao cho ở mặt trên đĩa, rãnh có chiều rộng 9,5 mm, chiều sâu 2,55 mm; ở mặt dưới của đĩa, rãnh là hình vuông có cạnh 1,6 mm.

3. Các ống được giữ ở vị trí thẳng đứng trong 6 lỗ trống của 2 tấm nhựa cứng trong suốt có đường kính 90 mm và chiều dày 6 mm. Các lỗ cách đều nhau và cách đều tâm. Mặt dưới của tấm nhựa phía dưới được gắn 1 tấm lưới đan bằng các sợi thép không gỉ có đường kính 0,635 mm và kích thước mắt lỗ là 2 mm.

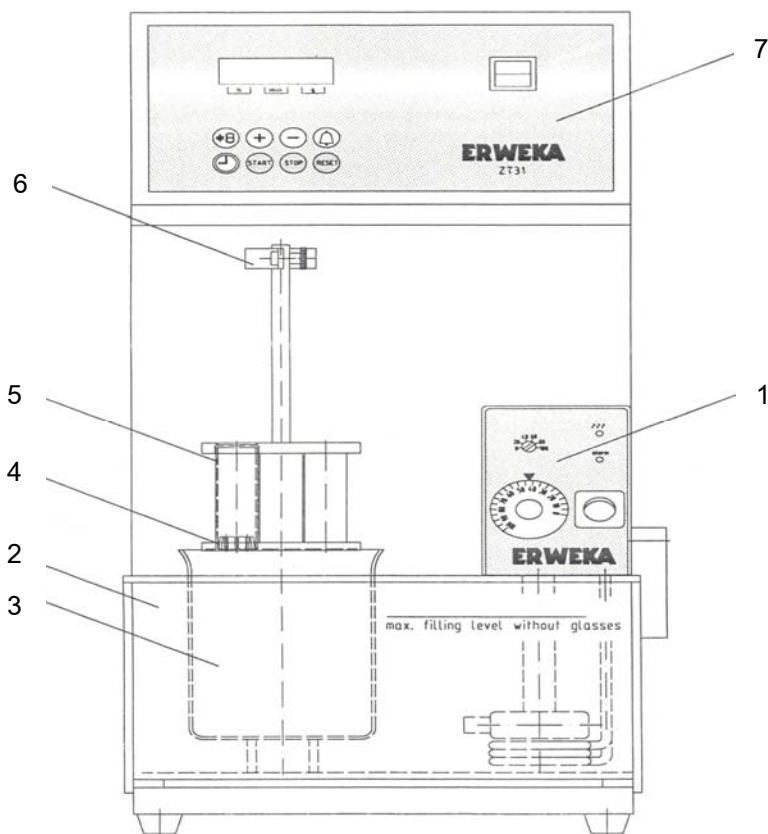
4. Hai tấm nhựa được cố định và cách đều nhau 77,5 mm bằng các thanh kim loại được chốt thẳng đứng ở phía ngoài và một thanh kim loại được gắn chặt vào tâm tấm nhựa phía trên, sao cho giá đỡ ống thử có thể lắp ráp với bộ phận cơ để vận hành thiết bị chuyển động lên xuống một khoảng từ 50 - 60 mm với tần suất 28 - 32 lần/ phút.

5. Giá đỡ ống thử được nhúng chìm trong một bình thích hợp, thường là cốc thủy tinh có dung tích 1000 ml chứa chất lỏng đã được qui định. Thể tích chất lỏng phải đủ để sao cho khi giá ống thử ở vị trí cao nhất thì lưới kim loại phải ở dưới bề mặt chất lỏng ít nhất 15 mm và khi giá ống thử ở vị trí thấp nhất thì lưới kim loại cách đáy cốc thủy tinh ít nhất 25 mm và miệng các ống thủy tinh phải ở trên bề mặt chất lỏng.

6. Một thiết bị phù hợp (thường là chậu cách thủy) để duy trì nhiệt độ của chất lỏng là $37^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$.



Hình 5.4. Thiết bị đo độ rã của viên nén, viên nang (chi tiết)



Hình 5.5. Thiết bị đo độ rã của viên nén, viên nang

- | | | |
|-------------------------|------------------|----------------------------|
| 1. Nguồn cung cấp nhiệt | 2. Bể điều nhiệt | 3. Cốc đựng môi trường thử |
| 4. Đĩa đáy | 5. Ống hình trụ | 6. Giá đỡ |
| | | 7. Bộ phận điều khiển |

5.10.3. Cách thử

5.10.3.1. Chuẩn bị

- Cho một thể tích thích hợp môi trường thử (thường là nước) vào cốc.
- Vận hành máy điều nhiệt để nhiệt độ của môi trường thử đạt $37^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$.
- Cho vào mỗi ống thử một viên nén hoặc một viên nang rồi đẩy đĩa chất dẻo vào từng ống.

5.10.3.2. Vận hành thiết bị

Những giá đỡ vào trong cốc đựng chất lỏng và vận hành thiết bị theo thời gian qui định.

5.10.3.3. Đánh giá kết quả

- Sau thời gian qui định hoặc khi thấy các viên đã rã hết, lấy giá đỡ ống thử ra khỏi cốc chất lỏng.
- Mẫu thử được coi là đạt yêu cầu về độ rã khi không còn cặn, trừ những mảnh vỏ nang hoặc vỏ bao không tan của viên nén, còn lại trên mặt lưới của thiết bị thử hoặc dính vào bề mặt dưới của đĩa đẩy. Nếu còn cặn thì nó chỉ là một khối mềm, không được có nhân khô rắn sờ thấy được.

Kết quả:

- Nếu cả 6 viên đều rã hết: Mẫu thử đạt yêu cầu về độ rã.
- Nếu còn dưới hai viên chưa rã hết: Thử lại trên 12 viên nữa.

Chế phẩm đạt yêu cầu về độ rã khi 16 trong số 18 viên thử đạt độ rã theo qui định.

5.10.4. Thử độ rã của viên nén và viên nang bao tan ở ruột

Tiến hành theo các bước như trên. Riêng môi trường và thời gian như sau:

- Giai đoạn 1: môi trường thử là acid hydrocloric 0,1M; trong 120 phút. Tất cả các viên thử phải còn nguyên vẹn, không thể hiện sự giải phóng hoạt chất.
- Giai đoạn 2: môi trường thử là dung dịch đệm phosphat pH = 6,8; trong 60 phút.

Nếu có viên dính đĩa thì thử lại với 6 viên khác.

Đánh giá kết quả: Như đối với viên nén và viên nang.

