

GIỚI THIỆU MÔN HỌC

KIỂM NGHIỆM

Đối tượng: CD Dược

- Mã học phần:	KNG320
- Số tín chỉ:	3 (2,1)
- Phân bổ thời gian:	
. <i>Lên lớp + Thảo luận tại lớp:</i>	<i>22 giờ (2 giờ/ 1 tuần)</i>
. <i>Seminar:</i>	<i>8 giờ</i>
. <i>Thực hành:</i>	<i>30 giờ (2 giờ/ tuần)</i>
. <i>Tự học:</i>	<i>75 giờ</i>

MỤC TIÊU HỌC PHẦN

- Trình bày được hệ thống đảm bảo chất lượng thuốc và vị trí của công tác kiểm nghiệm
- Giải thích được nguyên lý của một số phương pháp hoá học, hoá lý thường dùng trong kiểm nghiệm thuốc.
- Phân tích được công thức và lập được quy trình kiểm nghiệm một số dạng bào chế thông thường (viên nén, viên nang....)
- Kiểm nghiệm được một số dạng thuốc thông thường ở quy mô phòng thí nghiệm.
- Hướng dẫn đúng cách bảo quản và cách dùng các dạng thuốc.
- Đọc, nghiên cứu tài liệu, thuyết trình và phân tích vấn đề
- Rèn luyện được tác phong thận trọng, tỉ mỉ, chính xác trong thực hành kiểm nghiệm.
- Sinh viên yêu thích và hứng thú với môn học.
- Sinh viên có thái độ nghiêm túc, cầu tiến trong quá trình học tập và nghiên cứu.

NỘI DUNG HỌC PHẦN

STT	Nội dung	Trang
Phần lý thuyết		
1	Đại cương	3
2	Độ ổn định và tuổi thọ của thuốc	23
3	Một số phương pháp hoá lý thường được dùng trong kiểm nghiệm thuốc	36
4	Kiểm nghiệm thuốc bằng phương pháp hoá học	65
5	Một số phương pháp sinh học trong kiểm nghiệm	82
6	Kiểm nghiệm các dạng thuốc	92
Phần thực hành		
1	Kiểm nghiệm bột NaHCO_3	113
2	Kiểm nghiệm MgSO_4	116
3	Kiểm nghiệm viên nén vitamin C	119

4	Kiểm nghiệm viên nén Paracetamol	122
5	Kiểm nghiệm viên nén Aspirin	123
6	Kiểm nghiệm thuốc tiêm vitamin B1	128
7	Kiểm nghiệm thuốc nhỏ mắt Cloramphenicol	131
8	Kiểm nghiệm thuốc mỡ Tetracyclin	134
9	Kiểm nghiệm viên nang Amoxycilin	138
10	Kiểm nghiệm viên nang Ampicilin	141
11	Kiểm nghiệm dịch truyền Glucose 5%	145
12	Kiểm nghiệm dịch truyền NaCl 0,9%	148
Tổng		184

Chương 1

ĐẠI CƯƠNG

MỤC TIÊU

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

NỘI DUNG

1. Chất lượng thuốc và đảm bảo chất lượng

1.1. Thuốc và yêu cầu chất lượng

. Khái niệm về thuốc:

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 khỏe
- 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 quy định, có độ tinh khiết theo yêu cầu, đóng gói có nhãn quy 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 hóa đặc biệt, có quan hệ trực tiếp đến sức khỏe cộng đồng, đến chất lượng và hiệu quả của việc phòng bệnh, chữa bệnh. Vì thế thuốc phải được đảm bảo chất lượng trong toàn bộ quá trình sản xuất từ nguyên liệu cho đến 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 quy 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 quy trình đã đăng ký và được phép.
- Có độ tinh khiết đạt yêu cầu quy định.
- Thuốc được đóng gói trong các đồ đựng và đồ bao gói với nhãn thích hợp và đúng quy cách đã đăng ký.

- Thuốc được bảo quản, phân phối, quản lý theo quy 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. *Thực hành tốt sản xuất thuốc (Good Manufacturing Practices)*

Bao gồm những quy 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 quy 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 quy trình sản xuất đều được thực hiện nghiêm chỉnh, có chất lượng và số lượng sản phẩm phù hợp với quy 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.

1.1.2. *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
- Hóa 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.

1.1.3. *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 tồn trữ 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 quy trình bảo quản: Nguyên liệu, bán thành phẩm, thành phẩm, bao bì, đóng gói...
- Quy trình bảo quản, vận chuyển phải được tuân thủ nghiêm chỉnh.

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

1.2.1. Kiểm nghiệm

Kiểm tra chất lượng thuốc hay kiểm nghiệm thuốc là việc sử dụng các phương pháp phân tích: lý học, hóa học, hóa lý, sinh vật, vi sinh vật.. đã quy định để xác nhận một thuốc hay một nguyên liệu làm thuốc có đạt hay không đạt tiêu chuẩn quy 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 không?
- 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 quy 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 phải được kiểm nghiệm và xác định chất lượng, nếu đạt tiêu chuẩn quy 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.

1.2.2. Các yếu tố ảnh hưởng đến chất lượng thuốc

Các yếu tố ảnh hưởng đến chất lượng thuốc có thể là:

- Những rủi ro hoặc nhầm lẫn trong sản xuất, do không chấp hành những quy 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 quy 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...

1.2.3. 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 là loại thuốc kém chất lượng.

. *Thuốc giả:*

Theo quy 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 phẩm 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 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...

1.3. 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.

1.3.1. 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.

1.3.2. 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 quy 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.

1.3.3. 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.

2. Công tác tiêu chuẩn hóa

2.1. Khái niệm

2.1.1. Một số định nghĩa

Tiêu chuẩn hóa 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 quy 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 đề 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 quy 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 thỏa 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 quy định: quy 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 hóa 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 hóa 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.

2.1.2. Đối tượng của công tác tiêu chuẩn hóa

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 thành 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 hóa.

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 quy định kèm theo các chỉ tiêu yêu cầu kỹ thuật. Đây là phần không thể thiếu vì nó chính là quy trình thử nghiệm hay quy 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 quy 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.

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 (TCCS): do các cơ sở sản xuất biên soạn, có hiệu lực trong phạm vi quy 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 15/9/1998).

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.

2.2. Công tác xây dựng tiêu chuẩn

Tiêu chuẩn Việt Nam về thuốc được nhà nước uỷ 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.

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 quy định kỹ thuật, quy 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 (thì cần 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.

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 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 dụng...). 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 quy 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 quy định sai $\pm x\%$; nếu là thuốc nước, thể tích sai $\pm y\%$...).

- Nếu loại chỉ tiêu này chưa có trong quy 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 quy 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.

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

. Các loại quy trình về phương pháp thử:

Mục đích chính của việc tiêu chuẩn hóa một phương pháp thử là chọn cho được một quy trình thử hay quy 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 quy 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 hóa học, hóa 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 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:

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

(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.

* 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, hóa 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 hóa 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.

2.3. Công tác áp dụng tiêu chuẩn trong thực tế

2.3.1. Mục đích ý nghĩa

Áp dụng tiêu chuẩn là một mặt công tác của toàn bộ công tác tiêu chuẩn hóa. 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.

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 quy 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.

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: Quy định trách nhiệm, quyền hạn của các cấp quản lý, các bộ phận thực hiện. Quy 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, hóa 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, hóa chất, thuốc thử...

- Kiểm tra nguyên liệu, bán thành phẩm, thành phẩm và tất cả các thuốc đang lưu hành trên thị trường.

2.3.4. *Sửa đổi, soát xét lại tiêu chuẩn*

Được tiến hành khi thấy tiêu chuẩn không còn phù hợp

2.4. **Giới thiệu Dược điển Việt Nam**

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 (hóa 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 quy định trong công tác kiểm nghiệm, giới thiệu các phương pháp kiểm nghiệm chung, các hóa 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 quy 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, 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 hóa 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 hóa chất thuốc thử (Quá trình biên soạn chuẩn bị từ 1995 - 2000, dự thảo in lấy ý kiến 2000, in chính thức 2002).

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

Có nhiều quy định, dưới đây nêu tóm tắt nội dung chính của 10 quy 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 0,1mg (0,0001g). 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 lý chế phẩm đến khi nào sai giữa 2 lần kế tiếp nhau $< 0,5\text{mg}$.

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 ($\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$). Ethanol không có chỉ dẫn gì khác nghĩa là ethanol tuyệt đối.

6. Độ tan: Quy ước:

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

Rất tan: - nt- 1-10ml -nt-

Tan: -nt- > 10-30ml -nt-

Hơi tan:	-nt-	> 30-100ml	-nt-
Khó tan:	-nt-	> 100-1000ml	-nt-
Rất khó tan:	-nt-	> 1000 - 10.000ml	-nt-
Thực tế không tan:	-nt-	> 10.000ml	-nt-

7. Về nhiệt độ: Dùng thang độ bách phân ký hiệu $^{\circ}\text{C}$. Khi không ghi cụ thể, quy ước:

Nhiệt độ chuẩn:	20°C
Nhiệt độ thường:	$20-30^{\circ}\text{C}$
Nước ấm:	$40-50^{\circ}\text{C}$
Nước nóng:	$70-80^{\circ}\text{C}$
Nước cách thủy:	$98-100^{\circ}\text{C}$

Nhiệt độ trong thử "về mất khối lượng do làm khô" cho phép hiệu là: $100^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$.

Nhiệt độ nơi bảo quản:	
Rất lạnh:	$< 10^{\circ}\text{C}$
Lạnh:	$2-10^{\circ}\text{C}$
Mát:	$10-20^{\circ}\text{C}$
Nhiệt độ phòng:	$20-35^{\circ}\text{C}$
Nhiệt độ phòng có điều nhiệt:	$20-25^{\circ}\text{C}$
Nóng:	$35-40^{\circ}\text{C}$
Rất nóng:	$> 40^{\circ}\text{C}$
Nung đỏ:	$\sim 400^{\circ}\text{C}$
Đỏ thẫm:	$\sim 600^{\circ}\text{C}$
Đỏ trắng:	$\geq 900^{\circ}\text{C}$

8. Về phương pháp: Có thể dùng phương pháp hay phương tiện khác với quy 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 quy 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.

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 hóa học, lý học, hóa lý, sinh học đã được quy 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).

3.1. Lấy mẫu kiểm nghiệm

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 quy 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 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 quy 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.

3.1.2. Quy 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 quy 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 quy định chung có thể có những quy 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 chất lượng của các cơ sở sản xuất (lấy 10% số lô sản xuất trong năm) hoặc lấy theo quy 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 ủy 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 nhiễu 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...).

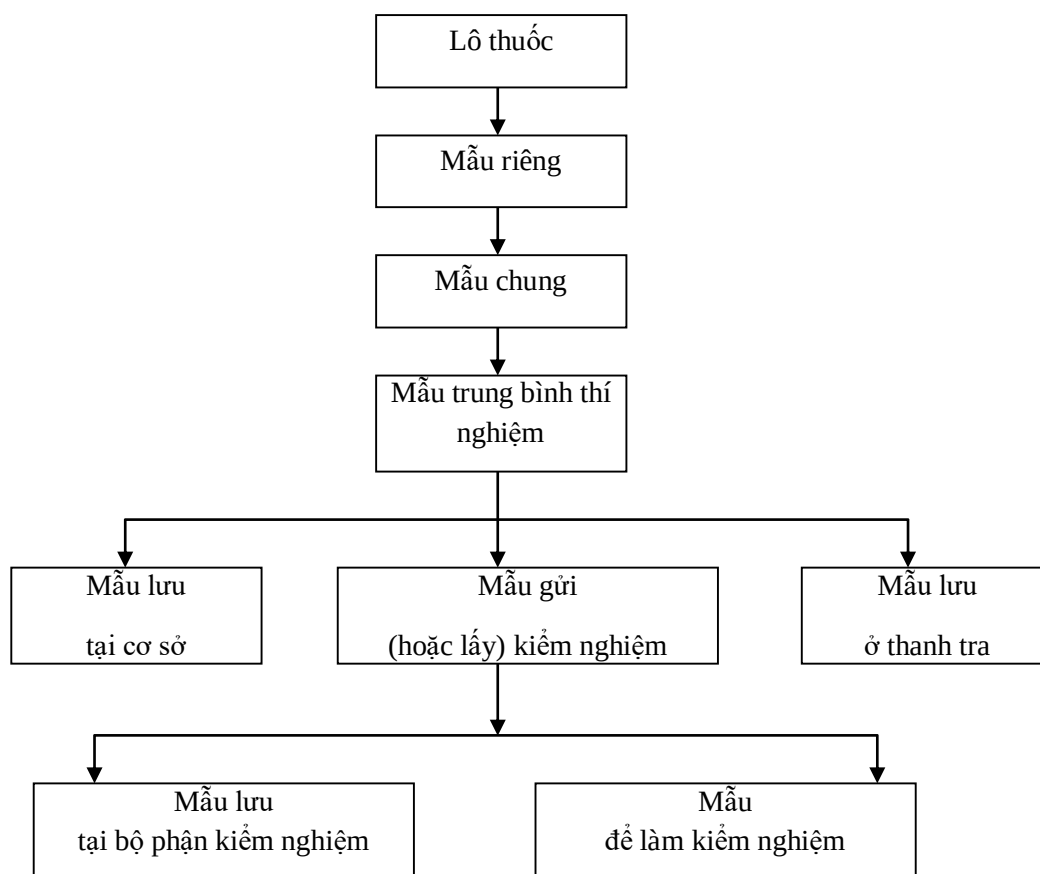
- Thao tác lấy mẫu: Phải thận trọng, tỷ mỉ, quan sát cẩn thận...

- Phương thức lấy mẫu: Người lấy mẫu phải tự 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.

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 quy trình (hình 1.1).



Hình 1.1. Sơ đồ quy 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 các 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 ký xác nhận).

Lấy mẫu cụ thể:

Căn 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 thuốc 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 phần 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:

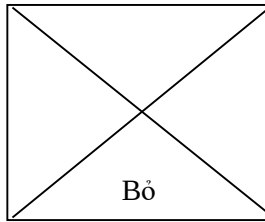
- Trước khi lấy, xem xét sản phẩm có đồng nhất không, nếu không đồng nhất phải chọn riêng ra từng loại và lấy theo các loại đó.

- 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 2cm, 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 đương 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: $n = 0,4 \times \sqrt{N}$.

. *Lấy mẫu là sản phẩm lỏng:*

1. Trường hợp một bao gói: Nếu sản phẩm là đồng nhất thì lấy mẫu ở bất kỳ 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.

3.2. Tiến hành kiểm nghiệm

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 quy định trên.
- Mẫu phải được đóng gói niêm phong và có nhãn ghi đủ các thông tin cần thiết (nhãn thuốc, 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 theo các tài liệu theo quy 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.

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, hóa chất, máy... đáp ứng đủ yêu cầu mà tiêu chuẩn quy 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.

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 gàng, 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).

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 quy 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.

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:.....
Thử 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 cephalexin	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 hòa tan: không ít hơn 80% cephalexin ($C_{16}H_{17}O_4S$) ghi trên nhãn được hòa tan trong 45 phút.	Đạt (86,5%)
6. Định lượng: Hàm lượng cephalexin 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 quy 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 quy chế.

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

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 lý. 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 quy 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 quy định chặt chẽ và được chuẩn hóa cho một cơ sở kiểm nghiệm phải tuân thủ về mọi mặt: nhân sự, tổ chức, cơ sở vật chất, trang thiết bị, hóa chất thuốc thử, quy trình thử nghiệm, các điều khoản kiểm tra, báo cáo kết quả, lưu giữ số liệu...

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 quy định, phải được kiểm tra sức khỏe, không làm nhiễm bẩn vào các phép thử và các dụng cụ, hệ thống thử nghiệm...

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 quy mô, kích thước xây dựng thích hợp cho phép sắp xếp trật tự, hợp lý 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 quy 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...

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 hóa, 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 hóa, bảo dưỡng.

- Phải có nội quy vận hành, hướng dẫn sử dụng, có cá nhân chịu trách nhiệm

3.3.4. Cơ sở vật chất cho các phép thử

- Tất cả các phép thử phải có quy trình được viết chi tiết và được chuẩn hóa, mọi hóa chất, thuốc thử, chất chuẩn... phải đáp ứng các yêu cầu quy định.

- Thuốc thử, hóa chất, các dung dịch... đã bị biến chất hay quá hạn không được phép sử dụng.

3.3.5. Quy định về nguyên tắc

Cơ sở cho phép 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, quy định về mẫu thử, thuốc thử và chất đối chiếu...

3.3.6. Quy định về quy trình và hướng dẫn thử nghiệm

- Quy trình và hướng dẫn thử nghiệm phải rõ ràng, chính xác, được chuẩn hóa 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.

3.3.7. Quy 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. Giáo trình kiểm nghiệm thuốc. Đại học Dược Hà Nội.

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 hóa? 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 quy 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

ĐỘ ỔN ĐỊNH VÀ TUỔI THỌ CỦA THUỐC

MỤC TIÊU

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.

NỘI DUNG

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 quy 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. Dược điển của một số nước đã có chuyên luận về vấn đề này.

1. Quá trình phát triển nghiên cứu độ ổn định của thuốc

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 huỷ như aspirin, procain, một số vitamin như A, C. Ngược lại, một số chế phẩm khác lại khá bền vững như sulfonamid. Từ đây 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 huỷ tương đương như khi bảo quản trong hai năm ở nhiệt độ phòng. Kết quả nghiên cứu đã gợi ý một cách đánh giá 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 ở các nhà thuốc của 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 với các chế phẩm thuốc cần:

- Ghi hạn sử dụng trên nhãn thuốc
- Đạt tiêu chuẩn dược điển trong thời gian lưu hành

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.

2. Đại cương về độ ổn định của thuốc

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 hóa 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.

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.

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.

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 .

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

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

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 – NDT.

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. NDT được dùng để đánh giá tác động của nhiệt độ lên động học của quá trình phân hủy hóa học làm giảm độ ổn định của thuốc. Trị số NDT thường lớn hơn trị số trung bình số học.

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 2.1).