Cách pha đệm phosphat pH 6,8: Trộn dung dịch acid hydrocloric 0,1N và dung dịch natri phosphat 0,2N theo tỷ lệ 3: 1. Điều chỉnh pH đến $6,8 \pm 0,05$ bằng dung dịch acid hydrocloric 2N hoặc dung dịch natri hydroxyd 2 N.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Bộ Y tế (2002). Dược điển Việt Nam III. NXB Y học. Tr. 6; 141 - 142; 254; PL. 15; PL. 18 -20; PL.131 - 133; PL. 136 -138.
2. Đặng Văn Hòa (2001). Giáo trình kiểm nghiệm thuốc. Trường ĐH Y - Dược TP Hồ Chí Minh.
3. European Pharmacopoeia (2003), 4th edition, suppl. 4.3; 4.4. P.p. 3247 - 3250; 3367 - 3376.
4. Pharmacopoeia of The People's Republic of China (PPRC)1997, p.p. A5; A7; A51 - A56.
5. The Bristish Pharmacopoeia 2001, p.p. 1775 - 1824; A167; A233; A235; A236; A250; A252; A317.
6. The United States Pharmacopeia XXIV(2000), p.p. 1939; 1941 - 1951; 2000 - 2002; 2107 - 2118;
7. The United States Pharmacopeia XXVII (2004), p.p. 2108 – 2111; 2302 - 2312; 2577 - 2589.
8. Umesh Banakar. Pharmaceutical dissolution testing. Marcel Dekker 1992, p.p. 65 - 66; 71 - 72.
9. WHO, The International Pharmacopoeia (2003), 3rd edition, Vol. 5. P.p. 7- 28.
10. Brossard D. (1992). Les formes dermiques et les suppositoires dans “L'analyse pratique du médicament”. Editions Médicales Internationales, Paris. P.p. 971- 981.
11. Postaire E., Brossard D. (1992). Les formes liquides dans “L'analyse pratique du médicament”. Editions Médicales Internationales, Paris. P.p. 954 - 969.

CÂU HỎI TỰ LƯỢNG GIÁ

- 5.1. Trình bày tiêu chuẩn và kỹ thuật kiểm nghiệm chung của thuốc bột?
- 5.2. Trình bày tiêu chuẩn và kỹ thuật kiểm nghiệm chung của viên nang?
- 5.3. Phân loại các loại viên nang? Cho biết những yêu cầu riêng cho từng loại nếu có?
- 5.4. Trình bày tiêu chuẩn và kỹ thuật kiểm nghiệm chung của thuốc viên nén?
- 5.5. Phân loại các loại viên nén? Cho biết cách thử độ rã đối với từng loại?

- 5.6. Trình bày tiêu chuẩn và kỹ thuật kiểm nghiệm chung của thuốc tiêm và thuốc tiêm truyền?
- 5.7. Trình bày tiêu chuẩn và kỹ thuật kiểm nghiệm chung của thuốc nhỏ mắt?
- 5.8. Trình bày tiêu chuẩn và kỹ thuật kiểm nghiệm chung của thuốc mỡ và thuốc mỡ tra mắt?
- 5.9. Trình bày cách thử tốc độ hòa tan và đánh giá kết quả của viên nén paracetamol 500 mg; viên nang cephalexin 500 mg và viên bao diclofenac 50 mg?
- 5.10. Anh (chị) hãy cho biết cách thử độ rã và đánh giá kết quả của viên nén acid ascorbic 100 mg; viên nang cloxacilin 250 mg và viên bao cimetidin 400 mg ?
- 5.11. Anh (chị) hãy đề xuất tiêu chuẩn và qui trình kiểm nghiệm cho viên nén A có hàm lượng hoạt chất là 1,5 mg/ viên.
- 5.12. So sánh phương pháp thử độ rã của viên nén của Dược điển Việt Nam I - tập 1 và Dược điển Việt Nam III.
- 5.13. Người ta tiến hành định lượng paracetamol trong viên nén paracetamol 500 mg như sau: Cân 20 viên được khối lượng 14,6853g. Nghiền mịn. Cân 0,2205 g bột viên, hòa tan trong vừa đủ 200 ml dung môi. Lắc đều, lọc. Pha loãng 1,00 ml dịch lọc thành 100,0 ml trong bình định mức bằng dung môi. Mật độ quang của dung dịch này ở 257 nm là 0,501.
- Hỏi chế phẩm có đạt yêu cầu về hàm lượng không? Biết paracetamol có A (1%, 1cm) ở bước sóng 257 nm là 715.
- 5.14. Thử độ hòa tan của viên nén ciprofloxacin 250 mg theo ĐĐVN III, sau khi dừng khuấy, pha loãng chính xác môi trường hòa tan trong mỗi cốc thử 50 lần. Đo độ hấp thụ của các dung dịch này theo điều kiện đã cho được kết quả lần lượt tương ứng với các cốc 1; 2; 3; 4; 5 và 6 là 0,435; 0,346; 0,462; 0,378; 0,489 và 0,408. Hỏi chế phẩm có đạt yêu cầu về độ hòa tan không? Biết dung dịch ciprofloxacin chuẩn nồng độ 5,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ có độ hấp thụ là 0,505 đo trong cùng điều kiện.

Chương 6.

ĐỘ ỔN ĐỊNH VÀ TUỔI THỌ CỦA THUỐC

MỤC TIÊU HỌC TẬP

1. Trình bày được mục tiêu và tiêu chuẩn đánh giá độ ổn định của thuốc.
2. Giải thích được nguyên tắc xác định độ ổn định và cách tính tuổi thọ của thuốc.

Một trong những yêu cầu quan trọng nhất đối với thuốc phòng và chữa bệnh là độ ổn định về chất lượng trong suốt quá trình bảo quản từ khi xuất xưởng đến khi hết hạn dùng. Độ ổn định của thuốc liên quan đến quá trình sản xuất, phân phối và bảo quản thuốc.

Khi nghiên cứu triển khai thuốc mới hoặc hoàn thiện nâng cao hiệu lực của một thuốc đã được sử dụng trong lâm sàng, nhà sản xuất cần đánh giá độ ổn định của thuốc trong điều kiện bảo quản xác định, từ đó tính ra tuổi thọ của nó. Người phân phối, lưu giữ thuốc phải duy trì được điều kiện bảo quản thuốc đã qui định để đảm bảo hạn dùng của thuốc.

Việc nghiên cứu độ ổn định của thuốc là một quá trình hoàn thiện phương pháp và cho tới gần đây, Tổ chức Y tế thế giới (WHO) mới có văn bản chính thức hướng dẫn nghiên cứu độ ổn định của thuốc. Dạng điển của một số nước đã có chuyên luận về vấn đề này.

6.1. QUÁ TRÌNH PHÁT TRIỂN NGHIÊN CỨU ĐỘ ỔN ĐỊNH

Người ta đã có những ghi nhận ban đầu liên quan đến độ bền vững của thuốc. Một số chế phẩm khó bảo quản, dễ phân hủy như aspirin, procain, một số vitamin như A, C. Ngược lại, một số chế phẩm khác lại khá bền vững như sulfonamid. Từ đấy khái niệm về độ ổn định của thuốc dần dần được hình thành.

Năm 1948, tạp chí “Công nghệ Dược và Mỹ phẩm” của Mỹ đăng một kết quả nghiên cứu lý thú về vitamin A: bảo quản vitamin A trong 5 tuần lễ ở 42°C sẽ cho một lượng vitamin này bị phân hủy tương đương như khi bảo quản trong hai năm ở nhiệt độ phòng. Kết quả nghiên cứu đã gợi ý một cách đánh giá độ ổn định. E.R. Garrett (1955) gọi đây là phương pháp thử nghiệm cấp tốc. Cũng trong thời gian này người ta tiến hành một phép thử độ ổn định của thuốc (gang - testing): Một năm người ta lấy mẫu ngẫu nhiên ở các nhà thuốc một chế phẩm nào đó, tiến hành định lượng hoạt chất, đánh giá sự suy giảm của hàm lượng. Trên cơ sở kết quả nghiên cứu, các nhà bào chế Mỹ đã khuyến cáo đối với các chế phẩm thuốc cần:

- Ghi hạn sử dụng trên nhãn thuốc,
- Đạt tiêu chuẩn dược điển trong thời gian lưu hành.

Đầu những năm 70 ở Mỹ, người ta đã thực hiện một chương trình nghiên cứu độ ổn định của thuốc, có đánh giá thống kê xử lý số liệu. Đến năm 1975 Dược điển Mỹ có đưa ra hạn dùng của thuốc. Tuy nhiên Dược điển này chưa qui định phương pháp xác định hạn dùng. Mãi đến năm 1984, cơ quan quản lý thuốc và thực phẩm Mỹ (FDA) mới có văn bản đầu tiên về thử độ ổn định của thuốc. Văn bản này được bổ sung trong lần xuất bản thứ hai (1987) và hoàn chỉnh trong lần xuất bản thứ ba (1994).

Năm 1993 Hội nghị Quốc tế bàn về hội nhập đã cho xuất bản tài liệu hướng dẫn chi tiết về thử độ ổn định của thuốc (Harmonized Tripartite Guideline, Geneva). Văn bản hướng dẫn của FDA xuất bản năm 1994 có nội dung tương tự với văn bản hoà nhập 1993.

Năm 1994, WHO xuất bản lần đầu trên tài liệu hướng dẫn nghiên cứu độ ổn định của thuốc. Tài liệu này được bổ sung tái bản năm 1998.

Một điều cần ghi nhận là: việc nghiên cứu độ ổn định của thuốc ngày càng được đẩy mạnh và thu được kết quả khả quan là nhờ các phương pháp phân tích xác định hoạt chất và tạp chất liên quan hoặc tạp chất phân huỷ có độ tin cậy cao trong quá trình sản xuất cũng như bảo quản và lưu thông thuốc. Bước đột phá đầu tiên là sử dụng quang phổ UV-VIS để định lượng hoạt chất và sắc ký lớp mỏng để phát hiện tạp chất phân huỷ. Tiếp đến máy sắc ký khí rồi máy sắc ký lỏng ra đời đã giúp các nhà phân tích xác định được lượng chất dưới ppm, phân tích định lượng được nhiều thành phần trong hỗn hợp, một loại hình phân tích hay gặp trong nghiên cứu độ ổn định của thuốc.

Gần đây việc áp dụng các phương pháp phân tích hiện đại như: nhiễu xạ tia X, nhiệt vi phân,... đã tạo ra nhiều thuận lợi trong nghiên cứu độ ổn định.

Nội dung của chương này được biên soạn dựa chủ yếu vào tài liệu hướng dẫn của WHO năm 1998, có tham khảo thêm một số Dược điển và một vài tài liệu khác.

6.2. Đại cương về độ ổn định của thuốc

6.2.1. Định nghĩa

Theo WHO, độ ổn định của thuốc là khả năng của nguyên liệu hoặc chế phẩm được bảo quản trong điều kiện xác định có thể giữ được những đặc tính vốn có về hoá lý, vi sinh, sinh dược học..... trong những giới hạn nhất định.

Độ ổn định của thuốc phụ thuộc vào nhiều yếu tố. Có thể phân chia các yếu tố này ra hai nhóm:

- ◆ Các yếu tố liên quan đến môi trường như: nhiệt độ, độ ẩm, độ chiếu sáng, hàm lượng oxy cùng các yếu tố bên ngoài khác tác động lên thuốc.
- ◆ Các yếu tố liên quan đến thuốc. Đó là:

- Tính chất lý hóa của hoạt chất và tá dược được dùng để bào chế thuốc. Ví dụ: dạng tinh thể, hàm lượng nước, tạp chất trong nguyên liệu...
- Dạng bào chế của thuốc,
- Quy trình sản xuất thuốc
- Nguyên liệu cho đồ đựng, bao bì, đóng gói.

Như vậy độ ổn định của thuốc phụ thuộc chủ yếu vào đặc điểm của nguyên liệu, quy trình sản xuất và điều kiện môi trường. Việc đưa vào công thức bào chế các chất làm tăng độ ổn định của thuốc chỉ được chấp nhận trong trường hợp hữu hạn và phải được chứng minh về mặt khoa học và thực tế.

6.2.2. Một số thuật ngữ liên quan.

Các tài liệu hướng dẫn nghiên cứu độ ổn định của thuốc đề cập đến nhiều khái niệm và thuật ngữ. Ở đây sẽ tóm tắt một số thuật ngữ chính:

◆ *Các phép thử độ ổn định* (stability testings)

Đó là tập hợp các phép thử được thiết kế nhằm thu được những thông tin về độ ổn định của chế phẩm. Trên cơ sở đó định ra tuổi thọ, hạn dùng ở điều kiện đóng gói và bảo quản xác định.

◆ *Phép thử độ ổn định dài hạn* (long term (real time) stability testing)

Đó là những nghiên cứu thực nghiệm đánh giá sự thay đổi các tính chất hóa lý, sinh học, sinh dược học của một chế phẩm thuốc trong quá trình bảo quản ở điều kiện xác định. Trên cơ sở kết quả nghiên cứu này xác định hạn dùng và khuyến cáo điều kiện bảo quản.

◆ *Phép thử độ ổn định cấp tốc* (accelerated stability testing)

Đây là nghiên cứu thực nghiệm được bố trí để làm tăng tốc độ phân hủy hóa học và thay đổi trạng thái vật lý của thuốc nhờ sự thay đổi của nhiệt độ, độ ẩm, độ chiếu sáng,... Thường nghiên cứu được tiến hành ở nhiệt độ cao 35 - 40°C, có khi tới 50 °C, độ ẩm tương đối 80 - 90% hoặc hơn.

◆ *Lô sản xuất* (batch N⁰)

Đó là lượng xác định của một sản phẩm được sản xuất theo một quy trình và được coi là đồng nhất. Trong trường hợp sản xuất liên tục, lô tương ứng với một phần nhất định của quá trình sản xuất và được đặc trưng bởi tính đồng nhất của sản phẩm.

◆ *Hạn dùng thuốc* (expiration date)

Đây là thời điểm hết hạn sử dụng của thuốc, có nghĩa là sau thời điểm này chế phẩm thuốc không còn giữ được các tính chất như đã đăng ký trong tiêu chuẩn chất lượng. Hạn dùng được xác định theo lô sản xuất.

◆ *Hạn sản xuất* (manufacture date)

Đây là thời điểm kết thúc quá trình sản xuất lô thuốc. Hạn này được ghi thành tháng và năm cho từng lô sản phẩm. Có thể tính hạn sản xuất là thời

điểm thuốc được đưa vào lưu thông với điều kiện là khoảng thời gian giữa thời điểm bắt đầu sản xuất và thời điểm đưa vào lưu thông không vượt quá 1/ 20 của thời hạn bảo quản.