. 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, quy 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 2.1. 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 quy 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 quy 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 quy trình sản xuất hoặc quy cách đóng gói... nhà sản xuất phải nghiên cứu bổ sung về độ ổn định và báo cáo với cơ quan quản lý thuốc.

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 hòa 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.

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 hòa. 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 2.2. Tóm tắt giá trị trung bình bốn thông số của 4 vùng khí hậu

Bảng 2.3. 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 2.2. 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 2.3. 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	22,0	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.

3. Động hóa học dung dịch

Dưới tác động của điều kiện bên ngoài, nguyên liệu và chế phẩm dẫn đến bị phân hủy, hàm lượng hoạt chất giảm dần theo thời gian. Quá trình phân hủy 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, hỗn 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 hủy được chất được mô tả bằng phương pháp động hóa học. Vì vậy trước khi nghiên cứu độ ổn định của thuốc chúng tôi nhắc tới vài vấn đề cơ bản của động hóa học dung dịch.

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:

$$v = \frac{dC}{dt} = -k_{(m+n)} [A]^m [B]^n \quad (2.2)$$

C là nồng độ của chất nghiên cứu, các móc vuông chỉ là 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.

3.1.1. Phản ứng bậc không

$$v = \frac{dC}{dt} = -k_0 \quad (2.3)$$

Phương trình tốc độ cho phản ứng bậc không

Tích phân phương trình ta được

$$C = C_0 - k_0 t \quad (2.4)$$

$$\text{hoặc } C_0 (1 - a) = k_0 t_a \quad (2.5)$$

ở đây a là phân số mol còn lại ở thời điểm t_a

ở thời điểm $t_{1/2}$, tức là $C_t = 0,5 C_0$ ta có:

$$t_{1/2} = \frac{C_0}{2k_0} \quad (2.6)$$

Thời gian bán huỷ $t_{1/2}$ 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.

3.1.2. Phản ứng bậc nhất

$$\frac{dC}{dt} = -k_1 C \quad (2.7)$$

Tốc độ phản ứng phụ thuộc vào nồng độ

$$\ln \frac{C}{C_0} = -k_1 t \quad (2.8)$$

Dạng tích phân

$$\ln a = -k_1 t_a \quad (2.9)$$

Phân số mol a còn lại ở thời điểm t_a

Trong nghiên cứu động học phân huỷ thuốc bậc nhất người ta lưu tâm thêm thời điểm $t_{0,9}$. Đó là thời điểm mà tỷ số $[C/C_0] = 0,9$

$$kt_{1/2} = -0,693 \quad (2.10)$$

$$kt_{0,9} = -0,105 \quad (2.11)$$

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 huỷ. Nếu trong hệ chỉ có một tạp chất phân huỷ, việc xác định tỷ số C/C_0 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 huỷ. 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 huỷ 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 quy luật động học bậc nhất, ta có các phương trình tốc độ:

$$\frac{d[A]}{dt} = -k_1 [A] \quad (2.13)$$

$$\frac{d[B]}{dt} = -k_2[B] + k_1[A] \quad (2.14)$$

$$\frac{d[C]}{dt} = k_2[B] \quad (2.15)$$

Giải các phương trình vi phân này ta có

$$[A] = A_0 \exp(-k_1 t) \quad (2.16)$$

$$[B] = A_0 [k_1/(k_2 - k_1)] [\exp(-k_1 t) - \exp(-k_2 t)] \quad (2.17)$$

$$[C] = A_0 \left[1 - \frac{k_2}{k_2 - k_1} \exp(-k_1 t) + \frac{k_1}{k_2 - k_1} \exp(-k_2 t) \right] \quad (2.18)$$

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

$$[C] = A_0 - [A] - [B] \quad (2.19)$$

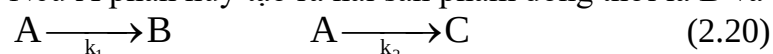
Bảng 2.4. minh họa sự quang phân của cefotaxim bằng hai phản ứng bậc nhất kế tiếp (Lerner 1988).

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 (2.19)

. Phản ứng bậc nhất song song

Nếu A phân hủy tạo ra hai sản phẩm đồng thời là B và C



Phương trình tốc độ có dạng:

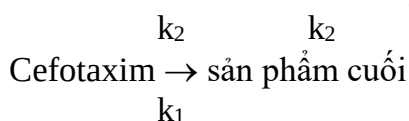
$$d[A]/dt = -k_1[A] - k_2[A] \quad (2.21)$$

$$\ln [A/A_0] = -(k_1 + k_2) t \quad (2.22)$$

ở thời điểm bất kỳ tỷ lệ của hai sản phẩm tạo thành B và C luôn không đổi

$$[B]/[C] = k_1/k_2 \quad (2.23)$$

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 hủy 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.

3.1.3. Phản ứng bậc hai



Tốc độ phản ứng

$$v = -d[A]/dt = -k_2 [A] [B] \quad (2.25)$$

Nếu nồng độ ban đầu của A và B là a và b, lượng C tạo thành ở thời điểm t là x thì

$$-dx/dt = -k_2 (a - x) (b - x) \quad (2.26)$$

hoặc dưới dạng tích phân:

$$(a - b)k_2 t = \ln \frac{b(a - x)}{a(b - x)} \quad (2.27)$$

$$(a - b)k_2 t = \ln \frac{a - x}{b - x} + \ln \frac{b}{a}$$

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 (2.25) có dạng

$$v = -k_2 [A] [B] = -k_2' [B] \quad (2.28)$$

Trong trường hợp này, ta gọi đó là phản ứng bậc nhất giả.

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:

$$\ln k = C_1 - C_2/T \quad (2.29)$$

C_1 và C_2 là hằng số và C_2 luôn luôn dương. Phương trình (2.29) giống phương trình Van't Hoff dưới dạng tích phân:

$$\ln k = C - \Delta H^0 / (RT) \quad (2.30)$$

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

$$\ln k = C_1 - E_0 / (RT) \quad (2.31)$$

E_0 là năng lượng hoạt hóa được xác định bằng cách vẽ đồ thị $\ln k$ theo $1/T$ (T là $^{\circ}K = ^{\circ}C + 273,15$)

Có thể viết phương trình (2.31) dưới dạng hàm số mũ

$$k = A \exp (-E_0/RT) \quad (2.32)$$

ở đây $\ln A = C_1$

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 do 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.

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 quy trình sản xuất.

. Đối với nghiên cứu độ ổn định một cách liên tục ở quy 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.

4.2. Phương pháp thử cấp tốc

. Điều kiện thử

Bảng 2.5. 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	5

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 quy 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 hòa 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 quy định
- Tốc độ hòa tan của 12 viên nén hoặc viên nang thấp hơn giá trị của tiêu chuẩn.

Việc thử cấp tốc thường được tiến hành trong buồng vì 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 100mg. Thử cấp tốc thời gian 9 tháng ở ba nhiệt độ 35°C, 45°C và 55°C. Kết quả có ở bảng 2.6. Tính hằng số tốc độ và tuổi thọ của thuốc khi bảo quản ở 30°C.

Bảng 2.6. Sự thay đổi hàm lượng (mg) của chế phẩm

Bảng 2.01: Sự thay đổi hàm lượng (mg) của các phân tử				
Hàm lượng Thời gian (tháng)	ở 35 ⁰ C	ở 45 ⁰ C	Thời gian (tháng)	ở 55 ⁰ 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 quy 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 (2.31)

Nhiệt độ (°C)	K	Lnk	(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 quy bậc nhất

$$\ln k = C_1 - E_0 / RT = 19,7 - 7642/T$$

- Tính hằng số k_{30} theo phương trình (2.32)

$$\ln k_{30} = 19,7 - 7642 / (30 + 273,15) = -5,52$$

$$k_{30} = 0,00411$$

Tuổi thọ của thuốc là khoảng thời gian để hoạt chất còn lại 90% so với trị số ban đầu (phương trình 2.11), 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.

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 hai: 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.

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 hủy 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 hủy 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 là 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 $+2^{\circ}\text{C}$ đến 8°C (tủ lạnh)
- Bảo quản dưới 8°C (tủ lạnh)
- Bảo quản trong khoảng -5°C đến -20°C (tủ đá)
- Bảo quản dưới -18°C (tủ đá)

Điều kiện thường theo WHO là: nhiệt độ 15 đến 25°C , có thể đến 30°C , khô ráo, không có ánh sáng trực tiếp chiếu vào. Điều kiện thường có thể được quy 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.

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 50°C , độ ẩm 100%
- Nếu không có dấu hiệu phân hủy: tăng nhiệt độ lên 70°C 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 2.7)

Bảng 2.7. 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	Amitriptylin, 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	Antion tartrat	59	Natri lactate
11	Bạc nitrate	60	Natri nitrit
12	Bacitracin	61	Natri p.aminosalicylat
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	Phenolamin mesilat
24	Clorpromazin, HCl	73	Phenyl butazon
25	Clortetracyclin, HCl	74	Pilocarpin, HCl
26	Cloxacillin (Muối Na)	75	Pilocarpin nitrate
27	Codein phosphate	76	Procain amid, HCl
28	Colecalciferol	77	Procain benzyl penicillin
29	Dapson	78	Procain, HCl
30	Dexametason (dạng Na phosphate)	79	Procarbazin, HCl
31	Dicloxacillin (muối Na)	80	Promazin, HCl
32	Diethyl carbamazepin (dihydrogenocitrat)	81	Prometazin, HCl
33	Doxycylin hydrat	82	Pyridoxin, HCl
34	Ephedrin	83	Quinin, bisulfate
35	Ephedrin sulfat	84	Quinin, 2 HCl
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	Thủy ngân oxyd vàng
47	Formaldehyd dung dịch	96	Tolbutamid
48	Gentamycin sulfat	97	Warfarin (muối Na)
49	Gentamycin sulfat	98	

LƯỢNG GIÁ

- 2.1. Tại sao cần đặt vấn đề đánh giá độ ổn định của thuốc
- 2.2. Giải thích các yếu tố tác động đến độ ổn định của thuốc
- 2.3. 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?
- 2.4. Những chế phẩm nào không thích hợp với phép thử cấp tốc? Tại sao?
- 2.5. 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?
- 2.6. Giải thích vai trò của động hóa học trong đánh giá tuổi thọ của thuốc?

- 2.7. Trình bày nguyên tắc sử dụng phương trình Arrhenius để tính tuổi thọ của thuốc trong phương pháp thử cấp tốc.
- 2.8. Những phản ứng nào thường xảy ra làm giảm độ ổn định của thuốc? Cho ví dụ.
- 2.9. 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?
- 2.10. 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?
- 2.11. Đánh giá vai trò của các kỹ thuật phân tích trong nghiên cứu độ ổn định của thuốc.
- 2.12. Người ta đánh giá độ ổn định của một chế phẩm viên nén hàm lượng 200mg bằng phương pháp lão hóa cấp tốc trong thời hạn 6 tháng ở hai nhiệt độ 40°C và 60°C. Số liệu thực nghiệm được trình bày ở bảng sau. Hãy tính tuổi thọ của viên nén 200 mg

Hàm lượng (%) Thời gian (tháng)	ở 40°C	ở 60°C
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

Chương 3
CÁC PHƯƠNG PHÁP HÓA LÝ
TRONG KIỂM NGHIỆM THUỐC
Bài 1
CÁC PHƯƠNG PHÁP QUANG PHỔ

MỤC TIÊU

1. Trình bày được các phương pháp định lượng bằng quang phổ
2. Giải thích và vận dụng được các phương pháp quang phổ

NỘI DUNG

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.

1. Quang phổ hấp thụ UV. VIS

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 quy 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

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

Khi $C = 1 \text{ mol/l}$ và $L = 1 \text{ cm}$ thì $A = e$ (hệ số hấp thụ phân tử)

e 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.

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

- Trường hợp nồng độ C tính theo % (Kl/TT) và bằng 1%, $L = 1 \text{ cm}$ thì: $E (1\%, 1 \text{ cm})$ là hệ số hấp thụ riêng, nó đặc trưng cho mỗi chất.

Trong phân tích kiểm nghiệm hay dùng $E (1\%, 1 \text{ cm})$.

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 bền trong dung dịch và bền dưới tác dụng của ánh sáng UV - VIS.

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

1.4. 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:

278nm ± 1nm

361nm ± 1nm

548nm ± 2nm

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

223nm 375nm

267nm 444nm

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

+ Phenoxymethyl penicillin có 2 cực đại hấp thụ ở 268nm 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:

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

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 cần nhắc đến 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 quy trình định lượng

Để xây dựng quy 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 phù hợp 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).

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

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

- Phương pháp đo quang phổ gián tiếp

Các phương pháp gián tiếp như: phương pháp đường chuẩn, so sánh và thêm chuẩn tương tự như các phương pháp hóa 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 diễn Mỹ (USP XXII, XXIII, XXIV) quy 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 hóa 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

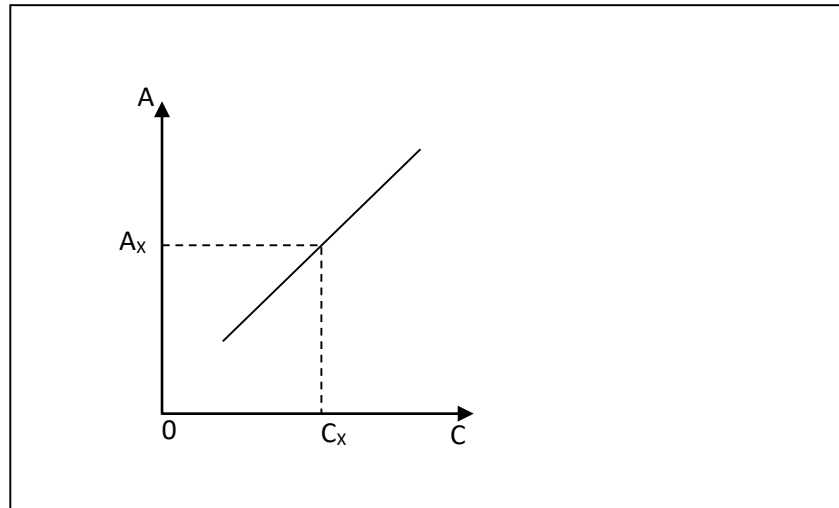
Đo độ hấp thụ A_X của dung dịch mẫu thử và dựa vào đường chuẩn ta xác định được nồng độ mẫu thử C_X .

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 quy tuyến tính hay phi tuyến và tính hệ số tương quan r . Nếu $r \geq 0,995$ là tốt.



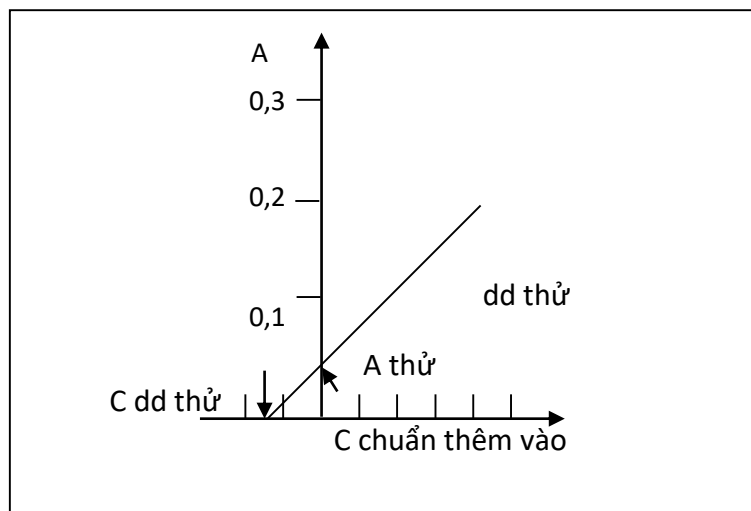
Hình 3.1. Đồ thị của phương pháp đường chuẩn $A = f(C)$

- 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 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*

Đo 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.

$$A_{hh}^{\lambda_1} = E_1^{\lambda_1} C_1 + E_2^{\lambda_1} C_2 + \dots + E_n^{\lambda_1} C_n \quad (1)$$

$$A_{hh}^{\lambda_2} = E_1^{\lambda_2} C_1 + E_2^{\lambda_2} C_2 + \dots + E_n^{\lambda_2} C_n \quad (2) \quad (3.10)$$

.....

$$A_{hh}^{\lambda_n} = E_1^{\lambda_n} C_1 + E_2^{\lambda_n} C_2 + \dots + E_n^{\lambda_n} C_n \quad (n)$$

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:

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

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

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

2. Quang phổ hồng ngoại

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 $600 - 4000 \text{ cm}^{-1}$.

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

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 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≡H	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

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 4000cm⁻¹ đến 670cm⁻¹ (2,5μm - 15μm) hoặc trong một vài trường hợp tới 200cm⁻¹ (50μ) và một phương tiện đo tỷ số giữa cường độ ánh sáng truyền qua và ánh sáng tới.

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 hóa 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 (2,5μm - 15μm) 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 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 hóa máy quang phổ.

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

- *Chuẩn hóa độ phân giải:*

Ghi phổ của phim polystyren dày 0,05mm

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

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

- Chuẩn hóa thang số sóng

Cũng có thể chuẩn hóa 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	($\pm 0,3$)	1583,1	($\pm 0,3$)
2924,0	(± 2)	1181,4	($\pm 0,3$)
2850,7	($\pm 0,3$)	1154,3	($\pm 0,3$)
1944,0	(± 1)	1069,1	($\pm 0,3$)
1971,0	($\pm 0,3$)	1028,0	($\pm 0,3$)
1801,6	($\pm 0,3$)	906,7	($\pm 0,3$)
1601,4	($\pm 0,3$)	698,9	($\pm 0,5$)

3. Quang phổ huỳnh quang (Fluorometry)

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.

$$F = K \cdot I_0 \cdot \varepsilon \cdot \phi \cdot C \cdot L \quad (3.11)$$

ở đây:

K: hằng số

I_0 : cường độ của bức xạ kích thích

ϕ : hiệu suất huỳnh quang

$$\phi = \frac{\text{Số photon phát xạ}}{\text{Số photon hấp thụ}} \quad (0 < \phi < 1) \quad (3.12)$$

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.

3.2. 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

3.3. Chuẩn hóa máy

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

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

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 màu trắng tương ứng của chúng.