◆ *Thời hạn bảo quản* (expiration dating period)

Đó là khoảng thời gian bảo quản thuốc trong điều kiện xác định mà thuốc vẫn giữ được các tính chất đã đăng ký trong tiêu chuẩn chất lượng. Dựa vào thời hạn bảo quản và hạn sản xuất để tính ra hạn dùng của thuốc. Người ta cũng dùng tuổi thọ (shelf life) của thuốc đồng nghĩa với thời hạn bảo quản thuốc.

◆ *Điều kiện bảo quản chuẩn hóa* (controlled storage condition)

Đó là điều kiện bảo quản trong kho thoáng khí, nhiệt độ trong khoảng 15 - 25°C. Tùy vùng khí hậu nhiệt độ có thể lên tới 30°C. Trong kho không có mùi lạ, không có chất ô nhiễm, không có ánh sáng trực tiếp chiếu vào.

◆ *Nhiệt độ động học trung bình - NĐT* (mean kinetic temperature)

Đây là trị số nhiệt độ trung bình được tính toán cho từng vùng khí hậu dựa trên sự phân bố của nhiệt độ theo thời gian. NĐT được dùng để đánh giá tác động của nhiệt độ lên động học của quá trình phân huỷ hóa học làm giảm độ ổn định của thuốc. Trị số NĐT thường lớn hơn trị số trung bình số học.

6.2.3. Mục tiêu đánh giá độ ổn định

Theo hướng dẫn của WHO, nghiên cứu độ ổn định của thuốc nhằm 4 mục tiêu chính (bảng 6.1)

◆ *Giai đoạn phát triển sản phẩm*

Ở giai đoạn này, các phép thử cấp tốc được thực hiện nhằm lựa chọn công thức bào chế thuốc, qui trình sản xuất và đồ bao gói thích hợp. Sau khi có sản phẩm nhà sản xuất tiếp tục dùng các thử nghiệm cấp tốc để dự báo độ ổn định, sơ bộ đánh giá tuổi thọ trong điều kiện bảo quản đã định. Mặt khác các thử nghiệm dài hạn cũng bắt đầu được triển khai để phục vụ cho giai đoạn tiếp theo.

Bảng 6.1. Bốn mục tiêu cho nghiên cứu độ ổn định

TT	Mục tiêu	Phương pháp nghiên cứu	Giai đoạn áp dụng
1	Xây dựng công thức, kỹ thuật pha chế và bao gói	Thử nghiệm cấp tốc	Phát triển sản phẩm
2	Xác định tuổi thọ và điều kiện bảo quản	Thử cấp tốc và dài hạn	Phát triển sản phẩm và lập hồ sơ đăng ký
3	Khẳng định bằng thực nghiệm tuổi thọ thuốc	Thử dài hạn	Lập hồ sơ đăng ký
4	Thẩm định độ ổn định liên quan đến công thức và qui trình sản xuất	Thử cấp tốc và dài hạn	Thuốc lưu hành trên thị trường

◆ *Giai đoạn lập hồ sơ đăng ký*

Trên cơ sở kết quả thực nghiệm cấp tốc và dài hạn, nhà sản xuất xác định tuổi thọ và hạn dùng của thuốc ở điều kiện bảo quản và bao gói thích hợp. Các thông tin này được ghi rõ trên nhãn thuốc và đồ bao gói. Nhà sản xuất đệ trình với cơ quan quản lý thuốc toàn bộ hồ sơ khác xin phép lưu hành thuốc trên thị trường.

◆ *Giai đoạn thuốc lưu hành trên thị trường*

Khi thuốc đã lưu hành trên thị trường, nhà sản xuất tiếp tục theo dõi độ ổn định để khẳng định tuổi thọ của thuốc trong điều kiện bảo quản đã đề xuất.

Để bảo đảm an toàn về chất lượng thuốc lưu hành trên thị trường, các cơ quan quản lý cũng theo dõi độ ổn định của thuốc thông qua việc thanh tra, kiểm tra qui trình sản xuất, lấy mẫu thuốc kiểm nghiệm.

Đối với một chế phẩm đã được cấp phép lưu hành, nếu có sự thay đổi về công thức, về qui trình sản xuất hoặc qui cách đóng gói,... nhà sản xuất phải nghiên cứu bổ sung về độ ổn định và báo cáo với cơ quan quản lý thuốc.

6.2.4. Tiêu chuẩn đánh giá độ ổn định

Có 5 tiêu chuẩn đánh giá độ ổn định của thuốc

◆ *Độ ổn định hóa học*

Các tính chất hóa học (thành phần định tính và định lượng) của (các) hoạt chất có mặt trong chế phẩm nằm trong một giới hạn cho phép theo tiêu chuẩn chất lượng.

◆ *Độ ổn định vật lý*

Các đặc điểm vật lý của nguyên liệu làm thuốc như: màu sắc, trạng thái tinh thể, độ tan, điểm chảy... không thay đổi. Các đặc điểm của chế phẩm như màu sắc, độ cứng, độ rã, độ hoà tan dao động trong khoảng giới hạn cho phép của tiêu chuẩn chất lượng.

◆ *Độ ổn định vi sinh*

Độ vô trùng hoặc giới hạn nhiễm khuẩn của chế phẩm phải đáp ứng yêu cầu của tiêu chuẩn. Nếu chế phẩm có chứa chất kháng khuẩn thì hàm lượng của nó không vượt quá giới hạn cho phép.

◆ *Độ ổn định điều trị*

Tác dụng điều trị của chế phẩm không thay đổi

◆ *Độ ổn định độc tính*

Độc tính của chế phẩm không được tăng lên trong suốt quá trình bảo quản và lưu hành trên thị trường.

6.2.5. Phân vùng khí hậu

Tuổi thọ của thuốc phụ thuộc vào vùng khí hậu mà thuốc lưu hành. Để nghiên cứu độ ổn định người ta chia thế giới ra 4 vùng khí hậu:

- Vùng 1: Khí hậu ôn hoà. Đó là các nước bắc Âu, Anh, Canada, Nga.
- Vùng 2: Khí hậu á nhiệt đới có thể có độ ẩm cao như Mỹ, Nhật bản, các nước nam Âu (Hy Lạp, Bồ Đào Nha).
- Vùng 3: Khí hậu nóng khô như Iran, Irac, Sudan.
- Vùng 4: Khí hậu nóng ẩm. Đó là một số nước nam Mỹ (Brazil, Nicaragua,...), Đông nam á (Việt Nam, Philippin, Indonesia,...).

Bảng 6.2. tóm tắt giá trị trung bình bốn thông số của 4 vùng khí hậu.

Bảng 6.3. cho ta điều kiện bảo quản chế phẩm trong nghiên cứu độ ổn định dài hạn. Điều lưu ý là thông số nhiệt độ được chọn tối thiểu là 21°C mặc dù vùng đó có nhiệt độ thấp hơn trị số này.