Tính toán nồng độ của dung dịch thử:

$$C_x = C_s \frac{I_x - I_{ox}}{I_s - I_{os}} \quad (3.13)$$

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.

Ví dụ: Dùng kính huỳnh quang hoặc một chất phát huỳnh quang khác.

Nếu cường độ huỳnh quang không tỷ 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 bền 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 hòa tan trong dung dịch làm giảm cường độ huỳnh quang rất mạnh, cần phải đuổi nó bằng cách sục khí trơ qua dung dịch.

Bài 2

PHƯƠNG PHÁP SẮC KÝ KHÍ VÀ SẮC KÝ TRAO ĐỔI ION

MỤC TIÊU

1. Trình bày được các phương pháp định lượng bằng phương pháp sắc ký khí và sắc ký trao đổi ion
2. Giải thích và vận dụng được các phương pháp sắc ký khí và sắc ký trao đổi ion

NỘI DUNG

1. Khái niệm về phương pháp sắc ký

Năm 1903 nhà thực học người Nga M.S.Tsvet khi cho dịch chiết chlorophyll từ lá cây qua cột CaCO_3 , sau đó cho ether dầu hỏa chảy qua thấy các sắc tố của chlorophyll được tách riêng thành những lớp màu khác nhau trên cột (không màu, vàng, lục vàng, lục lam, vàng, xám). Cột với hệ thống các lớp màu đã tách ông đặt tên là sắc đồ (hay sắc ký đồ) và kỹ thuật tách này ông gọi là phương pháp sắc ký.

Ngày nay có thể nói sắc ký là phương pháp tách các chất dựa vào sự phân bố khác nhau của chúng vào 2 pha không hoà lẫn vào nhau và luôn tiếp xúc với nhau, một pha đứng yên gọi là pha tĩnh (Stationnary phase: SP) và một pha di chuyển gọi là pha động (Mobile phase: MP). Trong quá trình pha động chuyển động dọc theo hệ sắc ký hết lớp pha tĩnh này đến lớp pha tĩnh khác sẽ lặp đi lặp lại quá trình hấp phụ và phản hấp phụ. Hệ quả là các chất bị hấp phụ nhiều (có ái lực lớn) với pha tĩnh sẽ di chuyển chậm hơn các chất bị hấp phụ ít (có ái lực yếu) và chúng có thể tách ra khỏi nhau.

Quá trình sắc ký thường gồm 3 giai đoạn chính: Đưa mẫu thử lên pha tĩnh, cho pha động chạy qua pha tĩnh. Phát hiện các chất và xử lý kết quả.

2. Một số phương pháp sắc ký

2.1. Sắc ký lớp mỏng

Khái niệm

* Về bản chất đây là hệ sắc ký lỏng - rắn, trong đó pha tĩnh rắn (là chất hấp phụ được chọn phù hợp theo yêu cầu phân tích) được trải thành lớp mỏng đồng đều trên bản kính, nhựa hay kim loại. Sau đó đưa hỗn hợp chất cần tách lên pha tĩnh bằng cách chấm dung dịch mẫu nghiên cứu lên bản mỏng (cách rìa bản mỏng 2 - 3cm). Pha động là một hệ dung môi đơn hoặc đa thành phần được trộn với nhau theo một tỷ lệ nhất định (cho dung môi pha động chạy bằng cách đặt bản mỏng vào hệ dung môi này theo hướng phần có vết chấm ở dưới). Dưới tác dụng của lực mao quản, dung môi sẽ chuyển động qua lớp hấp phụ, các cấu tử sẽ di chuyển theo hướng pha động nhưng với vận tốc khác nhau đưa đến việc tách các cấu tử ra khỏi nhau, ta thu được một sắc ký đồ trên lớp mỏng.

* Phương pháp sắc ký lớp mỏng được ứng dụng để định tính, thử độ tinh khiết, cũng có thể để định lượng. Ưu điểm cơ bản là thiết bị đơn giản, thời gian phân tích nhanh, khá chọn lọc.

Đại lượng đặc trưng

* Đại lượng đặc trưng cho mức độ di chuyển của chất phân tích là hệ số lưu giữ R_f (Retard factor)

$$R_f = \frac{a}{b} = \frac{\text{Khoảng cách từ điểm xuất phát đến tâm của vết sắc ký}}{\text{Khoảng cách từ điểm xuất phát đến mực dung môi cuối}}$$

Thiết bị, hoá chất chính

* Các loại chất hấp phụ sử dụng: Silicagel, nhôm oxyd, cellulose, bột poliamid, sephadex... Chất hấp phụ có thể được trải dưới dạng nhão có chất kết dính thành bản mỏng dính chắc hoặc dạng bột mịn không có chất kết dính thành bản mỏng không dính chắc. Hiện nay, trong thực tế có bản mỏng tráng sẵn như Silicagel G, Silicagel GF₂₅₄, Silicagel HF₂₅₄.

* Dung môi: Việc chọn dung môi động phụ thuộc vào bản chất của chất nghiên cứu. Dung môi có thể là đơn hoặc hỗn hợp. Các dung môi phải đạt độ tinh khiết cao.

* Bình sắc ký: Thường là bình thủy tinh trong suốt, có kích thước phù hợp và có nắp đậy kín.

* Dụng cụ chấm sắc ký: có thể dùng máy chấm sắc ký, hoặc dùng micropipet hay ống mao quản thường, ống mao quản định mức chính xác.

* Dụng cụ phát hiện: có thể dùng bình phun thuốc thử, đèn huỳnh quang tử ngoại, máy đo mật độ vết.

Các bước tiến hành

* Chuẩn bị bản mỏng: Lựa chọn bản mỏng, lựa chọn chất hấp phụ phù hợp với yêu cầu phân tích, điều chế vữa của chất hấp phụ, trải bản mỏng, làm khô tự nhiên, hoạt hoá bản mỏng ở 105°C – 110°C.

* Chuẩn bị bình khai triển sắc ký: Bảo hoà hơi dung môi vào không khí trong bình bằng cách lót giấy lọc xung quanh thành trong của bình, pha dung môi (lượng dung môi sử dụng sao cho sau khi thấm đều vào giấy lọc, còn lại 1 lớp dày 5 – 10mm ở đáy bình). Đậy nắp bình và để yên 1 giờ.

* Chấm chất phân tích lên bản mỏng: Là khâu rất quan trọng, lượng mẫu không quá nhỏ và không quá lớn (thông thường 0,1 - 50µg ứng thể tích 0,001 - 0,005 ml). Điểm chấm xuất phát phải cách mép dưới bản mỏng 1,5 - 2,5 cm và cách bề mặt dung môi 0,8 - 1,0cm. Vết chấm phải nhỏ gọn (đường kính 2 – 6 mm), các vết chấm cách nhau 15 mm, vết chấm cách bờ bên của bản mỏng ít nhất 1cm.

* Triển khai sắc ký: Đặt bản mỏng gần như thẳng đứng vào bình sắc ký (các vết chấm phải ở trên bề mặt của lớp dung môi). Đậy kín bình và để yên ở nhiệt độ cố định. Thường khi đường đi của dung môi được 10 - 12cm thì kết thúc giai đoạn triển khai sắc ký.

* Phát hiện: Lấy bản mỏng ra đánh dấu đường đi của dung môi. Làm bay hơi dung môi còn đọng lại trên bản mỏng. Phát hiện vết sắc ký bằng phương pháp hoá học hoặc hoá lý (Hiện màu bằng phun thuốc thử hoặc dùng đèn UV 254 nm và 366 nm). Quan sát màu vết, đo và tính R_f (hoặc R_{td}, R_S).

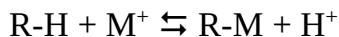
Từ kết quả trên rút ra kết luận về định tính, thử tinh khiết theo yêu cầu của phép phân tích. Để định lượng có thể dựa trên diện tích, độ đậm màu của các vết hoặc xử lý bằng các biện pháp hoá học thích hợp để lấy chất nghiên cứu ra khỏi bản mỏng.

2.2. Sắc ký trao đổi ion

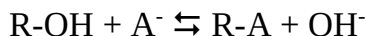
* Sắc ký trao đổi ion là một dạng sắc ký lỏng - rắn. Ở đây pha tĩnh là một chất có khả năng trao đổi ion (cation và anion). Quá trình sắc ký xảy ra dựa vào phản ứng trao đổi ion giữa các thành phần trong pha động và chất trao đổi ion nạp sẵn trong cột sắc ký. Chất trao đổi ion thường dùng là các chất tổng hợp được gọi là nhựa trao đổi ion hay ionid (ionid có khả năng trao đổi cation gọi là cationid, ionid có khả năng trao đổi anion gọi là anionid).

* Phương trình trao đổi giữa ion ở ionid và ion trong pha động có thể biểu thị như sau:

- Với cationid:



- Với anionid:



Như vậy sau quá trình sắc ký, chúng ta có thể tái sinh nhựa trở về trạng thái ban đầu (bằng cách cho Cationid tiếp xúc với dung dịch acid có nồng độ thích hợp, anionid tiếp xúc với dung dịch base có nồng độ thích hợp).

* Kỹ thuật sắc ký: Thường được thực hiện trên cột sắc ký trong phòng thí nghiệm, cột trao đổi ion thường là cột thuỷ tinh hình trụ, đáy có lắp khoá để thoát dung dịch, dưới đáy thường lót bông thuỷ tinh để ngăn không cho các hạt nhựa lọt vào làm tắc khoá. Trong cột tùy theo phép phân tích mà nhồi cationit hoặc anionit. Sau đó, cho dung dịch cần phân tích chảy qua (pha động) phản ứng trao đổi giữa ion trong ionid và ion cần xác định sẽ xảy ra.

* Sắc ký trao đổi ion được ứng dụng để tách các ion, định lượng các chất, làm sạch các ion trong nước...

* Tùy theo ion cần nghiên cứu, tùy điều kiện mà chọn nhựa ionid thích hợp, nhưng thường chú ý chọn loại nhựa có dung lượng trao đổi lớn, bền vững hoá học, có độ trương nước xác định, có kích thước đồng nhất... khi tiến hành sắc ký không bao giờ được để nhựa khô hoặc có bọt khí.

Bài 3

PHƯƠNG PHÁP SẮC KÝ LỎNG HIỆU NĂNG CAO

MỤC TIÊU

1. Trình bày được các phương pháp định lượng bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao
2. Giải thích và vận dụng được các phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao

NỘI DUNG

1. Phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao

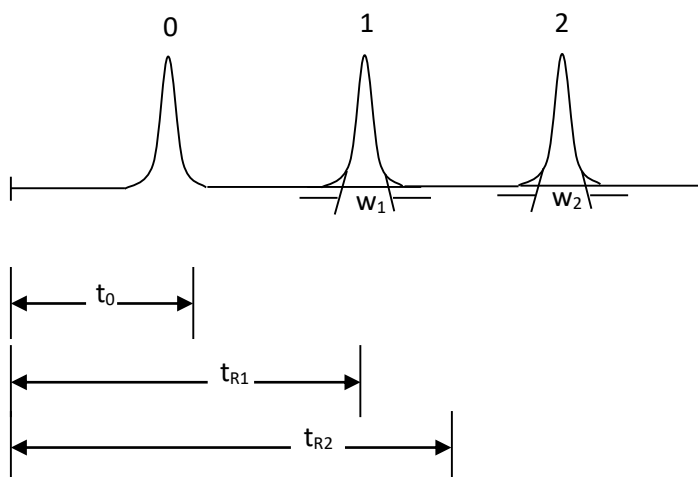
(High - Performance Liquid Chromatography - HPLC)

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 thụ, phân bố, trao đổi ion hay loại cỡ 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 hóa 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.

1.1. 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

$$k' = K \frac{V_s}{V_m} = \frac{Q_s}{Q_m} = \frac{t'R}{t_o} = \frac{t_R - t_o}{t_o} \quad (3.14)$$

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_0 : 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

$$\alpha = \frac{k'_B}{k'_A} = \frac{t_{RB}}{t_{RA}} \quad (3.15)$$

Quy 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

$$F = \frac{W}{2a} \quad (3.16)$$

ở đây:

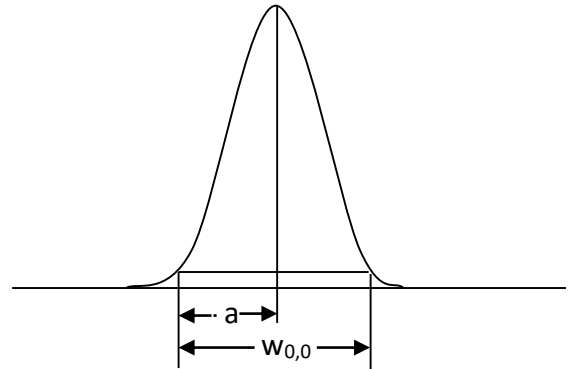
W: chiều rộng pic đo ở 1/20 chiều cao pic

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

$$N = 16 \frac{t_R^2}{W^2} = 5,54 \frac{t_R^2}{W_{1/2}^2} \quad (3.17)$$

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

$$R_s = \frac{2(t_{RB} - t_{RA})}{W_B + W_A} = \frac{1,18(t_{RB} - t_{RA})}{W_{1/2B} + W_{1/2A}} \quad (3.18)$$

Với:

t_{RB}, t_{RA} : Thời gian lưu của 2 pic liền kề 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 $R_s = 1,5$

1.2. Máy HPLC



Hình 3.5. Máy sắc ký lỏng hiệu năng cao

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 để 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 2-5mm, hạt chất nạp (packings) cỡ 5-10 μ m. 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 $^{\circ}$ C vì nhiệt có thể làm suy giảm hiệu lực cột hoặc làm pha động bay hơi. Chất nạp thường là silicagel hoặc silicagel có bao một lớp mỏng hữu cơ hoặc liên kết hóa học với các nhóm chức hữu cơ. Bên cạnh silicagel 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:

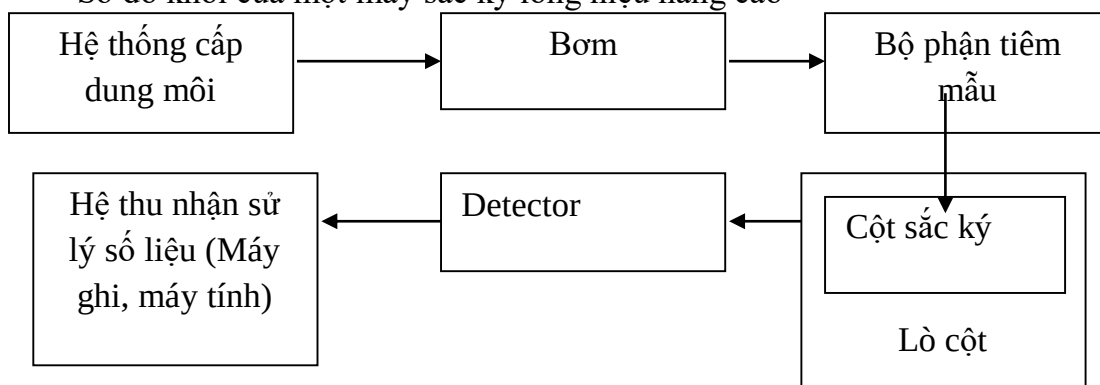
Detector tử ngoại và khả kiến (UV - VIS) có bước sóng tùy chọn được dùng phổ biến nhất.

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 hóa

Sơ đồ khối của một máy sắc ký lỏng hiệu năng cao



1.3. **Các kỹ thuật HPLC**

Có 4 kỹ thuật HPLC cơ bản: sắc ký phân bố, hấp thụ, 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 còn 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 - (CH₂)₃ - NH₂ NH₂

Diol = Si - (CH₂)₃ - OCH (OH) - CH₂ - 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.

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 giản 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 [-(CH₂)_nCN] và alkylamin [-(CH₂)_nNH₂]. Dung môi sử dụng là dung môi của sắc ký hấp thụ (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

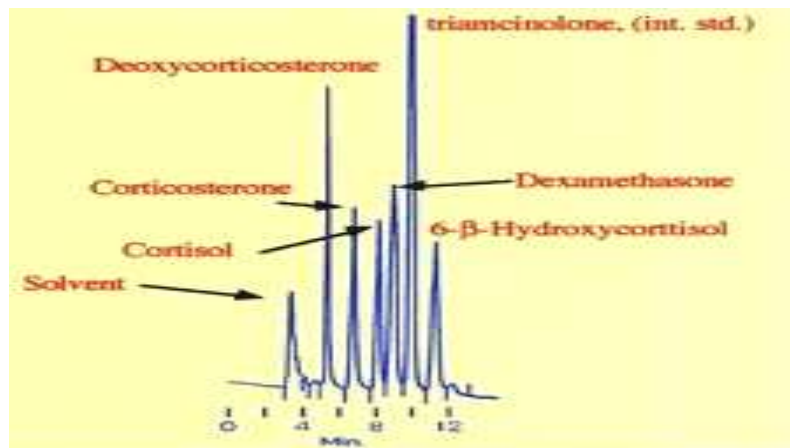
Pha động trong sắc ký pha thuận nói chung không phân cực, thường dùng hỗn hợp của các hydrocarbon mạch thẳng như pentan, hexan, heptan, isootan. Các dẫn chất halogen dãy béo cũng được sử dụng như: diclorometan, dicloroetan, butyl clorid và cloroform. Có thể thêm vào các pha khan nước này 1-2% acid acetic 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 150mm, 5μm
- Pha động: hexan chứa 0,2 isopropanol
- Tốc độ dòng: 1ml/phút
- Detector: UV 254nm



Hình 3.6

* *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 (C_{18}), octyl (C_8) hay phenyl (C_6H_5). 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 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 hoà 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:

H_2O - MeOH và H_2O - ACN. Điều dễ nhận thấy, MeOH có nhược điểm là độ nhớt cao của nó có thể làm giảm hiệu lực cột. Trong khi acetonitril (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

Điều kiện sắc ký:

- Cột: Zorbax Bx, Sb - C 8, 4,6 x 150nm, 5 μ m
- Pha động: ACN / KH_2PO_4 25mM, pH 3,5 7/93
- Tốc độ dòng: 1,5ml/phút

- Detector: UV 254nm

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 0,01M	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 0,01M 19/81 pH 2,3	254	Viên nén
Acetaminophen P-aminophenol	Phenyl	TBA phosphat 0,005M/ACN 85/15 pH 7,5	254	Viên nén
Acetazolamide	C - 18	ACN/acetat 0,05M	254	Huyết tương, nước tiểu
Acetazolamid	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-aminosalicylic	C - 18	MeOH/H ₂ O/H ₃ PO ₄ 40/60/0,1	345	Huyết tương
Acyclovir	C - 18	NaOAc 0,005M, 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 0,067M (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 laurylsufat	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
Aspirin Acid salicylic Acid salicyluric	C-18	ACN/AcOH 1% 20/80	280	Huyết tương nước tiểu

Tên thuốc	Cột	Pha động	Detector	Mẫu thử
Acid gentisic				
Atenolol	Cyan o	Acid heptansulfuric/triethanolamin 0,2M/MeOH 2/100/1900	220	Huyết tương
Barbiturat	C-18	MeOH/NaH ₂ PO ₄ 0,1M 60/40	240	Huyết thanh
Benzocain	C-18	MeOH/NaH ₂ PO ₄ 0,1M 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 phosphate	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 20ml 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 liều
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
Chlodiazepoxid	C-18	ACN/NH ₄ CO ₃ 0,1%	260	Huyết tương
Chloroquin	C-18	MeOH/H ₂ O/AcOH 80/10/1 Na heptansufonat	340	Huyết tương
Chlopheniramin	Cyan o	ACN/MeOH/phosphat 0,015M (pH 6,6) 25/25/50	254	Nước tiểu
Chlopromazin	Cyan o	Acetat 0,05M (pH 6,5) CAN	254	Huyết tương
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	254	Dạng phân liều

Tên thuốc	Cột	Pha động	Detector	Mẫu thử
		diocylsulfonat, pH 3,3		
Cortisone và hydrocortisone	C-18	ACN/H ₂ O 375/625 0,005 M Na diocylsulfonat, pH 3,3	254	Dạng phân liều
Cortisone và hydrocortisone	Silica	Hexan/ethyl acetat 60/50	360	Huyết thanh
Dexamethason	C-18	KH ₂ PO ₄ 0,01M/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 0,01M (pH 4) 6/94	270	Huyết thanh
Acid folic	C-18	H ₂ O/MeOH (pH 7,0) 76/24 0,015M 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	Cyan o	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 0,015M 100/300 (pH 3,0)	135	Nước tiểu
Histamin	C-18	NaCl 0,1M/ MeOH 55/45 pH 3,0	350	Huyết tương
Hydrochlothiazid	C-18	MeOH/AcOH 0,01M 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
Ibuprofen	C-18	ACN/AcOH 0,05M 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	Phen yl	ACN/H ₃ PO ₄ 0,006% 30/70	200	Huyết tương
Methyldopa	C-18	MeOH/H ₂ O 14/86 Na octansulfonat	GCE + 0,5V	Huyết tương

Tên thuốc	Cột	Pha động	Detector	Mẫu thử
		0,006M, pH 6,4		
Mebendasol	C-18	ACN/phosphat 0,05M (pH 6) 27/73	313	Huyết tương
Metronidazol	C-18	ACN/phosphat 10 ⁻⁵ M pH 48/92	322	Huyết tương, nước tiểu
Morphin	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

1.4. Chuẩn hóa cột HPLC

* Mục đích:

- Mục đích của việc chuẩn hóa 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 hóa.

Các thông số của cột HPLC cần chuẩn hóa:

+ 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 hóa 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 thỏa mãn cho việc phân tích thì nên chuẩn hóa lại cột và ghi ngày tháng thực hiện vào bảng theo dõi.

. Chuẩn hóa 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 0,02mg/l

Phenol 1,00mg/l

Anisol 1,50mg/l

- Điều kiện sắc ký:

Pha động: methanol - nước (60 : 40)

Tốc độ dòng: 1ml/phút

Thể tích tiêm: 20μL

Detector: UV 254nm

. Tính toán:

- Hệ số dung lượng (k')

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

t₀: 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 hóa cột sắc ký pha thuận

- Chuẩn bị dung dịch: Hòa tan khoảng 0,1 - 0,2ml 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: 1,0ml/phút

Thể tích tiêm: 20 μ L

Detector: UV ở 254nm

- Tính toán tương tự chuẩn hóa 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')	≈ 20	$< 0,7$
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

1.5. 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 đo 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 quy 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 hóa 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 hủy của chất thử trong khi phân tách

Có thể xuất hiện pic lạ trên sắc đồ do dung môi dùng hòa 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 hòa tan mẫu thử phải được xem xét cẩn thận. Lý tưởng nhất là dùng pha động làm dung môi để hòa tan nó.

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 hòa 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 0,45 μm
- 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 nhiễm 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 ds 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 hóa nhờ máy tích phân, máy tính.

1.6. 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 tiến 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 hóa 1 điểm hoặc nhiều điểm.

* *Chuẩn hóa 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

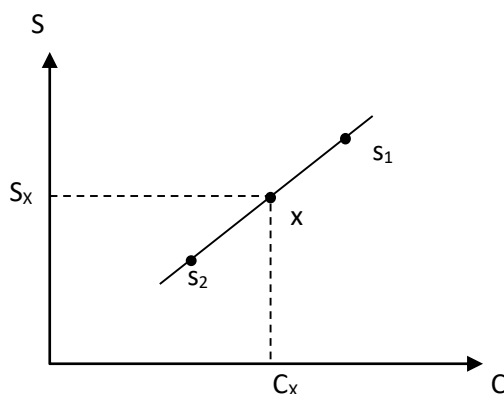
* *Chuẩn hóa nhiều điểm*: Tiến hành qua các bước sau:

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 3.7

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 3.7. Đồ thị phương pháp chuẩn ngoại

- Xây dựng phương trình hồi quy tuyến tính mô tả quan hệ giữa diện tích (hoặc chiều cao) pic với nồng độ của chất cần xác định.

$$Y = a + bC_x \quad (3.19)$$

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 của chất thử

$$C_x = \frac{Y - a}{b} \quad (3.20)$$

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 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 giúp khắc phục được những nhược điểm trên của chuẩn ngoại. 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 hóa 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 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:

$$F_X = \frac{m_C}{m_{IS}} \cdot \frac{S_C}{S_{IS}} = \frac{m_C \cdot S_{IS}}{m_{IS} \cdot S_C} \quad (3.21)$$

$$F_X = \frac{C_C \cdot S_{IS}}{C_{IS} \cdot S_C} \quad (3.22)$$

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.

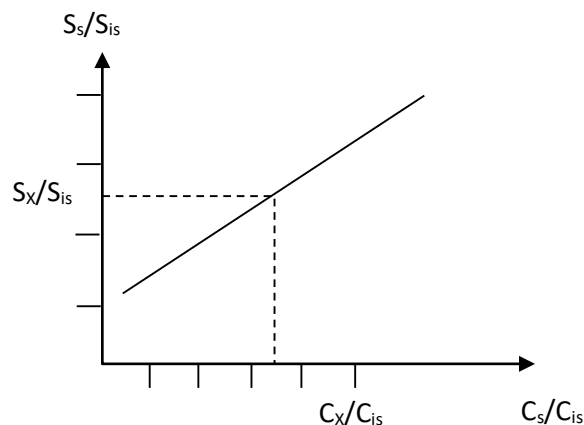
Lượng hoặc nồng độ của thành phần trong mẫu thử được tính như sau:

$$m_T = \frac{S_T}{S_{IS}} m_{IS} F_X \quad (3.23)$$

Tính theo nồng độ ta có:

$$C_T = \frac{S_T}{S_{IS}} C_{IS} F_X \quad (3.24)$$

- 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 3.8), 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 3.8. 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).

Tài liệu tham khảo

1. Trần Tử An, Nguyễn Văn Tuyền (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). Hóa 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.

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 255nm, dùng cuvet 1cm thu được mật độ quang $A = 0,847$.

Tính hệ số hấp thụ phân tử ϵ của chất ở 255nm?

b. Cân chính xác 10,0mg của thuốc nói trên (có phân tử lượng M_w 200,0), đem hòa 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. ϵ $1,32 \cdot 10^4$

b. 84,2%

3.2. Poldin methylsulfat có cực đại hấp thụ ở 257nm. Chuẩn bị 5 dung dịch của nó trong methanol với nồng độ dưới đây và đo độ hấp thụ của của mỗi dung dịch ở $\lambda = 257nm$, cuvet 1cm.

a. Hệ này có tuân theo định luật Lambert - Beer không?

b. $A_{1cm}^{1\%}$ ở 257nm

c. Tính hệ số hấp thụ phân tử ϵ . Biết M_w của poldin sufat 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. Hòa 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 λ 257nm, dùng cuvet 2cm, 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/ $A_{1cm}^{1\%} = 10,5$; c / $\epsilon = 474$; d / 90,2%

3.3. Tolbutamid có M_w 270,4; $\epsilon = 703$ ở 262nm. Nếu một viên nén tolbutamid được hòa tan trong nước và hòa loãng tới đủ 2500ml thì độ hấp thụ của nó $A = 0,520$ ở 262nm, 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 chất 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 361nm được $A = 0,450$. Cho A (1%, 1cm) 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 30cm. 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 1,52 phút 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 cở (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 hóa ngọn lửa?

3.16. Hãy trình bày về phương pháp sử dụng chuẩn nội trong định lượng 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 HÓA HỌC

Bài 1

PHẢN ỨNG ĐỊNH TÍNH VÀ THỬ GIỚI HẠN CÁC TẠP CHẤT TRONG THUỐC

MỤC TIÊU

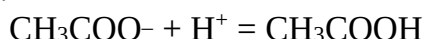
1. Hiểu và trình bày được các phản ứng định tính trong kiểm nghiệm thuốc
2. Biết cách xác định giới hạn các tạp chất trong thuốc

NỘI DUNG

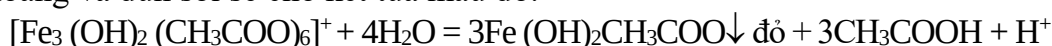
1. Các phản ứng định tính

1.1. Acetat

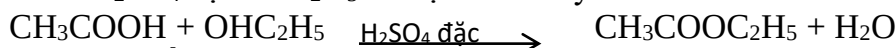
. Phản ứng với các acid (mạnh hơn acid acetic) giải phóng acid acetic có mùi chua:



. 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:

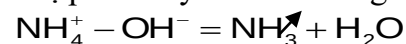


. Với H_2SO_4 đặc và $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ tạo ra este etyl acetat có mùi thơm:



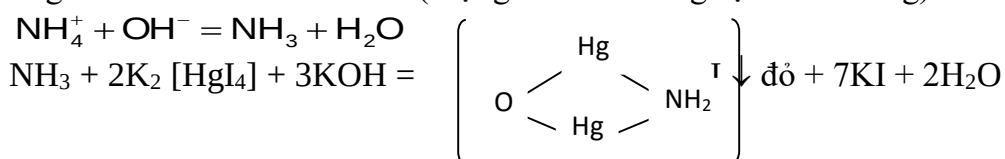
1.2. Amoni (muối)

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



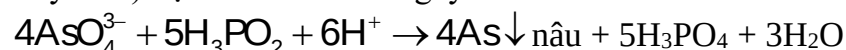
Nhận biết NH_3 bằng các dấu hiệu: Mùi khai, làm xanh giấy quỳ đỏ tẩm ướt, làm hồng giấy tẩm phenolphthalein.

. Thuốc thử Nessler (dung dịch kiềm của muối Kaliiodomercurat - $\text{K}_2[\text{HgI}_4]$ phản ứng với NH_3 cho tủa màu đỏ (lượng nhỏ cho dung dịch màu vàng):



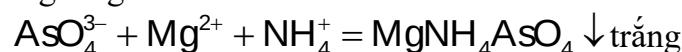
1.3. Arseniat

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



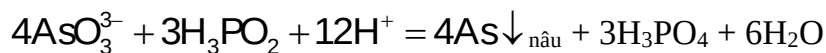
. Phản ứng với AgNO_3 : tạo kết tủa nâu đỏ Ag_3AsO_4 , tủa này không tan trong CH_3COOH , tan trong HNO_3 , dung dịch amoniac.

. Phản ứng với hỗn hợp magnezit ($\text{MgCl}_2 + \text{NH}_4\text{OH} + \text{NH}_4\text{Cl}$): Cho kết tủa tinh thể trắng magnezit amonarseniat:



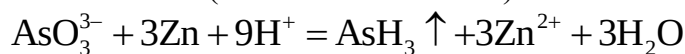
1.4. Arsenit

. Phản ứng Tile:



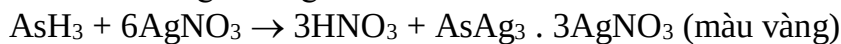
. Phản ứng với AgNO_3 : tạo ra kết tủa trắng hơi vàng Ag_3AsO_3 , tủa này tan trong HNO_3 , trong dung dịch amoniac.

. 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:



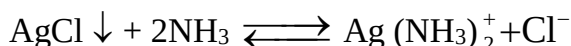
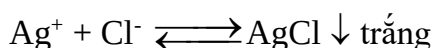
Nếu thêm NaOH và đun nóng sẽ có kết tủa màu đỏ của Cu_2O :



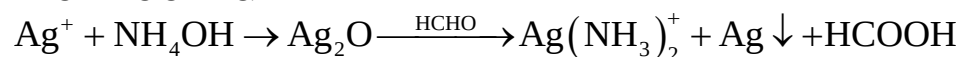
(Phản ứng này dùng để phân biệt giữa AsO_3^{3-} và AsO_4^{3-})

1.5. Bạc (muối)

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

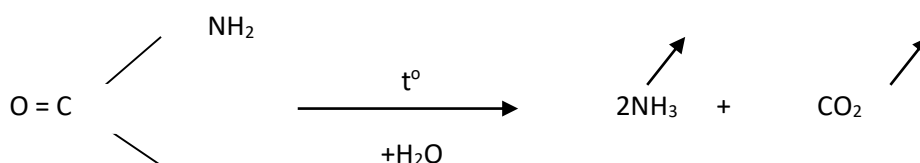
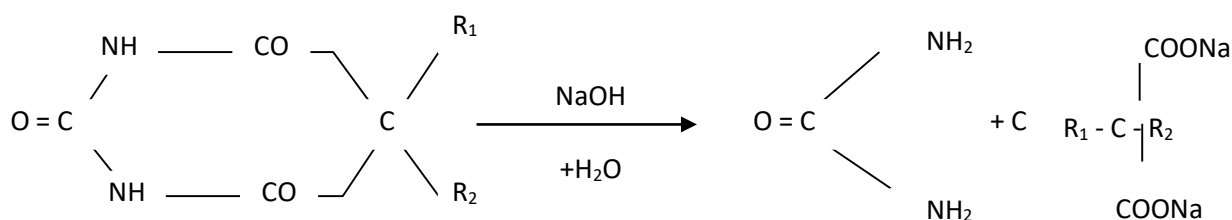


. Phản ứng với formol trong môi trường kiềm bị khử thành Ag có màu đen (phản ứng tráng gương):



1.6. Barbiturat

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



. Tạo ph NH_2 hức có màu với các ion kim loại như Cu^{2+} , Co^{2+} ...

1.7. Bari (muối)

. Phản ứng đốt cho màu ngọn lửa xanh lục hơi vàng

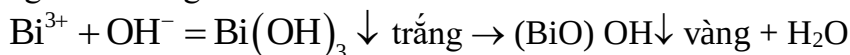
. Phản ứng với H_2SO_4 cho kết tủa BaSO_4 màu trắng, không tan trong các acid vô cơ.

1.8. Bismuth (muối)

. Phản ứng thủy phân:

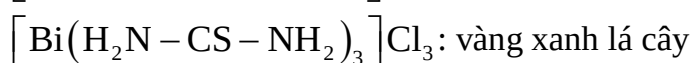
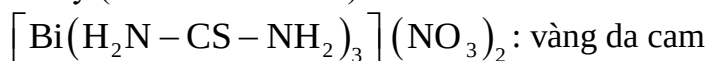


. Tác dụng với dung dịch kiềm: cho tủa $\text{Bi}(\text{OH})_3$ màu trắng, khi đun nóng với nước ngả màu vàng:



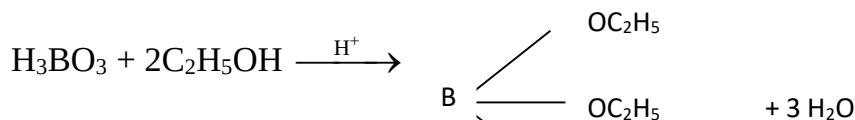
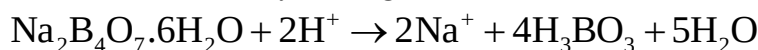
. Phản ứng với S^{2-} : cho tủa nâu đen Bi_2S_3

. Phản ứng với thioure: trong môi trường acid cho màu vàng da cam hay vàng xanh lá cây (nhiều cho kết tủa):



1.9. Borat

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

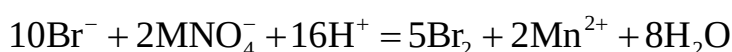
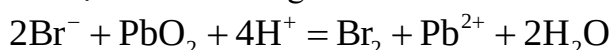


. Trong môi trường acid, borat chuyển từ OC_2H_5 d boric, acid boric phản ứng với giấy nghệ (hoặc cồn nghệ) cho màu nâu đỏ, sau đó tẩm ướt bằng dung dịch kiềm loãng (amoniac hoặc natrihydroxyd) màu nâu chuyển thành màu lam hay lục (do sự tạo phức của cucumin trong nghệ với acid boric).