Bảng 6.2. Nhiệt độ và độ ẩm của 4 vùng khí hậu

Vùng	Trị số đo được ngoài trời		Trị số đo được ở trong kho	
	Nhiệt độ (°C)	Độ ẩm (%)	Nhiệt độ (°C)	Độ ẩm (%)
1	10,9	75	18,7	45
2	17,0	70	21,1	52
3	24,4	39	26,0	54
4	26,5	77	28,4	70

Bảng 6.3. Thông số khí hậu tính toán và điều kiện bảo quản cho thử dài hạn

Vùng	Thông số khí hậu tính toán				Điều kiện bảo quản	
	Nhiệt độ	NĐT	Độ ẩm **	m bar *	Nhiệt độ	Độ ẩm **
1	20,0	20,0	42	9,9	21	45
2	21,5	22,0	52	13,5	25	60
3	26,4	27,9	35	11,9	30	35
4	26,7	27,4	76	26,6	30	70

* Áp suất hơi nước riêng phần trong khí quyển

** Độ ẩm tương đối tính bằng %

WHO khuyến cáo các nhà sản xuất:

- Nếu chế phẩm được lưu hành ở vùng 1 nên nghiên cứu độ ổn định trong điều kiện bảo quản ở vùng 2.
- Nếu chế phẩm được lưu hành ở vùng 3 hoặc vùng 4 nên nghiên cứu độ ổn định trong điều kiện bảo quản ở vùng 4.

Cần lưu ý là với một số chế phẩm việc nghiên cứu độ ổn định phải được tiến hành ở nhiệt độ dưới 0°C, hoặc ở điều kiện lạnh (+2°C đến 8°C). Với một số khác đôi khi phải xem xét tác động của ánh sáng.

6.3. Động hóa học dung dịch

Dưới tác động của điều kiện bên ngoài, nguyên liệu và chế phẩm dẫn đến bị phân huỷ, hàm lượng hoạt chất giảm dần theo thời gian. Quá trình phân huỷ động học này rất phức tạp, bởi vì:

- Nhiều yếu tố tác động đồng thời,
- Nhiều loại tương tác có thể diễn ra: tương tác vật lý, phản ứng hóa học, các quá trình sinh học,
- Chế phẩm tồn tại ở nhiều dạng khác nhau: dung dịch nước, dung dịch dầu, nhũ dịch, bột rắn,....
- Chế phẩm thường có nhiều thành phần: một hoặc nhiều hoạt chất, các loại tá dược.

Chính vì vậy độ ổn định của thuốc không đồng nghĩa với động hóa học. Trong quá trình bảo quản có thể có một số phản ứng hóa học phân huỷ được chất được mô tả bằng phương pháp động hóa học. Vì vậy trước khi nghiên cứu độ ổn định của thuốc chúng ta ôn tập vài vấn đề cơ bản của động hóa học dung dịch.

6.3.1. Bậc của phản ứng

Tốc độ của một phản ứng được xác định bằng ba thông số:

- Nồng độ của các chất phản ứng,
- Nhiệt độ xảy ra phản ứng,
- Sự có mặt của chất xúc tác,

Cho một phản ứng:



Tốc độ v của phản ứng được xác định theo định luật Van't Hoff:

$$v = \frac{dC}{dt} = -k_{(m+n)}[A]^m[B]^n \quad (6.2)$$

C là nồng độ của chất nghiên cứu, các móc vuông là chỉ nồng độ của A và B, k là hằng số tốc độ (độc lập với nồng độ C), n và m là bậc riêng của A và B tương ứng, $n + m = p$ là bậc tổng cộng của phản ứng.

Trong nghiên cứu độ ổn định người ta quan tâm đến bậc tổng cộng p. Nó có thể là bậc không, bậc nhất hoặc bậc hai.

6.3.1.1. Phản ứng bậc không

$$v = \frac{dC}{dt} = -k_0 \quad (6.3)$$

Phương trình tốc độ cho phản ứng bậc không

Tích phân phương trình ta được

$$C = C_0 - k_0 t \quad (6.4)$$

$$\text{hoặc } C_0 (1 - a) = k_0 t_a \quad (6.5)$$

ở đây a là phân số mol còn lại ở thời điểm t_a .

Ở thời điểm $t_{1/2}$, tức là $C_t = 0,5C_0$ ta có

$$t_{1/2} = \frac{C_0}{2k_0} \quad (6.6)$$

Thời gian bán hủy $t_{1/2}$ phụ thuộc vào nồng độ ban đầu C_0 . Thứ nguyên của hằng số k là mol/ đơn vị t.

Trong thực tế có rất ít phản ứng động hóa học bậc không.

6.3.1.2. Phản ứng bậc nhất

$$\frac{dC}{dt} = -k_1 C \quad (6.7)$$

Tốc độ phản ứng phụ thuộc vào nồng độ

$$\ln \frac{C}{C_0} = -k_1 t \quad (6.8)$$

Dạng tích phân

$$\ln a = -k_1 t_a \quad (6.9)$$

Phân số mol a còn lại ở thời điểm t_a

Trong nghiên cứu động học phân hủy thuốc bậc nhất người ta lưu tâm thêm thời điểm $t_{0,9}$. Đó là thời điểm mà tỷ số $[C/C_0] = 0,9$

$$k t_{1/2} = -0,693 \quad (6.10)$$

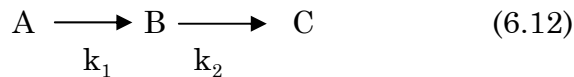
$$k t_{0,9} = -0,105 \quad (6.11)$$

Thứ nguyên của hằng số k là t^{-1}

Khi nghiên cứu độ ổn định cần kiểm tra nồng độ hoạt chất hoặc tạp chất phân hủy. Nếu trong hệ chỉ có một tạp chất phân hủy, việc xác định tỷ số C/Co khá đơn giản. Người ta có thể xác định nồng độ hoạt chất hoặc tạp chất ở thời điểm t để tính hằng số tốc độ. Vấn đề trở nên phức tạp hơn khi hệ tạo ra hai hay nhiều sản phẩm phân hủy. Hai trường hợp sau có thể gặp trong thực tế nghiên cứu độ ổn định.

♦ *Phản ứng bậc nhất kế tiếp*

Có trường hợp phản ứng phân hủy ban đầu không ổn định. Ta có sơ đồ phản ứng sau:



Nếu cả ba chất trong hệ được xác định thì ở mọi thời điểm tổng số mol của ba chất bằng số mol ban đầu của A.

Các phản ứng diễn ra theo qui luật động học bậc nhất, ta có các phương trình tốc độ:

$$\frac{d[A]}{dt} = -k_1[A] \quad (6.13)$$

$$\frac{d[B]}{dt} = -k_2[B] + k_1[A] \quad (6.14)$$

$$\frac{d[C]}{dt} = k_2[B] \quad (6.15)$$

Giải các phương trình vi phân này ta có

$$[A] = A_0 \exp(-k_1 t) \quad (6.16)$$

$$[B] = A_0 [k_1 / (k_2 - k_1)] [\exp(-k_1 t) - \exp(-k_2 t)] \quad (6.17)$$

$$[C] = A_0 \left[1 - \frac{k_2}{k_2 - k_1} \exp(-k_1 t) + \frac{k_1}{k_2 - k_1} \exp(-k_2 t) \right] \quad (6.18)$$

A_0 là nồng độ mol ban đầu của A. Để tính C, trong nhiều trường hợp người ta tính [C] ở một thời điểm theo phương trình

$$[C] = A_0 - [A] - [B] \quad (6.19)$$

Bảng 6.4 minh họa sự quang phân của cefotaxim bằng hai phản ứng bậc nhất kế tiếp (Lerner 1988).