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 hóa 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:

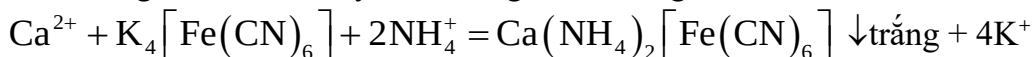


1.11. Calci (muối)

. 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:

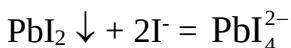
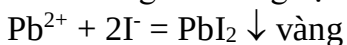


. Phản ứng với Kali ferocyanid: trong môi trường NH_4Cl cho tủa màu trắng:



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:



1.13. Citrat ($C_6H_5O_7^{3-}$)

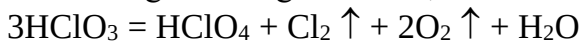
. Cho tủa với Ca^{++} khi đun nóng. Tủa này dễ tan trong dung dịch CH_3COOH 6M.

. Phản ứng tạo thành acid actondicarboxylic: khi đun nóng với H_2SO_4 đặc (hay dung dịch $KMnO_4$), acid citric sẽ bị oxi hóa thành acid acetondicarboxylic $CO(CH_2COOH)_2$. Acid này tạo tủa với muối Hg^{2+} .

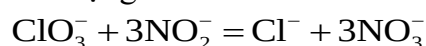
1.14. Clorat

. 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:

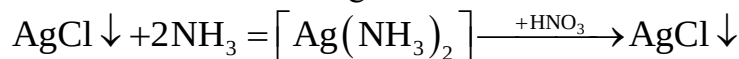


Tác dụng với $NaNO_2$: khử thành Cl^- :

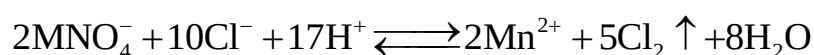


1.15. Clorid

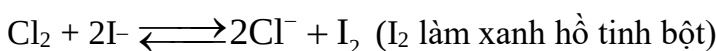
. Phản ứng với $AgNO_3$: cho kết tủa $AgCl$ màu trắng, tủa này tan trong dung dịch amoniac và kết tủa trở lại trong HNO_3 .



. Phản ứng với $KMnO_4$ trong môi trường acid: mất màu $KMnO_4$:

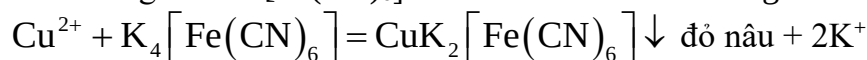


Nhận biết Cl_2 do có mùi đặc biệt hoặc làm xanh giấy tẩm hồ tinh bột có KI:

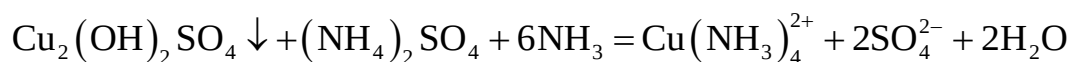
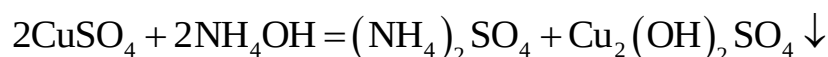


1.16. Đồng (muối)

. Phản ứng với $K_4[Fe(CN)_6]$ cho tủa màu đỏ nâu không tan trong acid acetic

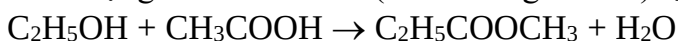


. Phản ứng với dung dịch amoniac: cho tủa muối base màu xanh $Cu_2(OH)_2^{2+}$, muối này tan trong amoniac dư thành phức màu xanh $Cu(NH_3)_4^{2+}$.



1.17. Ethanol

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



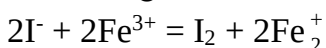
. Tác dụng với dung dịch I_2 trong môi trường kiềm tạo tủa màu vàng iodoform (CHI_3) có mùi đặc biệt:



1.18. Iodid

. Phản ứng với $AgNO_3$ cho tủa màu vàng AgI , tủa này không tan trong amoniac.

. Phản ứng với Fe^{3+} :

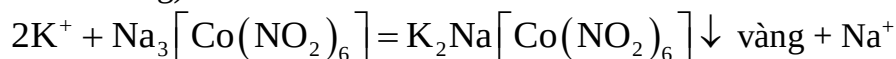


I_2 giải phóng ra có thể chiết vào lớp cloroform có màu tím đỏ.

1.19. Kali (muối)

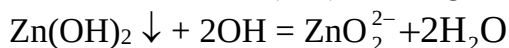
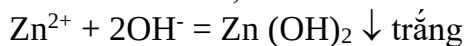
. Phản ứng màu ngọn lửa: muối Kali đốt cho ngọn lửa màu tím (vạch quang phổ có $\lambda = 768 \text{ nm}$ và 404 nm).

. Phản ứng với natri hexanitrocobantat: Cho kết tủa màu vàng (trong môi trường CH_3COOH loãng):



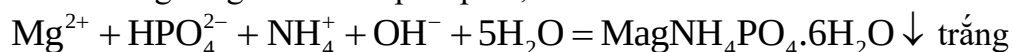
1.20. Kẽm (muối)

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 :



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 amoniphsphat, soi trên kính hiển vi có hình lá dương xỉ:



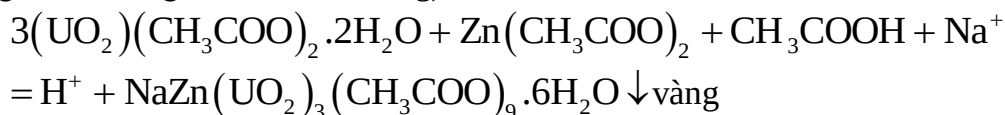
1.22. Natri (muối)

. 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):



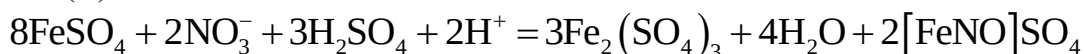
(Có thể dùng muối magnesi cũng được).

1.23. Nhôm (muối)

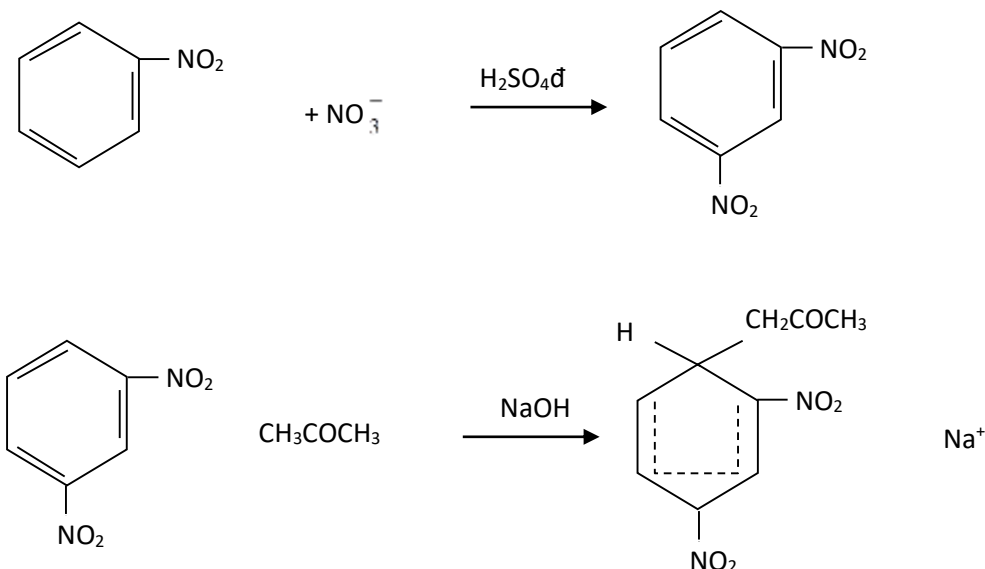
Với thuốc thử đỏ alizarin S tạo hợp chất nội phức có màu đỏ

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:



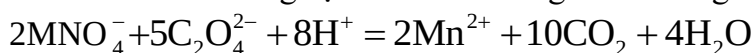
. Phản ứng với nitrobenzen: trong môi trường H_2SO_4 đặc tạo ra m = dinitrobenzen, hợp chất này phản ứng với aceton trong môi trường kiềm tạo thành phức có màu tím (Phản ứng với Janovsky)



1.25. Oxalat

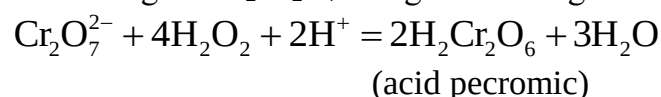
. Phản ứng với CaCl_2 cho kết tủa trắng CaC_2O_4 , tủa này không tan trong các acid vô cơ, không tan trong acid acetic loãng.

. Làm mất màu dung dịch KMnO_4 trong môi trường acid:



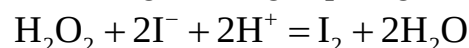
1.26. Peroxyd

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



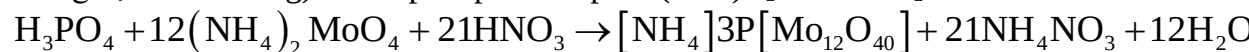
Acid pecromic có màu xanh được chiết bằng ether (acid này dễ bị phân huỷ trong môi trường nước).

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



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 dung dịch FeCl_3 loãng cho phức màu đỏ tím $\text{Fe}(\text{OH})_2 \cdot \text{C}_2\text{H}_5\text{O}_3$

. Phản ứng với HCl loãng cho tủa acid salicylic $\text{C}_6\text{H}_4\text{OHCOOH}$ (có độ nung chảy $156^\circ\text{C} - 161^\circ\text{C}$).

1.29. Sắt (II)

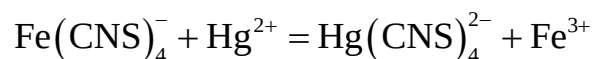
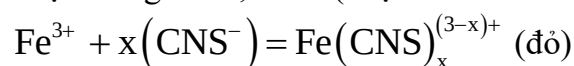
Phản ứng với dung dịch kalifericyanid tạo thành tủa có màu xanh lam (nồng độ nhỏ cho dung dịch keo màu xanh lơ).

Không tan trong dung dịch HCl 2M:

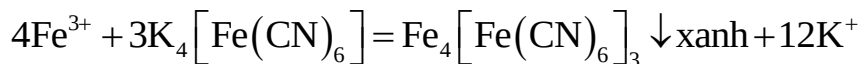


1.30. Sắt (III)

. 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+}).



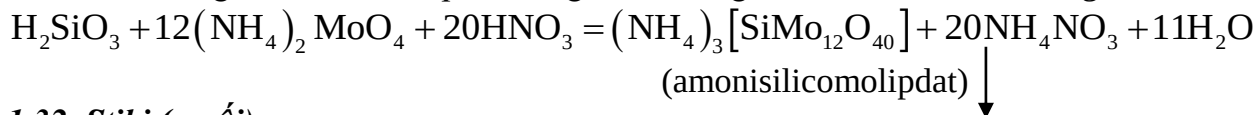
. Phản ứng với kaliferocyanid tạo thành tủa xanh lam không tan trong dung dịch HCl 2M:



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:



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

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 , $\text{SnCl}_2\dots$.

1.34. Sulfur (S^{2-})

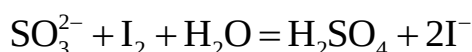
. Tác dụng với HCl loãng giải phóng khí H_2S có mùi thối

. Phản ứng với Pb^{2+} tạo kết tủa màu đen PbS .

1.35. Bisulfit và sulfit (HSO_3^- và SO_3^{2-})

. Tác dụng với dung dịch HCl giải phóng khí SO_2 có mùi đặc biệt.

. Làm mất màu I_2 :

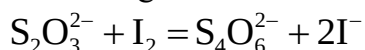


1.36. Tartrat ($\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6^{2-}$ và $\text{HC}_4\text{H}_4\text{O}_6^-$)

Khi phản ứng với H_2SO_4 đặc + resorcin: acid tartric giải phóng ra và phân huỷ thành aldehyd glycolic $\text{OHH}_2\text{C} - \text{CHO}$, chất này sẽ tạo màu tím đậm với resorcin.

1.37. Thiosulfat

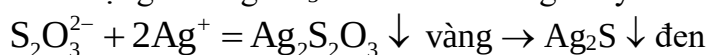
. Phản ứng làm mất màu dung dịch I_2 :



. Tác dụng với HCl cho kết tủa S và giải phóng khí SO_2 :

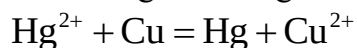


. Tác dụng với AgNO_3 cho kết tủa vàng chuyển dần sang đen:



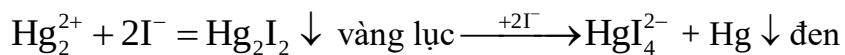
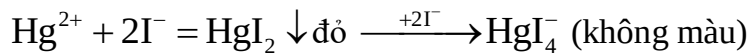
1.38. Thủy ngân (I và II)

. Phản ứng hỗn hồng với đồng:



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

. Với KI:



2. Thử giới hạn các tạp chất trong thuốc

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 có nó có thể:

- Gây tác hại cho sức khỏe (thí dụ tạp chất bari tan, arsen, chì...)
- Gây hiện tượng tương kị hóa 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 hủy thuốc (thí dụ: các vết kim loại, độ ẩm...).

- Một số tạp chất không gây hại, không gây tương kị hóa học, không làm phân hủy thuốc, không gây phản ứng hóa 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 quy 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 quy định cho phép mỗi thuốc chỉ được có những lượng rất nhỏ các tạp chất nhất định để đảm bảo cho thuốc đó có độ sạch nhất định tức là thuốc có chất lượng, đạt hiệu quả tác dụng cao nhất.

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

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 quy định sau:

- Nước và những hóa 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 thủy 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. Pha các dung dịch mẫu

Để pha dung dịch mẫu của một tạp chất 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 hòa tan trong nước và thêm nước cho đủ 1 lít (dùng bình định mức). Dung dịch có chứa:

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

- Dung dịch B (dung dịch mẫu chuẩn đem thử): Lấy chính xác 1ml 00 dung dịch A pha loãng bằng nước cho đủ 100,0ml. Dung dịch này có chứa

$$\frac{0,0005}{100} = 0,000005 \text{g Cl}^-/\text{ml} \text{ (tương đương } 0,005 \text{mg Cl}^-/\text{ml} \text{ hay dung dịch } 0,0005\%$$

hoặc 5 phần triệu).

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%):

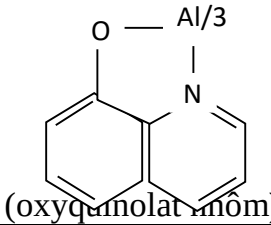
Vì dung dịch mẫu Cl^- khi đem thử là dung dịch có chứa 0,0005% (hay 5 phần triệu). Do đó hệ số pha loãng dung dịch thử sẽ là $\frac{0,01}{0,0005} = 20 \Rightarrow$ Ta có cách pha

như sau: Cân 1,000g paracetamol hòa tan trong nước cho đủ 20,00ml, lọc. Lấy 10,000ml dịch lọc đem thử và so sánh với 10,00ml 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 csot ính này).

2.3. Một số thuốc thử trong các phản ứng hóa 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	$\left[\begin{array}{c} \text{Hg} \\ \text{O} \diagup \quad \diagdown \\ \text{Hg} \end{array} \right] \text{I} \text{NH}_2$	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 tím

			HgCl ₂ chuyển từ vàng sang nâu
Kim loại nặng	- Na ₂ S (H ₂ S) - Thioacetamid	PbS ↓	Đen hoặc nâu
Sắt	- acid mercapto-acetic - acid sunfosaliciclic	- Feri mercaptoacetat - Ferisulfisalicylat	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

Bài 2

CHUẨN ĐỘ ACID- BASE TRONG MÔI TRƯỜNG KHAN VÀ XÁC ĐỊNH HÀM LƯỢNG NƯỚC THEO THUỐC THỬ KARL FISCHER

MỤC TIÊU

1. Giải thích được kỹ thuật định lượng các acid, base và các loại muối trong môi trường khan.
2. 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.
3. Viết được phương trình phản ứng định lượng một số chất hữu cơ (polyol, và amino alcol) bằng thuốc thử periodat.
4. Phân tích được ứng dụng của cặp ion trong kiểm nghiệm thuốc.

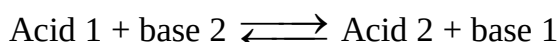
NỘI DUNG

1. Chuẩn độ acid - base trong môi trường khan

Chuẩn độ trong môi trường khan dựa trên phản ứng trung hòa 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/ base 1 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*.

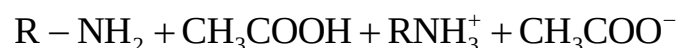
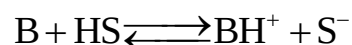
1.1. Vai trò của dung môi

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

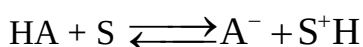
. *Solvat hóa chất tan:*

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 li 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:

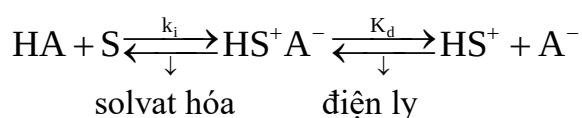
- $\epsilon > 50$ như nước, formamid, dimethylsulfoxid: acid và base tồn tại chủ yếu dưới dạng ion tự do.

- $\epsilon < 30$ 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:

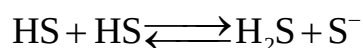


1.2. Khái niệm pH

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

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



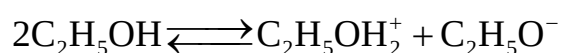
H_2S^+ là ion lionium, S^- là anionlyat, pH biểu kiến là $\text{pH} = -\lg a_{\text{H}_2\text{S}^+}$, ở đây:

$$a_{\text{H}_2\text{S}^+} \cdot a_{\text{S}^-} = K_s$$

Ví dụ:



$$K_s = [\text{CH}_3\text{COOH}_2^+][\text{CH}_3\text{COO}^-]$$



$$K_s = [\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}_2^+][\text{C}_2\text{H}_5\text{O}^-]$$

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

Ví dụ:

- Methanol: $\text{p}K_s = 17$

- Ethanol: $\text{p}K_s = 20$

- Acid acetic: $\text{p}K_2 = 6,35$

1.3. 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.

1.4. 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.

- Các 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.