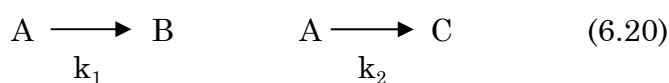
Bảng 6.4. Quang phân của Cefotaxim

Thời gian (giờ)	Cefotaxim A (% mol)	B (% mol)	C (hiệu số)
0,00	100	0	0
0,25	82	10	8
0,50	70	15	15
0,75	55	18	27
1,00	43	19	38
1,50	28	18	54
2,00	20	15	65
3,00	10	10	80
4,00	5	5	90

Cột C cuối cùng tính theo phương trình (6.19).

♦ *Phản ứng bậc nhất song song*

Nếu A phân huỷ tạo ra hai sản phẩm đồng thời là B và C



Phương trình tốc độ có dạng:

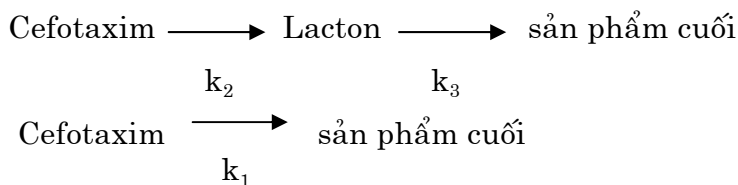
$$d[A]/dt = -k_1[A] - k_2[A] \quad (6.21)$$

$$\ln[A/A_0] = -(k_1 + k_2)t \quad (6.22)$$

Ở thời điểm bất kỳ tỷ lệ của hai sản phẩm tạo thành B và C luôn không đổi

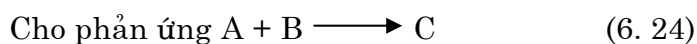
$$[B] / [C] = k_1 / k_2 \quad (6.23)$$

Trong thực tế đôi khi các phản ứng kế tiếp và song song diễn ra không đồng thời. Trong dung dịch nước muối Cefotaxim natri phân huỷ theo sơ đồ sau:



Kết quả nghiên cứu này (Fabre 1984) là một ví dụ minh họa sự phức tạp của nghiên cứu động học phân hủy thuốc.

6.3.1.3. Phản ứng bậc hai



Tốc độ phản ứng

$$v = -d[A]/dt = -k_2[A][B] \quad (6.25)$$

Nếu nồng độ ban đầu của A và B là a và b, lượng C tạo thành ở thời điểm t là x thì

$$-dx/dt = -k_2(a-x)(b-x) \quad (6.26)$$

hoặc dưới dạng tích phân:

$$(a-b)k_2t = \ln \frac{b(a-x)}{a(b-x)} \quad (6.27)$$

$$(a-b)k_2t = \ln \frac{a-x}{b-x} + \ln \frac{b}{a}$$

Rõ ràng thứ nguyên của k_2 là (thời gian x nồng độ)⁻¹.

Nếu khi phản ứng diễn ra $a \gg b$, lượng A tham gia phản ứng coi như không đáng kể so với lượng ban đầu nên [A] coi như không đổi và phương trình (6.25) có dạng

$$v = -k_2[A][B] = -k_2'[B] \quad (6.28)$$

Trong trường hợp này, ta gọi đó là phản ứng bậc nhất giả.

6.3.2. Ảnh hưởng của nhiệt độ

Hằng số k trong phương trình động học phụ thuộc vào nhiệt độ. Khi nhiệt độ tăng, hằng số k tăng theo. Kết quả thực nghiệm cho thấy: khi nhiệt độ tăng lên 10°C hằng số tốc độ k tăng lên xấp xỉ 2 lần.

Định luật Arrhenius

Năm 1889 Arrhenius đã nhận thấy kết quả thực nghiệm có thể được biểu diễn bằng hệ thức kinh nghiệm:

$$\ln k = C_1 - C_2/T \quad (6.29)$$

C_1 và C_2 là hai hằng số và C_2 luôn luôn dương. Phương trình (6.29) giống phương trình Van't Hoff dưới dạng tích phân:

$$\ln k = C - \Delta H^0 / (RT) \quad (6.30)$$

ΔH^0 là đại lượng không phụ thuộc vào nhiệt độ.

Đặt $C_2 = E_0 / R$, có thể viết phương trình Arrhenius dưới dạng

$$\ln k = C_1 - E_0 / (RT) \quad (6.31)$$

E_0 là năng lượng hoạt hóa được xác định bằng cách vẽ đồ thị $\ln k$ theo $1/T$ (T là $^{\circ}\text{K} = ^{\circ}\text{C} + 273,15$).

Có thể viết phương trình (6.31) dưới dạng hàm số mũ

$$k = A \exp(-E_0 / RT) \quad (6.32)$$

ở đây $\ln A = C_1$

6.4. XÁC ĐỊNH ĐỘ ỔN ĐỊNH CỦA THUỐC

Khi đánh giá độ ổn định cần xem xét đến các yếu tố:

- Tính chất và đặc điểm của dược chất trong chế phẩm,
- Vùng khí hậu cho thuốc lưu hành,
- Tài liệu đã công bố liên quan đến độ ổn định của thuốc cần nghiên cứu.

Những yếu tố này sẽ quyết định số mẫu thử, thời gian và tần số thử nghiệm.

6.4.1. Lấy mẫu

♦ Với dược chất tương đối ổn định, cần lấy hai mẫu ở hai lô sản xuất khác nhau. Nếu dược chất kém bền hoặc có ít tài liệu đã công bố, cần lấy ba mẫu ở ba lô khác nhau. Các mẫu này cần lấy đại diện cho qui trình sản xuất.

♦ Đối với nghiên cứu độ ổn định một cách liên tục ở qui mô công nghiệp việc lấy mẫu ở các lô được tiến hành theo chương trình đã định trước, ví dụ:

- Với công thức ổn định, cứ hai năm lấy mẫu trên 1 lô.

Trong trường hợp ngược lại, một năm lấy mẫu trên 1 lô.

- Đối với công thức đã nghiên cứu xong độ ổn định, thường cứ 3 đến 5 năm sẽ kiểm tra lại độ ổn định một lần.

6.4.2. Phương pháp thử cấp tốc

♦ Điều kiện thử

Bảng 6.5. tóm tắt điều kiện thử cho vùng II và vùng IV

Bảng 6.5. Điều kiện thử cấp tốc

Vùng	Nhiệt độ (°C)	Độ ẩm (%)	Thời gian thử (tháng)
II	40 ± 2	75 ± 5	3
IV	40 ± 2	75 ± 5	6

Với các chế phẩm có hoạt chất kém bền, hoặc có ít tài liệu nghiên cứu được công bố, thời gian thử kéo dài hơn 3 tháng so với qui định.

Người nghiên cứu có thể lựa chọn nhiệt độ cao hơn trong thời gian ngắn hơn, ví dụ 45 đến 50°C trong 3 tháng với độ ẩm 75%.

Nếu trong quá trình nghiên cứu, chế phẩm có những thay đổi quan trọng thì cần thực hiện các phép thử nghiệm bổ sung ở điều kiện ôn hoà hơn, ví dụ ở 30 ± 2°C, độ ẩm (60 ± 5)%. Những dấu hiệu chứng tỏ có sự thay đổi quan trọng là:

- Giảm hàm lượng hoạt chất từ 5% trở lên so với trị số ban đầu.
- Có sản phẩm phân huỷ với lượng cao hơn trị số cho phép.
- pH nằm ngoài giới hạn qui định.
- Tốc độ hoà tan của 12 viên nén hoặc viên nang thấp hơn giá trị của tiêu chuẩn.
- Thay đổi đặc tính vật lý của thuốc như: biến màu, tách pha, khó rã,...