1.4.1. 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 trong 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 thủy tinh khi chuẩn độ đo thế

- Dung dịch chuẩn R₄NOH là base mạnh, mạnh hơn dung dịch hydroxy 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: C₆H₅COOH, E = M = 122,12

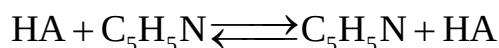
- Acid succinic (CH₂COOH)₂, E = M/2 = 59,05

- Acid sulfamic NH₂SO₃H, E = M = 97,09

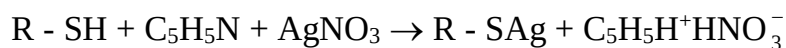
- Kalihydrophthalat, E = M = 204,22

. *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



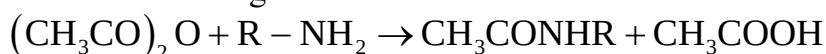
1.4.2. Định lượng các base hữu cơ

Các alcaloid và base nito 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.

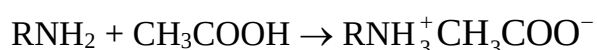
. *Chất chuẩn*

Thường dùng kali hydrophthalat

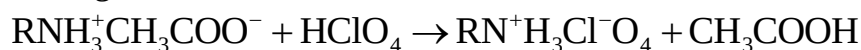
. *Phản ứng chuẩn độ*

Thường được viết thành 2 giai đoạn

- Solvat hóa



- Trung hòa



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 (đo hằng số ϵ của dung môi tăng lên).

1.4.3. 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 hòa bằng $HClO_4$. Vì vậy phản ứng không đặc hiệu

. Muối của acid mạnh hơn acid acetic BH^+Y^-

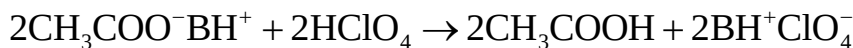
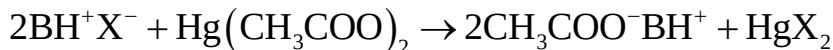
X^- là các halogenid, anion sulfat. Người ta phân ra hai trường hợp:

- 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 $HClO_4$

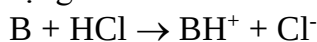


Ở đây định lượng muối BH^+X^- thông qua anion CH_3COO^- (thay cho anion X^-) tương tự Y^- trong trường hợp trên.

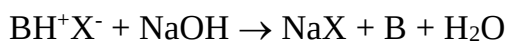
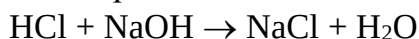
+ Phương pháp Billon

Hòa tan muối trong ethanol, BH^+ trong dung môi này là acid tương đối mạnh, có thể được trung hòa 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 hòa bằng $NaOH$



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

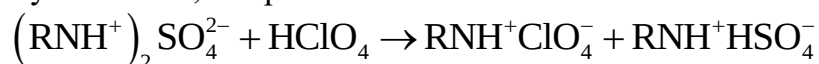
Nhược điểm chính của phương pháp này là sự chênh lệch sức acid của HCl và BH^+X^- phải đủ lớn để có 2 bước nhảy. Mặt khác B là base không quá yếu trong ethanol.

- Muối sulfat

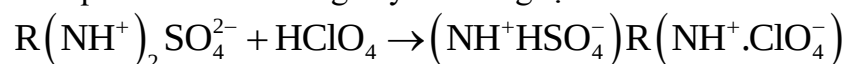
H_2SO_4 có thể tạo nhiều dạng muối với base hữu cơ đơn chức (strychnin, atropin) hoặc đa chức (quinin).

+ 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 $(RNH^+)_2SO_4^-$ như strychnin sulfat, atropin sulfat.



Với quinin bisulfat cũng xảy ra tương tự



1mol $HClO_4$ ứng với 1 mol muối sulfat

+ Muối không trung tính như quinin sulfat basic



1mol muối cần 3mol $HClO_4$ để trung hòa

- 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 hòa như một base.

+ Với hydroxyd: trung hòa trực tiếp bằng $HClO_4$

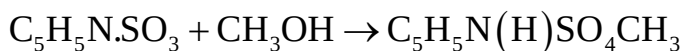
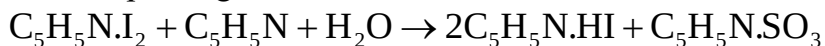
+ Với halogenid: thêm $Hg(II)$ acetat như trong phương pháp Pifer Wollish.

2. Xác định hàm lượng nước bằng thuốc thử Karl Fischer

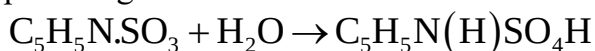
Có nhiều kỹ thuật xác định hàm lượng nước trong chất rắn, trong dung môi hữu cơ. ở đây giới thiệu phương pháp dùng thuốc thử Karl Fischer dựa vào tính chất oxy hóa của iod.

2.1. Nguyên tắc

Thuốc thử này gồm có iod, SO₂, 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 tiên thụ 1 phân tử nước. Phản ứng thứ 2 xảy ra khi có dư CH₃OH là cần thiết, quyết định sự thành công của chuẩn độ vì phức SO₃ cũng phản ứng với nước.



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

2.2. Pha chế và xác định độ chuẩn

. Pha chế

Cơ chế phản ứng chỉ rõ một phân tử iod oxy hóa một phân tử SO₂ tiêu thụ một phân tử nước trong môi trường có dư pyridin và methanol. Khi pha thuốc thử người ta dùng một lượng dư SO₂ và pyridin. Vì vậy phản ứng của thuốc thử với nước do lượng I₂ quyết định. Độ chuẩn của thuốc thử thường 2 đến 5mg H₂O/ml. Lượng SO₂ 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: SO₂ và pyridin trong methanol

Dung dịch B: I₂ trong methanol khan

Khi dùng trộn 1 thừng 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 hydrat (C₄H₄Na₂. 2H₂O) hay được lựa chọn.

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

2.3. 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. 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 quy trình phân tích cho phù hợp.

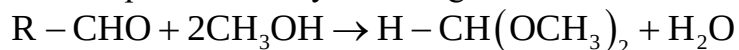
. Nếu mẫu dễ tan trong methanol, người ta dùng chuẩn độ trực tiếp nước trong các chất hữu cơ như acid, alcol, ester, anhydrid, kể cả các muối ngậm nước.

. 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.

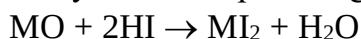
. Một cải tiến khác là chiết hồi lưu nước trong mẫu bằng methanol khan. Xác định lượng nước chiết xuất được bằng chuẩn độ trực tiếp. Kỹ thuật này rất thích hợp cho định lượng hấp thụ, nước kết tinh.

. Cần lưu ý là một số phản ứng hóa học cản trở phương pháp Karl Fischer cho 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 thử phản ứng với iod của thuốc thử.

Chương 5

MỘT SỐ PHƯƠNG PHÁP SINH HỌC TRONG KIỂM NGHIỆM THUỐC

MỤC TIÊU

1. Trình bày được phương pháp làm môi trường nuôi cấy vi sinh vật và nêu được các phương pháp khử trùng.
2. Trình bày được mục đích, nguyên tắc, phương pháp thử chất gây sốt, độ vô khuẩn và giới hạn nhiễm khuẩn của chế phẩm bào chế và nguyên liệu làm thuốc.

NỘI DUNG

Trong phụ lục 10 của Dược điển Việt Nam III có trình bày phương pháp kiểm nghiệm thuốc bằng phương pháp sinh học. Trong khuôn khổ của tài liệu này, chúng tôi trình bày ba phép thử đánh giá chất lượng thuốc là thử chất gây sốt, thử giới hạn nhiễm khuẩn và thử độ vô trùng.

1. YÊU CẦU CƠ BẢN CỦA PHÒNG KIỂM NGHIỆM VI SINH VẬT

1.1. Quy tắc an toàn trong phòng kiểm nghiệm vi sinh vật

Cán bộ làm việc tại phòng kiểm nghiệm vi sinh phải có đủ kiến thức và kinh nghiệm về công tác kiểm nghiệm vi sinh và phải tuân theo các quy tắc an toàn trong khi làm việc.

1.1.1. Yêu cầu về phòng kiểm nghiệm vi sinh

Diện tích làm việc, các khu vực trong phòng được phân chia và bố trí phù hợp, khoảng cách làm việc hợp lý để hạn chế tối đa sự di chuyển trong phòng (làm xáo động không khí và làm tăng nguy cơ nhiễm). Hệ thống chiếu sáng đầy đủ, có hệ thống thông khí để tránh sự đọng bụi và lan truyền các vi sinh vật... Khu vực thao tác nuôi cấy nên được lắp đặt đèn tử ngoại để diệt trùng không khí và không gian thao tác. Chú ý tránh hoặc không dùng quạt trong phòng kiểm nghiệm vi sinh, tránh đổ môi trường, hoá chất trực tiếp dưới ánh sáng mặt trời.

1.1.2. Các quy tắc an toàn trong phòng kiểm nghiệm vi sinh

Do thực tế cán bộ phòng kiểm nghiệm vi sinh phải thao tác trực tiếp với các vi sinh vật, đồng thời có nhiều chủng vi sinh vật gây bệnh nên khi tiến hành làm việc phải hết sức cẩn thận với các chủng đang thao tác. Chú ý phải nắm vững nguyên tắc, phương pháp làm việc với vi sinh vật. Không ăn uống, hút thuốc trong phòng kiểm nghiệm. Trong khi làm việc phải mặc áo blouse, mang khẩu trang khi thao tác với vi sinh vật. Trước khi bắt đầu thử nghiệm cần sát trùng mặt bàn, sát trùng tay bằng cồn 70°C hoặc dung dịch chất diệt khuẩn khác, để khô. Sau khi hoàn thành công việc lại tiến hành sát trùng như trên. Trường hợp vô tình bị đổ, nhiễm vi sinh vật ra nơi làm việc, dùng khăn giấy thấm chất diệt khuẩn lau kỹ, sau đó khử trùng lại bàn làm việc.

Phải ghi chú tên vi sinh vật, ngày tháng thí nghiệm lên tất cả các hộp Petri, ống nghiệm môi trường, bình nuôi cấy.

Tất cả chất thải rắn, môi trường chứa hoặc nhiễm vi sinh vật cần được hấp khử trùng trước khi thải đi.

Các dụng cụ, bình chứa nhiễm vi sinh vật cần được ngâm vào dung dịch chất diệt khuẩn (nước Javel) trước khi rửa và tái sử dụng.

1.2. Dụng cụ, thiết bị

- Các dụng cụ bằng thủy tinh: ống nghiệm, đĩa Petri, đèn cồn, cốc thủy tinh, bình cầu đáy bằng và tròn, bình tam giác, các loại ống đong, ống hút, ...
- Que cấy: que cấy thẳng, que cấy vòng, que cấy móc.

- Màng lọc vô trùng: màng lọc có kích thước lỗ lọc 0,2 μ m nhỏ hơn đường kính vi khuẩn. VSV sẽ bị giữ lại trên màng lọc còn dung dịch đi qua sẽ vô trùng. Màng lọc có thể bằng cellulose hay hỗn hợp cellulose và muối este của cellulose.

- Thiết bị: nhiệt kế, máy đo pH, tủ sấy, tủ ẩm, máy lắc, bể điều nhiệt, tủ lạnh, đèn tử ngoại (UV), nồi hấp, kính hiển vi, bình ủ kỵ khí, ...

- Tủ cấy vô trùng: tủ cấy vô trùng được sử dụng để đảm bảo tính vô trùng cao khi thao tác với vi sinh vật. Không khí trong tủ cấy vô trùng được cung cấp qua hệ thống lọc không khí. Đèn tử ngoại có tác dụng khử trùng bề mặt bàn thao tác trong tủ cấy và bề mặt các dụng cụ thiết bị khác. Trước khi sử dụng tủ cấy vô trùng cần bật đèn tử ngoại trước 30-60 phút. Khi bắt đầu thao tác, tắt đèn tử ngoại và bật hệ thống lọc không khí.

1.3. Kỹ thuật cơ bản trong phân tích kiểm nghiệm vi sinh vật

1.3.1. Phương pháp pha chế môi trường

Môi trường nuôi cấy vi sinh vật thông thường chứa đầy đủ các thành phần về nguồn carbon, đạm, chất khoáng, các yếu tố sinh trưởng... ngoài ra còn chứa một lượng nước cần thiết (khoảng 70-85%), có pH xác định thích hợp cho sự phát triển của vi sinh vật. Trong một số môi trường đặc biệt có thể thêm các chất kháng sinh, các chất ức chế sự sinh trưởng của một số vi sinh vật theo yêu cầu mục tiêu của thí nghiệm...

Môi trường nuôi cấy thường được phân loại dựa vào tính chất vật lý môi trường và chia thành ở 3 dạng: lỏng (liquid media), rắn (solid media) và bán rắn (semisolid media).

Hiện nay, nhiều hãng sản xuất môi trường chuyên nghiệp đã sản xuất các môi trường dạng đông khô. Các môi trường này thường được điều chế từ cân phân tích như các thành phần vi lượng...

- Với môi trường lỏng: cân các thành phần, hoà tan vào trong nước.

- Với môi trường rắn: bổ sung thêm chất làm rắn như thạch, đồng thời phải gia nhiệt để làm tan môi trường.

Yêu cầu môi trường phải trong để dễ quan sát, trường hợp cần thiết phải lọc qua giấy lọc, gạc hoặc than hoạt. Tuỳ theo đối tượng yêu cầu của thử nghiệm, môi trường được điều chỉnh đến pH qui định bằng HCl 1N hoặc NaOH 1N. Môi trường được khử trùng ở nhiệt độ và thời gian phụ thuộc vào thành phần của môi trường. Với các môi trường bình thường, điều các hoá chất tổng hợp tinh khiết với hàm lượng xác định.

Trong thử nghiệm vi sinh, chất lượng môi trường đóng vai trò quan trọng, vì vậy việc pha chế môi trường cần được thực hiện chính xác, cẩn thận. Cách pha chế như sau:

Để chuẩn bị môi trường cần phải cân đo chính xác từng thành phần của môi trường. Một số thành phần bắt buộc phải cân chính xác trên kiện khử trùng ở 121°C (1atm) với thời gian 15-20 phút.

- Môi trường đông khô: được pha chế đơn giản bằng cách phối hợp một lượng cần thiết môi trường đông khô vào nước, điều chỉnh pH, đóng ống và khử trùng (Trong một số trường hợp không cần điều chỉnh pH).

- Các ống nghiệm đựng môi trường phải sạch và không có bụi. Trường hợp đặc biệt, phải rửa ống nghiệm bên trong bằng nước ấm và xà phòng có sử dụng chổi cọ ống nghiệm. Rửa lại 2 lần nước, lần đầu bằng nước máy, sau đó bằng nước cất để loại trừ xà phòng còn sót lại. úp ngược các ống nghiệm lên rồi để tự ráo nước, chú ý không lau bằng khăn.

Khi phân môi trường ra dụng cụ chứa cần chú ý chỉ dùng 1 phần của dụng cụ chứa. Thông thường với các bình chứa như bình cầu, bình tam giác chỉ đổ 1/3-1/2 dung tích, đóng 5ml môi trường lỏng trong ống nghiệm, 5-7ml đối với ống thạch nghiêng.

1.3.2. Các kỹ thuật khử trùng dụng cụ và môi trường

Có nhiều phương pháp khử trùng vi sinh vật: bằng các tác nhân lý hoá như nhiệt độ, bức xạ, lọc... Tác nhân khử trùng được chọn tùy mục đích và vật liệu cần khử trùng.

***Khử trùng bằng nhiệt:**

Nhiệt độ cao có thể tiêu diệt được các vi sinh vật do tác dụng làm enzym của vi sinh vật bị biến tính, làm mất nước và oxy hoá các tế bào.

- Khử trùng bằng nhiệt khô: thông thường sấy 170°C trong 2 giờ hoặc đốt. Dụng cụ thủy tinh (đĩa petri, ống hút thủy tinh...) bền với nhiệt nên thường được khử trùng bằng phương pháp sấy ở 180°C trong 2 giờ trong tủ sấy (chú ý các ống hút cần được nhét nút bông không thấm nước ở đầu hút). Dụng cụ thủy tinh cần được gói kín trong giấy hoặc giấy nhôm; ống hút được cho vào ống inox trước khi sấy. Các thanh gạt thủy tinh được khử trùng bằng cách đốt với cồn 70°C và các que cấy kim loại được khử trùng bằng cách đốt trực tiếp trên ngọn lửa.

- Khử trùng bằng nhiệt ẩm: đun sôi 100°C trong 10 phút để diệt tế bào sinh dưỡng hoặc hấp bằng hơi nước ở 1 atm, 121°C trong 15-30 phút để tiệt trùng hoàn toàn. Phương pháp này thường được dùng để khử trùng môi trường nuôi cấy và dụng cụ phẫu thuật.

Phương pháp nhiệt ẩm, khử trùng bằng nồi hấp áp lực ở 121°C trong 15-30 phút. Phương pháp này dựa trên nguyên tắc làm tăng nhiệt độ bằng hơi nước bão hoà dưới áp suất lớn hơn áp suất bình thường của khí quyển. Phương pháp có ưu điểm giữ cho các thành phần hữu cơ của môi trường không bị cháy, biến tính và môi trường không bị mất nước

- Phương pháp khử 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 2 lần hấp ủ môi trường ở 28-32°C trong 24 giờ cho bào tử nảy mầm. Các bào tử nào còn lại sống sót nảy mầm sẽ bị diệt ở lần hấp tiếp theo.

- Phương pháp khử trùng nhiệt độ thấp (phương pháp Pasteur): đun cách thủy môi trường 60°C/30 phút hoặc 80°C/15 phút sau đó làm lạnh đột ngột dưới 10°C. Phương pháp này không diệt được bào tử.

Một số trường hợp môi trường có chứa các chất không bền với nhiệt như vitamin, acid amin thường được khử trùng ở 0,5 atm trong 20-30 phút.

* *Khử trùng bằng màng lọc*: sử dụng màng lọc có đường kính lỗ màng lọc là 0,22µm, cho dịch lỏng đi qua, giữ lại các vi khuẩn và vi sinh vật có kích thước lớn hơn. Phần chảy qua phễu được đựng trong các dụng cụ vô trùng. Trước khi dùng thiết bị lọc và màng lọc phải được khử trùng. Phương pháp này thường được sử dụng để khử trùng trong các trường hợp có các chất dễ bị oxy hoá hoặc không bền với nhiệt.

* *Khử trùng bằng bức xạ*: có thể dùng tia X, tia gama, tia tử ngoại để khử trùng. Tia tử ngoại được dùng nhiều nhất để khử trùng các buồng pha chế, tủ cấy vi sinh vật; trong trường hợp này chú ý đèn tử ngoại phải được chiếu trực tiếp, thẳng góc với nơi làm thí nghiệm, công suất và số lượng đèn phù hợp với diện tích buồng cấy. Đèn tử ngoại ít có tác dụng với nấm do đó muốn khử trùng buồng pha chế cần phối hợp thêm dùng hoá chất để diệt nấm.

* *Khử trùng bằng hoá chất*: nhiều hoá chất có thể kiểm soát sự tăng trưởng của vi sinh vật. Etylen oxyd, triethylen glycol... được sử dụng để khử trùng, ức chế

sự phát triển của vi sinh vật. Sử dụng dung dịch Cloramin B; Cloramin T 2% hoặc dung dịch phenol 0,5% để xử lý buồng vô khuẩn. Tiệt khuẩn không khí bằng dung dịch formaldehyd (500ml cho 1 lít nước).

1.3.3. Các kỹ thuật thao tác vô trùng

Trong kiểm nghiệm vi sinh vật, các chủng vi sinh vật cần được cấy vào nhiều môi trường khác nhau để tăng sinh, khảo sát đặc tính sinh trưởng của vi sinh vật, các thử nghiệm sinh hoá... Việc cấy chủng cần chú ý thực hiện để không đưa các vi sinh vật khác vào hay vi sinh vật nhiễm vào môi trường vì vậy các thao tác cần hết sức cẩn thận để loại trừ các vi sinh vật gây nhiễm. Để đảm bảo có được trạng thái vô trùng trước khi sử dụng, môi trường và các dụng cụ cần được khử trùng thích hợp.

Các thao tác vô trùng phải thực hiện trong không gian vô trùng được tạo ra bởi ngọn lửa đèn cồn hoặc trong tủ cấy vô trùng. Người tiến hành thử nghiệm cần mang găng tay hoặc sát trùng tay với cồn 70° (hoặc các dung dịch tiệt khuẩn), sát trùng mặt bàn thao tác. Sau khi thực hiện xong việc cấy chủng lại tiến hành sát trùng tay, mặt bàn tương tự như trên.

* *Khử trùng que cấy*: Đốt nóng đầu que cấy trong ngọn lửa và đốt nhẹ phần cán. Cầm thẳng đứng que cấy lên cho que nóng đều. Mở nút bông và đưa ngay que cấy đã khử trùng vào dụng cụ chứa giống. áp đầu que cấy vào thành ống nghiệm, bình chứa hoặc đặt nhẹ lên phần môi trường không chứa vi sinh vật để làm nguội que cấy trước khi lấy vi sinh vật.

* *Chuẩn bị ống thạch nghiêng và đổ đĩa*

- Ống thạch nghiêng: Ngay sau khi khử trùng, đặt đầu các ống nghiệm đựng môi trường rắn cao để tạo độ nghiêng sao cho chiều dài của môi trường trong ống không quá 2/3 chiều cao ống, thạch không được chạm vào nút bông. Để nguội.

- Đổ đĩa: đổ ở nhiệt độ 45-55°C vừa hạn chế sự ngưng tụ hơi nước trên nắp đĩa petri vừa tạo được bề mặt môi trường phẳng. Đổ đĩa trong tủ cấy vô trùng, bề dày môi trường trong đĩa là 3-4mm.

2. THỬ GIỚI HẠN NHIỄM KHUẨN

Thử giới hạn nhiễm khuẩn (hay thử giới hạn vi sinh vật) là một thử nghiệm bắt buộc cho các dược phẩm từ nguyên liệu đến thành phẩm không được tiệt trùng trong quá trình sản xuất.

2.1. 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*.

2.2. 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.

2.3. Phương pháp thử xác định giới hạn tối đa vi sinh vật

2.3.1. Chuẩn bị môi trường

* Môi trường xác định giới hạn vi khuẩn:

Môi trường thạch Casein - Đậu tương

Pepton casein	15,0 g
Pepton đậu tương	5,0 g

NaCl	5,0 g	
Thạch	15,0 g	
Nước cất	1000 ml	
pH = 7,1 → 7,3		
Môi trường thạch thường		
Cao thịt	5 g	
Pepton		10 g
NaCl	5 g	
Thạch	18 g	
Nước cất vừa đủ	1000ml	
pH = 7,4 → 7,6		
* Môi trường xác định giới hạn vi nấm:		
<i>Môi trường thạch Sabouraud - kháng sinh</i>		
Pepton	10 g	
Glucose	20 g	
Thạch	20 g	
Nước cất	1000 ml	
pH = 5,6 → 6,0		

Thêm 50 mg cloramphenicol trong 1 lít môi trường trước khi tiệt trùng hoặc dùng benzyl penicillin hoặc tetracyclin cho vào môi trường sau khi tiệt trùng.

2.3.2. Chuẩn bị mẫu thử

Mẫu thử theo quy định chung được lấy 10g (hoặc 10 ml) để thí nghiệm.

2.3.3. Đếm số lượng vi sinh vật

Cho vào mỗi đĩa petri 1ml chất thử ở nồng độ thích hợp sao cho không quá 300 khuẩn lạc vi khuẩn và 100 khuẩn lạc vi nấm trong 1ml. Thêm 15 – 20ml môi trường thạch casein - đậu tương hoặc môi trường thạch thường đối với đĩa xác định số lượng vi khuẩn và 15 – 20ml thạch Sabouraud - kháng sinh đối với đĩa xác định số lượng vi nấm đã để nguội dưới 45°C. Nuôi cấy 30 – 35°C trong 1 – 2 ngày đối với đĩa xác định số lượng vi khuẩn và 25 – 28°C trong 4 – 5 ngày đối với đĩa xác định số lượng vi nấm.

Ví dụ: Xác định số lượng vi khuẩn hiếu khí, vi nấm trong 1ml bỏ phế chỉ khái lộ.

Tiến hành: Dùng cùn 70° sát trùng bên ngoài lọ. Lấy 10ml chế phẩm pha vào 90ml dung dịch NaCl 0,9% để được nồng độ pha loãng 10^{-1} . Pha loãng tiếp được nồng độ 10^{-2} . Cho vào mỗi hộp petri 1ml dung dịch chất thử của mỗi nồng độ. Thêm 15ml dung dịch môi trường thạch thường đã đun chảy để nguội khoảng 45°C đối với đĩa xác định số lượng vi khuẩn và môi trường Sabouraud – kháng sinh đối với đĩa xác định số lượng vi nấm. Xoay nhẹ đĩa để chất thử trộn đều vào môi trường. Mỗi nồng độ làm 2 đĩa thử song song. Điều kiện nuôi cấy như trên.

Sau thời gian nuôi cấy, đếm số khuẩn lạc vi khuẩn, vi nấm mọc trên các đĩa thử.

2.3.4. 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).

A₁: số khuẩn lạc vi sinh vật trung bình ở nồng độ pha loãng k₁.

A₂: số khuẩn lạc vi sinh vật trung bình ở nồng độ pha loãng k₂.

k_1, k_2 : độ pha loãng.

Các được điền 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} .

Bảng 6.1. Yêu cầu giới hạn nhiễm khuẩn

Mức	Loại chế phẩm	Yêu cầu
1	Các chế phẩm dùng cho bỏng và các vết loét sâu.	Không có các vi khuẩn có thể sống lại trong 1 g (ml) mẫu thử.
2	Các chế phẩm dùng tại chỗ như chữa xung tấy, tổn thương và các màng nhầy (mũi, họng, tai âm đạo) ...	Tổng số vi khuẩn hiếu khí không quá 100 trong 1g (ml) . Mẫu thử phải không có nấm và mốc trong 1g (ml)
3	Các chế phẩm dùng tại chỗ cho da như kem bôi, nước thơm, dầu, dung dịch, bột ...	Tổng số vi khuẩn hiếu khí không quá 500 trong 1g (ml). Mẫu thử phải không có nấm và mốc trong 1g (ml)
4	Các chế phẩm dùng uống; qua trực tràng; thấm qua da.	Tổng số vi khuẩn hiếu khí không quá 10^4 trong 1g (ml). Nấm và mốc không quá 100 trong 1g (ml).
5	Các chế phẩm có chứa các nguyên liệu có nguồn gốc thực vật, động vật không thể xử lý theo quy trình làm giảm lượng vi khuẩn	Tổng số vi khuẩn hiếu khí sống lại được không quá 5.10^4 trong 1g (ml). Nấm và mốc không quá 500 trong 1g (ml).

3. THỬ VÔ TRÙNG

3.1. Mục đích

Mục đích của 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 (dụng cụ phẫu thuật mà theo tiêu chuẩn riêng cần phải vô trùng.

3.2. Nguyên tắc

Vi sinh vật có trong chế phẩm thử sẽ phát triển trên các môi trường dinh dưỡng thích hợp; trong môi trường lỏng, vi sinh vật làm đục môi trường, tạo vẩn 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.

3.3. Môi trường

Trong nhiều Dược điển để phát hiện vi khuẩn hiếu khí, kỵ khí thường dùng môi trường Thioglycolat lỏng và để phát hiện vi khuẩn, vi nấm dùng môi trường Casein - đậu tương lỏng. 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 (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 để phát hiện vi nấm).

Ví dụ:

- Môi trường Thioglycollat:

Agar	0,75 g
Yeast extract	5,0 g

Pepton casein	15,0 g
Glucose	5,5 g
Na thioglycollat	0,5 g
NaCl	2,5 g
L-Cystine	0,5 g
Resazurin	0,001g
Nước cất	1lít

Hấp tiệt trùng ở 120°C trong 20 phút, lấy ra làm lạnh ngay, pH=6,9 → 7,3.

- Môi trường canh thang casein- đậu tương lỏng:

Pepton casein	17,0 g
Pepton đậu tương	3,0 g
NaCl	5,0 g
K ₂ HPO ₄	2,5 g
Glucose	2,5 g
Nước cất	1000 ml

Tiệt trùng ở 121°C, 1 atm trong 20 phút, pH = 7,1 → 7,3.

3.4. Phương pháp thử

Thử vô trùng bằng phương pháp nuôi cấy trực tiếp. Phương pháp 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).

3.4.1. Lượng mẫu thử dùng trong thí nghiệm

Lượng mẫu thử cần cấy vào các môi trường tùy thuộc vào từng loại mẫu (bảng 6.4).

Bảng 6.2. 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
- Chất lỏng:		
Thể tích V < 1ml	Toàn bộ một ống	10 ml
1 ml ≤ V < 4 ml	1/2 ống	15 ml
4 ml ≤ V < 20ml	2ml	20 ml
20ml ≤ V < 50ml	5ml	40 ml
50ml ≤ V < 100ml	10ml	80 ml
V ≥ 100ml	Thường 10%	100 ml
- Chất rắn:		
Khối lượng P < 50mg	Toàn bộ một đơn vị đóng gói	20 ml
50mg < P < 200mg	1/2 khối lượng của một đơn vị đóng gói	40 ml
P ≥ 200mg	100mg	80 ml

– 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).

3.4.2. Kỹ thuật thử

Kiểm tra độ vô khuẩn mẫu thử là được phẩm thì 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.

Ví dụ: Thử vô trùng thuốc tiêm vitamin B₁.

- *Dụng cụ thí nghiệm: pipet 1ml, ống nghiệm, kẹp sắt, đèn cồn. Các dụng cụ rửa sạch, tiệt trùng khô ở 160°C trong 2 giờ trước khi dùng.*

- Pha chế môi trường: sử dụng môi trường canh thang và môi trường Sabouraud lỏng. Hoà tan từng chất vào nước, đun nóng cho tan hoàn toàn, điều chỉnh pH bằng NaOH 1N hoặc HCl 1N. Điều chỉnh cho đủ thể tích, phân chia môi trường vào ống nghiệm, mỗi ống 10ml. Tiệt trùng bằng nồi hấp autoclave ở 121°C, 1atm trong 15-20 phút.

- Tiến hành: sát trùng ống tiêm bằng cồn 70°. Bỏ đầu ống tiêm bằng kẹp sắt vô trùng. Hút toàn bộ thuốc trong 1 ống cho vào 10ml môi trường canh thang và 1 ống khác được cấy vào môi trường Sabouraud (mỗi môi trường làm 2 ống). ống phát hiện vi khuẩn nuôi cấy ở 30-35°C ít nhất trong 4 ngày và ống phát hiện vi nấm nuôi cấy ở 25 ± 2°C ít nhất trong 7 ngày. Mỗi loại môi trường làm 2 – 3 ống thử song song.

3.4.3. Nhận định kết quả

Trong suốt thời gian nuôi cấy, hàng ngày phải kiểm tra các ống nuôi cấy. Nếu sau thời gian nuôi cấy không có sự xuất hiện vi sinh vật, mẫu thử được coi là vô trùng. Nếu có 1 hoặc nhiều ống có vi sinh vật phải làm lần 2. ở lần 2, nếu không có vi sinh vật mọc, ta kết luận là chế phẩm vô trùng, trường hợp có nhiễm vi sinh vật phải tiến hành phân lập so sánh với vi sinh vật đã bị nhiễm ở lần 1. Nếu có vi sinh vật giống lần 1 thì mẫu thử không vô trùng; nếu có vi sinh vật khác lần 1, thí nghiệm được làm lại lần 3 với số mẫu gấp đôi. Trong lần 3 nếu không có vi sinh vật, mẫu vô trùng; nếu có vi sinh vật, mẫu thử không vô trùng.

4. THỬ CHẤT GÂY SỐT

Trong kiểm nghiệm thuốc tiêm hoặc dung dịch tiêm truyền đều phải đánh giá chỉ tiêu này. Hiện nay có 2 phương pháp thử.

* Phương pháp in vitro: sử dụng thuốc thử LAL (Limulus Amebocyte Lysate), thuốc thử này khi gặp chất gây sốt sẽ tạo ra một tua gel có thể phát hiện được bằng mắt thường.

* Phương pháp sinh học: dùng để đánh giá chất lượng mẫu thử dựa trên sự tăng thân nhiệt của thỏ sau khi tiêm vào tĩnh mạch thỏ dung dịch của mẫu thử. Đây là phương pháp thử chất gây sốt hiện nay Dược điển Việt Nam quy định.

4.1. Động vật thí nghiệm

Dùng thỏ khoẻ mạnh, trưởng thành, đực hoặc cái không có chữa, cân nặng từ 1,5 kg trở lên chưa dùng vào thí nghiệm khác. Có thể dùng lại những thỏ đã thử chất gây sốt nhưng phải cho nghỉ hai ngày, nếu lần thử trước âm tính, hoặc hai tuần lễ, nếu lần thử trước dương tính. Thỏ được nuôi dưỡng riêng trong chuồng bằng thức ăn tổng hợp không có chất kháng sinh. Nhà chăn nuôi phải sạch sẽ, thoáng, yên tĩnh và có nhiệt độ ổn định, chênh lệch với nhiệt độ phòng thí nghiệm không quá ± 3⁰ C.

4.2. Thiết bị, dụng cụ

Nhiệt kế hay thiết bị điện để đo nhiệt độ phải có độ chính xác ± 0,1⁰C. Khi đo nhiệt độ, nhiệt kế được đặt sâu trong trực tràng thỏ ít nhất 5 cm và tối thiểu 5 phút.

Nếu là thiết bị điện, phải để yên trong trực tràng ít nhất 60 phút trước khi đo nhiệt độ và giữ nguyên ở vị trí đó trong suốt thời gian thí nghiệm.

Các dụng cụ thủy tinh, bơm tiêm, kim tiêm phải rửa sạch, tráng nước cất và loại chất gây sốt bằng cách sấy ở 250°C trong 30 phút hoặc 200°C trong 60 phút.

4.3. Tiến hành

Thí nghiệm được tiến hành ở nơi yên tĩnh, tránh các yếu tố kích động. Độ ẩm và nhiệt độ của phòng phải ổn định. Giữ thỏ trên bàn bằng các giá kẹp ở cổ sao cho thỏ vẫn ở tư thế thoải mái nhất. Không cho thỏ ăn trong thời gian thí nghiệm.

1-3 ngày trước ngày tiêm mẫu thử, kiểm tra sơ bộ với những thỏ đạt tiêu chuẩn nhưng không được dùng thử chất gây sốt trong vòng 2 tuần trước đó. Sau khi thỏ ở vị trí ổn định, đo nhiệt độ thỏ 3 lần, mỗi lần cách nhau một giờ. Những thỏ có nhiệt độ chênh lệch giữa các lần đo $\geq 0,6^{\circ}\text{C}$ không dùng vào thí nghiệm.

Trong ngày tiêm mẫu thử, để thỏ ổn định trong phòng thí nghiệm ít nhất 90 phút trước khi tiêm. Ngay trước lúc tiêm 40 phút, đo nhiệt độ thỏ 2 lần cách nhau 30 phút. Nhiệt độ ban đầu của thỏ là giá trị trung bình của hai lần đo này. Chỉ những thỏ có nhiệt độ chênh lệch giữa hai lần đo không quá $0,2^{\circ}\text{C}$ và nhiệt độ ban đầu trong khoảng từ 38°C – 39°C mới dùng để tiêm mẫu. Mỗi lần thử được tiêm cho một nhóm 3 thỏ có nhiệt độ khác nhau không quá 1°C .

Đo nhiệt độ thỏ ở cách nhau khoảng 30 phút/ lần, trong 3 giờ sau khi tiêm. Nhiệt độ tối đa sau khi tiêm là nhiệt độ cao nhất đo được trong khoảng thời gian này.

Liều lượng và cách xử lý mẫu được quy định trong các chuyên luận riêng. Nếu mẫu thử là dung dịch nhược trương thì phải đẳng trương bằng natri clorid không có chất gây sốt. Thể tích dùng để tiêm có thể thay đổi từ 0,5-10 ml/kg thỏ. Khi tiêm với thể tích lớn, nên để nóng dung dịch đến 38°C .