Việc thử cấp tốc thường được tiến hành trong buồng vi khí hậu có thể kiểm soát được nhiệt độ (± 2°C) và độ ẩm (± 5%). Một số chế phẩm không thích hợp với thử nghiệm cấp tốc như: chế phẩm sinh học, thuốc đạn, thuốc trứng,...

♦ Ví dụ:

Nghiên cứu một chế phẩm có hàm lượng theo công thức là 100 mg. Thử cấp tốc thời gian 9 tháng ở ba nhiệt độ 35°C, 45°C và 55°C. Kết quả có ở bảng 6.6. Tính hằng số tốc độ và tuổi thọ của thuốc khi bảo quản ở 30°C.

Bảng 6.6. Sự thay đổi hàm lượng (mg) của chế phẩm

Thời gian (tháng)	Hàm lượng		Thời gian (tháng)	Hàm lượng	
	Ở 35°C	Ở 45°C		Ở 55°C	
0	105	105	0	105	
2	103	102	1	102	
4	102	100	2	99	
6	101	97	3	97	
9	99	94	4	94	
			5	91	

Giải:

♦ Vẽ đồ thị $\ln C_t - t$ (tháng). Tính hồi qui bậc nhất, ta có hằng số tốc độ:

- Ở 35°C: $k_{35} = 0,00623 \text{ tháng}^{-1}$ ($r = 0,993$)

- Ở 45°C: $k_{45} = 0,0123 \text{ tháng}^{-1}$ ($r = 0,997$)

- Ở 55°C: $k_{55} = 0,0280 \text{ tháng}^{-1}$ ($r = 0,997$)

♦ Để tính tuổi thọ ở nhiệt độ 30°C cần tính k_{30}

- Vẽ đồ thị $\ln k - 1/T$ (°K) theo phương trình (6. 31)

Nhiệt độ (°C)	k	ln k	(1/ T). 1000
35	0,0062	- 5,083	3,246
45	0,0123	- 4,398	3,145
55	0,0280	- 3,576	3,049

- Tính hồi qui bậc nhất

$$\ln k = C_1 - E_0 / RT = 19,7 - 7642 / T$$

- Tính hằng số k_{30} theo phương trình (6.32)

$$\ln k_{30} = 19,7 - 7642 / (30 + 273,15) = - 5,52$$

$$k_{30} = 0,00411$$

Tuổi thọ của thuốc là khoảng thời gian để hoạt chất còn lại 90% so với trị số ban đầu (phương trình 6.11), nên:

$$t_{0,9} = 0,105 / k_{30} = 25,5 \text{ tháng}$$

Đây là một ví dụ thử độ ổn định cấp tốc để dự báo tuổi thọ của thuốc. Trị số này cần được khẳng định bằng phương pháp thử dài hạn.

6.4.3. Phương pháp thử dài hạn

Theo hướng dẫn của WHO thì điều kiện thực nghiệm trong phương pháp thử dài hạn phải gần với điều kiện bảo quản thực tế của thuốc, tức là vùng khí hậu mà thuốc dự kiến được lưu hành (bảng 6.3). Tuy nhiên một số tác giả đề xuất điều kiện thử dài hạn là nhiệt độ $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$, độ ẩm tương đối $60 \pm 5\%$.

Nghiên cứu độ ổn định dài hạn cần được tiến hành trong suốt thời hạn bảo quản thuốc.

◆ Thời gian kiểm tra hàm lượng trong mẫu:

Năm đầu ở 3 thời điểm 0, 6 và 12 tháng,

Từ năm thứ 2: một lần cho một năm.

– Với công thức rất ổn định chỉ cần kiểm tra hai lần: lần đầu sau 1 năm; lần thứ 2 ở cuối hạn dùng.

– Với chế phẩm kém ổn định, số lần kiểm tra nhiều hơn:

Năm thứ nhất: 3 tháng/ lần

Năm thứ 2: 6 tháng/ lần

Từ năm thứ 3: 12 tháng/ lần

◆ Đối với chế phẩm có yêu cầu bảo quản đặc biệt như: chế phẩm vaccin, hormon, thuốc có hoạt chất rất không ổn định,... người nghiên cứu cần chọn điều kiện thích hợp.

◆ Kết quả thực nghiệm được chấp nhận nếu:

– Không có sự thay đổi các tính chất vật lý, hóa học, sinh học.

– Chế phẩm vẫn đáp ứng đúng yêu cầu của tiêu chuẩn.

Phương pháp thử dài hạn mất nhiều thời gian, nhưng cho kết quả tin cậy. Phép thử này giúp người nghiên cứu khẳng định tuổi thọ đã dự báo theo phép thử cấp tốc.

6.4.4. Phương pháp phân tích đánh giá kết quả

◆ **Lựa chọn phương pháp phân tích**

Việc lựa chọn phương pháp định lượng hoạt chất và (hoặc) tạp chất phân huỷ phụ thuộc vào:

- Tính chất lý hóa của hoạt chất, tạp chất,
- Hàm lượng của chúng trong chế phẩm,
- Yêu cầu của thử nghiệm.

Các phương pháp phân tích cần được thẩm định: kiểm tra độ đúng, độ lặp lại, độ tái hiện, giới hạn định lượng. Riêng phương pháp xác định tạp chất liên quan, tạp chất phân huỷ cần được kiểm tra tính đặc hiệu và độ nhạy.

♦ *Xử lý số liệu*

Số liệu nghiên cứu cần được xử lý thống kê để thu được thời hạn bảo quản tạm thời. Thời hạn này được ngoại suy trên cơ sở thử ổn định cấp tốc. Một thời hạn bảo quản tạm thời 24 tháng được chấp nhận khi:

- Hoạt chất được coi là ổn định,
- Thử nghiệm cấp tốc không có thay đổi rõ rệt,
- Số liệu hiện có chứng minh rằng những công thức tương tự có thời hạn bảo quản 24 tháng hoặc hơn.
- Nhà sản xuất sẽ tiến hành thử độ ổn định dài hạn trong quá trình bảo quản đã đề xuất.

Sau khi đánh giá độ ổn định, nhà sản xuất cần ghi rõ điều kiện bảo quản trên nhãn thuốc:

- Bảo quản ở điều kiện thường,
- Bảo quản trong khoảng + 2⁰C đến 8⁰C (tủ lạnh),
- Bảo quản dưới 8⁰C (tủ lạnh),
- Bảo quản trong khoảng -5⁰C đến - 20⁰C (tủ đá),
- Bảo quản dưới -18⁰C (tủ đá).

Điều kiện thường theo WHO là: nhiệt độ 15 đến 25⁰C, có thể đến 30⁰C, khô ráo, không có ánh sáng trực tiếp chiếu vào. Điều kiện thường có thể được qui định theo từng quốc gia.

Điều lưu ý là những lời chú giải như: “bảo quản nơi khô ráo”, “bảo quản tránh ánh sáng” không được sử dụng nhằm mục đích che dấu sự ổn định kém của thuốc.

6.5. Các dược chất kém bền vững

Năm 1986 WHO thực hiện đề tài :”Nghiên cứu độ ổn định cấp tốc của các dược chất thường dùng trong điều kiện nhiệt đới”. Điều kiện thử cấp tốc:

- Bảo quản 30 ngày ở 50⁰C, độ ẩm 100%.
- Nếu không có dấu hiệu phân huỷ: tăng nhiệt độ lên 70⁰C trong thời gian tiếp theo 3 đến 7 ngày.

Kết quả cho thấy khoảng 100 dược chất cần được lưu ý về độ ổn định: chúng được coi là các chất kém bền vững (bảng 6.7)

Bảng 6.7. Các dược chất kém bền vững

TT	Tên dược chất	TT	Tên dược chất
1	Acid acetyl salicylic	50	Hexyl resorcinol
2	Acid ascorbic	51	Hydralazin, HCl
3	Acid undecylenic	52	Hydrocortizon (Na succinat)
4	Aminophyllin	53	Hyoscyamin sulfat
5	Amitryptilin, HCl	54	Lidocain, HCl
6	Amoni clorid	55	Melarsoprol
7	Amphotericin	56	Metrifonat
8	Ampicillin (muối natri)	57	Naloxon, HCl
9	Ampicillin trihydrat	58	Natri calci edetat
10	Antimon tartrat	59	Natri lactat
11	Bạc nitrat	60	Natri nitrit
12	Bacitracin	61	Natri p. aminosalicilat
13	Bacitracin (muối kẽm)	62	Natri stibogluconat
14	Benzathin benzylpenicillin	63	Neomycin sulfat
15	Benzylpenicillin (muối Na, K)	64	Nystatin
16	Bephenium hydronaphtoat	65	Orciprenalin sulfat
17	Calci gluconat	66	Oxytetracyclin, HCl
18	Calci p.aminosalicylat	67	Paromomycin sulfat
19	Carbenicillin (muối Na)	68	Penicillamin
20	Cephalexin	69	Pethidin, HCl
21	Cloral hydrat	70	Phenobarbital (muối Na)
22	Cloramphenicol (Na succinat)	71	Phenoxyethyl penicillin (muối Na hoặc K)
23	Clorphenamin hydrogeno- maleat	72	Phentolamin mesilat
24	Clorpromazin, HCl	73	Phenyl butazon
25	Clortetracyclin, HCl	74	Pilocarpin, HCl
26	Cloxacillin (muối Na)	75	Pilocarpin nitrat
27	Codein phosphat	76	Procain amid, HCl
28	Colecalciferol	77	Procain benzyl penicillin

TT	Tên dược chất	TT	Tên dược chất
29	Dapson	78	Procain, HCl
30	Dexametason (dạng Na phosphat)	79	Procarbazin, HCl
31	Dicloxacillin (muối Na)	80	Promazin, HCl
32	Dietyl carbamazin (dihydrogeno citrat)	81	Prometazin, HCl
33	Doxycylin hydrat	82	Pyridoxin , HCl
34	Ephedrin	83	Quinin, bisulfat
35	Ephedrin sulfat	84	Quinin, 2HCl
36	Epinephrin	85	Retinol (vitamin A)
37	Epinephrin hydro-geno tartrat	86	Salbutamol sulfat
38	Ergocalciferol	87	Sulfacetamid (muối Na)
39	Ergometrin hydrogenotartrat	88	Sulfadiazin (muối Na)
40	Ergotamin maleat	89	Sulfadimidin (muối Na)
41	Ergotamin tartrat	90	Tetracain , HCl
42	Etho suximid	91	Tetracyclin, HCl
43	Ethyl morphin, HCl	92	Thiamin, HCl
44	Fe(II) sulfat	93	Thiamin mononitrat
45	Fluphenazin decanoat	94	Thiopental (muối Na)
46	Fluphenazin, HCl	95	Thuỷ ngân oxyd vàng
47	Formaldehyd dung dịch	96	Tolbutamid
48	Gentamycin sulfat	97	Warfarin (muối Na)
49	Guanethidin sulfat		

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Bureau of Food & Drug (1998)
Training course drug and cosmetic quality control,
Filinvest Corporate city, Philippines.
2. Carstensen J.T. (1995)
Drug stability
Principles & Practices, 2nd edition, Marcel Dekker Inc. , USA.

3. Didier R. : Chimie minerale
Technique et Documentation, Lavoisier, V^e edition, Paris.
Bản dịch tiếng Việt, tập II, NXB Giáo dục, Hà nội 1997.
4. OMS (1998)
Assurance de la qualité des produits pharmaceutiques,
Vol 1, Genève.
5. Skoog D. A. , West D. M. , Holler F. J (1988)
Fundamental of Analytical Chemistry, 5th edition, chapter 22, pp 578- 597
Saunders College Publishing.

CÂU HỎI TỰ LƯỢNG GIÁ

- 6.1. Tại sao cần đặt vấn đề đánh giá độ ổn định của thuốc.
- 6.2. Giải thích các yếu tố tác động đến độ ổn định của thuốc.
- 6.3. Phân tích phép thử độ ổn định dài hạn và độ ổn định cấp tốc. Tại sao cần tiến hành cả hai phép thử đó?
- 6.4. Những chế phẩm nào không thích hợp với phép thử cấp tốc? Tại sao?
- 6.5. Tại sao phải phân thành 4 vùng khí hậu khi nghiên cứu tuổi thọ của thuốc. Theo anh (chị) vùng khí hậu nào ảnh hưởng nhiều nhất đến độ ổn định của thuốc?
- 6.6. Giải thích vai trò của động hóa học trong đánh giá tuổi thọ của thuốc.
- 6.7. Trình bày nguyên tắc sử dụng phương trình Arrhenius để tính tuổi thọ của thuốc trong phương pháp thử cấp tốc.
- 6.8. Những phản ứng nào thường xảy ra làm giảm độ ổn định của thuốc? Cho ví dụ.
- 6.9. Khi xác định tuổi thọ của thuốc dựa vào số liệu hàm lượng hoạt chất, cần thẩm định: độ đúng, độ chính xác và giới hạn định lượng. Giải thích?
- 6.10. Giải thích lý do tại sao khi xác định tạp chất liên quan, tạp chất phân hủy cần kiểm tra tính đặc hiệu và độ nhạy của phương pháp thực nghiệm?
- 6.11. Đánh giá vai trò của các kỹ thuật phân tích trong nghiên cứu độ ổn định của thuốc.
- 6.12. Người ta đánh giá độ ổn định của một chế phẩm viên nén hàm lượng 200 mg bằng phương pháp lão hóa cấp tốc trong thời hạn 6 tháng ở hai nhiệt độ 40^oC và 60^oC. Số liệu thực nghiệm được trình bày ở bảng sau:

Hàm lượng (%)	Ở 40°C	Ở 60°C
Thời gian (tháng)		
0	102,1	102,1
1	101,5	101,6
2	101,1	101,1
3	100,6	99,5
4	100,1	98,9
5	99,5	98,3
6	98,8	97,6

Hãy tính tuổi thọ của viên nén 200 mg.