Thời gian tiêm cho một thỏ không kéo dài quá 4 phút. Trường hợp dùng các thiết bị đo nhiệt độ có gài đặt chương trình, giữ nhiệt kế trong trực tràng thỏ trong suốt thời gian thí nghiệm. Đo nhiệt độ thỏ ở những khoảng thời gian ít nhất 30 phút và đánh giá kết quả thu được.

4.4. Đánh giá kết quả

Đáp ứng của mỗi thỏ là hiệu số của nhiệt độ tối đa sau khi tiêm mẫu thử và nhiệt độ ban đầu.

Đáp ứng của thỏ bằng 0 nếu nhiệt độ tối đa sau khi tiêm thuốc đem thử chỉ bằng hoặc thấp hơn nhiệt độ ban đầu.

Nếu không có thỏ nào có đáp ứng bằng hoặc lớn hơn $0,6^{\circ}\text{C}$ và nếu tổng số đáp ứng của 3 thỏ không vượt quá $1,4^{\circ}\text{C}$ thì mẫu thử đạt yêu cầu về thử chất gây sốt.

Nếu 1 thỏ trở lên có đáp ứng bằng hoặc lớn hơn $0,6^{\circ}\text{C}$, hoặc nếu tổng số đáp ứng của 3 thỏ lớn hơn $1,4^{\circ}\text{C}$ thì phải làm lại thí nghiệm trên 5 con thỏ khác.

Nếu không quá 3 trong số 8 thỏ của hai lần thí nghiệm có đáp ứng bằng hoặc lớn hơn $0,6^{\circ}\text{C}$ và nếu tổng số đáp ứng của 8 thỏ không vượt quá $3,7^{\circ}\text{C}$ thì mẫu thử đạt yêu cầu về thử chất gây sốt.

LƯỢNG GIÁ

- 6.1. Trình bày các quy tắc an toàn trong phòng kiểm nghiệm vi sinh
- 6.2. Trình bày phương pháp pha chế môi trường nuôi cấy vi sinh vật
- 6.3. Mô tả các phương pháp khử trùng?
- 6.4. Trình bày cách khử trùng bằng nồi hấp áp lực
- 6.5. Trình bày cách tiến hành thử chất gây sốt
- 6.6. Trình bày thử nghiệm thử vô trùng bằng phương pháp nuôi cấy trực tiếp?

- 6.7. Nêu mục đích, nguyên tắc của thử nghiệm thử vô trùng và thử giới hạn vi sinh vật?
- 6.8. Trình bày thử nghiệm đếm số lượng vi sinh vật trong 1g (1ml) dược phẩm bằng phương pháp đĩa thạch?
- 6.9. Trình bày phương pháp xác định số lượng tối đa vi khuẩn hiếu khí, vi nấm trong một gam viên lục vị hoàn.
- 6.10. Trình bày phương pháp thử vô trùng thuốc tiêm vitamin B1.

Chọn câu trả lời đúng cho các câu hỏi từ 6.11 bằng cách khoanh tròn chữ cái đầu câu được chọn :

6.11. Đối với qui định giới hạn cho phép về nhiệt độ của thở khi kiểm tra chỉ tiêu chỉ nhiệt tổ đối với dung dịch tiêm truyền:

a/ Cửa từng thở:

- A. Lớn hơn 0°C và không quá $0,6^{\circ}\text{C}$
- B. Không quá $0,6^{\circ}\text{C}$
- C. Không quá $0,5^{\circ}\text{C}$
- D. Từ $0 - 0,6^{\circ}\text{C}$.

b/ Cửa ba thở:

- A. Lớn hơn 0°C và không quá $1,6^{\circ}\text{C}$
- B. Không quá $1,5^{\circ}\text{C}$
- C. Không quá $1,4^{\circ}\text{C}$
- B. Không quá $1,6^{\circ}\text{C}$

Chương 6

KIỂM NGHIỆM CÁC DẠNG BÀO CHẾ

MỤC TIÊU

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 phần cụ thể của các dạng bào chế trên.

NỘI DUNG

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 dụng cụ 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 tài liệu kiểm nghiệm các dạng bào chế khác.

1. Kiểm nghiệm thuốc bột

1.1. Yêu cầu kỹ thuật và phương pháp thử

1.1.1. Tính chất

Bột phải khô toi, 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.

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 - ĐVN III.

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 kén, các thuốc bột dùng để đắp, thuốc bột dùng để pha các 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 buộc 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 quy định của tiêu chuẩn. Cân một lượng thuốc bột, đem rây có cỡ quy định.

Đối với bột thô hoặc nửa thô: lấy 25 - 100g bột. Cho vào rây thích hợp, lắc rây theo chiều ngang quay tròn ít nhất 20 phút rây tới khi xong. Cân chính xác số lượng còn lại ở trên rây và thu được trong hộp hứng.

Đối với bột nửa mịn, mịn hay rất mịn: lấy không quá 25g 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 6.1. Quy định số rây

Số rây (μm)	Cỡ cắt dây (mm)	Đường kính sợi dây (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)

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 nằm trong giới hạn cho phép theo bảng 6.2.

Bảng 6.2

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 quy trình 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 tỷ lệ phần trăm so với khối lượng trung bình bột thuốc trong một đơn vị đóng gói.

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 2mg 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 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.

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.

1.1.6. Định tính

Tiến hành định tính theo các phương pháp được quy định trong tiêu chuẩn, thuốc bột phải cho các phản ứng của các hoạt chất có trong chế phẩm.

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 quy định trong tiêu chuẩn, hàm lượng của từng hoạt chất trong chế phẩm phải nằm trong giới hạn cho phép theo bảng 3.

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 quy định riêng thì tiến hành thử và đánh giá theo "Thử giới hạn vi sinh vật" .

Bảng 6. 3. Giới hạn cho phép về hàm lượng hoạt chất đối với thuốc bột

Lượng ghi trên nhãn	Phần trăm chênh lệch
Tới 100mg	± 15
Trên 100mg tới 1g	± 10
Trên 1g đến 5g	± 5
Trên 5g	± 1

1.2. Các loại thuốc bột

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 200ml 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.

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 quy định riêng thì tiến hành thử và đánh giá theo "Thử vô trùng"

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 - ĐĐVN III trang 32 - 33.

2. Kiểm nghiệm thuốc viên nang

2.1. Yêu cầu kỹ thuật và phương pháp thử

2.1.1. Tính chất

Nang cứng hoặc nang mềm chứa bột hoặc cốm hoặc chất lỏng.

Cách thử: Thử bằng cảm quan

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 4.

Nếu có yêu cầu thử độ đồng đều hàm lượng thì không phải thử độ đồng đều khối lượng.

Bảng 6.4. Giới hạn cho phép chênh lệch khối lượng đối với viên nang

Khối lượng trung bình nang	Phần trăm chênh lệch
Nhỏ hơn 300mg	±10
Lớn hơn hoặc bằng 300mg	±7,5

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.

2.1.4. Độ rã

Nếu không có quy định riêng thì tiến hành thử và đánh giá theo phương pháp "Thử độ rã viên nén và viên nang" - phần 5.10, trang 166 - 168.

Viên không cần thử độ rã khi phép thử độ hòa tan được thực hiện.

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 hoà tan của viên nén và viên nang - phần 5.9 trang 160-165

2.1.6. Định tính

Tiến hành định tính theo các phương pháp được quy định trong tiêu chuẩn. viên nang phải cho các phản ứng của các hoạt chất có trong chế phẩm

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 chứa cốm) hoặc trộn đều (đối với nang chứa chất lỏng). 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 theo bảng 6.5

Bảng 6.5 Giới hạn cho phép về hàm lượng đối với thuốc viên nang, viên nén

Lượng ghi trên nhãn	Phần trăm chênh lệch
Trên 50mg	± 10
Trên 50mg tới 100mg	$\pm 7,5$
Trên 100mg	± 5

2.1.8. Tạp chất (nếu có)

Khi có yêu cầu sẽ chỉ dẫn trong chuyên luận riêng.

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.

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 Cephalêin-DĐVN III Trang 53-54.

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 dung dịch, hỗn dịch hoặc nhũ tương.

Ví dụ: Viên nang mềm vitamin A-DĐVN III. Trang 291-292.

2.2.3 Thuốc nang tan trong ruột

Thuốc nang tan trong ruột là các 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.

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 hoà tan" theo yêu cầu riêng của từng chuyên luận.

3. Kiểm nghiệm thuốc viên nén

3.1 Yêu cầu kỹ thuật và phương pháp thử

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

3.1.2. Độ rã

Nếu không rõ quy định riêng thì tiến hành thử và đánh giá theo phương pháp "Thử độ rã viên nén và viên nang" - phần 5.10, trang 166 - 168.

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 6.6.

Bảng 6.6. Giới hạn cho phép chênh lệch khối lượng đối với viên nén

Khối lượng trung bình viên	Phần trăm chênh lệch
Tới 80mg	±10
Trên 80mg đến 250mg	±7,5
Trên 250mg	±5

Nếu có yêu cầu thử độ đồng đều hàm lượng thì không phải thử độ đồng đều khối lượng.

3.1.4. Độ đồng đều hàm lượng

Nghiền mịn riêng từng viên và tiến hành thử và đánh giá như đối với thuốc bột.

3.1.5. Độ hòa tan

Chỉ thực hiện khi có yêu cầu được chỉ dẫn trong chuyên luận riêng:

Nếu không có quy 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 160 - 165.

3.1.6. Định tính

Tiến hành định tính theo các phương pháp được quy định trong tiêu chuẩn, viên nén phải cho các phản ứng của các hoạt chất có trong chế phẩm.

3.1.7. Định lượng

Cân 20 viên, xác định khối lượng trung bình viên. Nghiền mịn. 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 theo bảng 5.5.

3.1.8. Tạp chất (nếu có)

Khi có yêu cầu sẽ chỉ dẫn trong chuyên luận riêng.

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.

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.

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.

3.2.3. Viên bao bền với dịch vị dạ dày (Gastro - resistans tablets)

Viên được bao bằng lớp bao bền 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.

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 hòa tan hay phân tán hoạt chất trong nước trước khi dùng.

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.

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.

3.2.7. 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.

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

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.

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

4.2. Độ trong

Dung dịch để tiêm khi kiểm tra bằng mắt thường ở điều kiện quy 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 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 hợp

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.

4.3. Màu sắc

Không màu hoặc có màu do hoạt chất tùy theo từng chuyên luận. Tiến hành so sánh với màu mẫu - Phụ lục 5.17 - ĐĐVN III.

4.4. pH

pH phải nằm trong giới hạn quy định

Tiến hành đo pH bằng máy đo pH - Phụ lục 5.9 - DĐVN III.

4.5. Độ vô khuẩn

Thuốc tiêm phải vô khuẩn

Cách thử: Nếu không có quy định riêng thì tiến hành thử và đánh giá theo "Thử vô trùng" - phần 4.3.3, trang 124 - 127.

4.6. Nội độc tố vi khuẩn

Phép thử nội độc tố vi khuẩn thực hiện khi có yêu cầu được quy định trong chuyên luận riêng. Thử theo Phụ lục 10.3 - DĐVN III.

Khi đã thử nội độc tố vi khuẩn thì không phải thử chất gây sốt, trừ khi có quy định khác.

4.7. Chất gây sốt

Thuốc tiêm phải không có chất gây sốt. Thử theo Phụ lục 10.5 - DĐVN III. Phép thử này được tiến hành đối với:

- Thuốc tiêm đóng liều đơn lẻ có thể tích từ 15ml trở lên và không có quy định phép thử nội độc tố.

- Thuốc tiêm đóng liều đơn lẻ có thể tích nhỏ hơn 15ml nhưng trên nhãn có ghi "không có chất gây sốt" và không có quy định phép thử nội độc tố.

4.8. Thử 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 5ml:

- + 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 5ml, 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 5ml.

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 quy định được lấy ra.

Thể tích của chế phẩm phải nằm trong giới hạn cho phép theo bảng 6.7.

Bảng 6.7. Giới hạn cho phép về thể tích của thuốc tiêm, thuốc tiêm truyền.

Thể tích ghi trên nhãn (ml)	Phần trăm chênh lệch
Tới 5ml	+ 15
Từ 5ml tới 50ml	+ 10
Trên 50ml	+ 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

ngay 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.

4.10. Độ đồng đều hàm lượng

Trừ khi có chỉ dẫn khác, chế phẩm có hàm lượng hoạt chất dưới 2mg hoặc dưới 2% (kl/kl) so với khối lượng thuốc của toàn bộ. Thuốc tiêm, thuốc tiêm truyền dạng bột đóng gói khi có khối lượng nhỏ hơn hoặc bằng 40mg.

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 từ 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.

4.11. Định tính

Tiến hành định tính theo các phương pháp được quy 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.

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 quy định trong tiêu chuẩn, hàm lượng của từng hoạt chất trong chế phẩm phải nằm trong giới hạn cho phép theo bảng 6.8.

Bảng 6. 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. Kiểm nghiệm thuốc nhỏ mắt

5.1. Tính chất

Thế chất, màu sắc tùy theo từng chuyên luận

Cách thử: Bằng cảm quan

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.

5.3. 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.

5.4. pH

pH phải nằm trong giới hạn quy định

Đo bằng máy đo pH - Phụ lục 5.9 - ĐĐVN III.

5.5. Độ vô khuẩn

Thuốc nhỏ mắt phải vô khuẩn

Cách thử: Nếu không có quy định riêng thì tiến hành thử và đánh giá theo "Thử vô trùng" - phần 4.3.3, trang 124 - 127.

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 μ g pha rắn.

Kết quả:

- Không được có quá 20 tiểu phân có kích thước lớn hơn 25 μ m.
- Không được có quá 2 tiểu phân có kích thước lớn hơn 50 μ m.
- Không được có tiểu phân nào có kích thước lớn hơn 90 μ m.

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.

5.8. 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.

6. Kiểm nghiệm thuốc uống dạng lỏng

6.1. Yêu cầu kỹ thuật và phương pháp thử

6.1.1. Tính chất

Thể chất, màu sắc, mùi vị tùy theo từng chuyên luận

Cách thử: Bằng cảm quan

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. Thể tích thuốc phải nằm trong giới hạn cho phép theo bảng 5.9.

6.1.3. Thể tích

Cách xác định: Giống như đối với thuốc nhỏ mắt

Thể tích thuốc phải nằm trong giới hạn cho phép theo bảng 5.9.

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 6.9-DĐVN III.

Bảng 6. 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

6.1.5. Độ nhiễm khuẩn

Độ nhiễm khuẩn phải đạt giới hạn quy định cho chế phẩm theo từng chuyên luận.

Cách thử: Nếu không có quy định riêng thì tiến hành thử và đánh giá theo "Thử giới hạn vi sinh vật"

6.1.6. Tỷ trọng

Tỷ trọng của chế phẩm phải nằm trong giới hạn quy định định theo từng chuyên luận .

Cách thử ; Theo "Xác định tỷ trọng chất lỏng" - phụ lục 5.15 - DĐVN III.

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

6.1.8. Định tính

Tiến hành định tính theo các phương pháp được quy định trong tiêu chuẩn, chế phẩm thuốc phải cho các phản ứng của các hoạt chất có trong chế phẩm.

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 quy định trong tiêu chuẩn, hàm lượng của từng hoạt chất trong chế phẩm phải nằm trong giới hạn cho phép theo bảng 5.10.

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 6.10. Giới hạn cho phép về hàm lượng đối với thuốc uống dạng lỏng

Dạng thuốc	Phần trăm chênh lệch
Thuốc độc A, B	± 5
Thuốc thường	± 10

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 quy định trong ethanol ở các nồng độ khác nhau.

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.

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.

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...

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.

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 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.

7. Kiểm nghiệm thuốc mỡ

7.1. Yêu cầu kỹ thuật và phương pháp thử

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

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 6.11.

Bảng 6.11. 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

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 - 0,03g, trải chế phẩm lên 4 tiêu bản, bên trên đặt một phiến kín. Đậy mỗi phiến kín bằng một phiến kín

khắc và ép mạnh cho đến khi tạo thành một vết có đường kính khoảng 2cm. 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.

7.1.4. Định tính

Tiến hành định tính theo các phương pháp được quy định trong tiêu chuẩn, thuốc mỡ phải cho các phản ứng của các hoạt chất có trong chế phẩm.

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 quy định theo bảng 6.12.

Bảng 6.12. Giới hạn cho phép về hàm lượng đối với thuốc mỡ

Nồng độ hàm lượng ghi trên nhãn	Phần trăm chênh lệch
Tối 200mg	±15
Trên 200mg - 1g	±10
Trên 1 - 5g	±7,5
Trên 5g	±3

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:

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 quy định riêng thì tiến hành thử và đánh giá theo "Thử vô trùng" - phần 4.3.3.3, trang 124 - 127.

7.2.2. Các phần tử kim loại

Số lượng các phần tử kim loại nằm trong giới hạn cho phép

Cách thử: Lấy 10g ống thuốc, bóp hết thuốc chứa bên trong vào từng đĩa petri riêng có đường kính 6cm, 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 50µm 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 phần tử thử 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.

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 kín lên trên và soi.

8. Kiểm nghiệm thuốc đạn, thuốc trứng

8.1. Tính chất

Thuốc đạn có hình nón hoặc hình con suốt, khối lượng 1 - 3g, dài 3 - 4cm. Thuốc trứng có hình cầu hoặc hình trái xoan, khối lượng 2 - 4g.

Thể chất, màu sắc, mùi đạt theo chuyên luận riêng.

Cách thử: Bằng cảm quan

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.

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 quy định trong thời gian nhất định đã được quy định ở từng chuyên luận.

Cách tiến hành: Thử trên 3 viên, theo phụ lục 8.5 - ĐĐVN 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 đĩa thủy tinh chọc vào thì phải không được có nhân rắn.

Thời gian rã phải trong vòng 30 phút.

8.4. Định tính

Tiến hành định tính theo các phương pháp được quy định trong tiêu chuẩn, thuốc đạn và thuốc trứng phải cho các phản ứng của hoạt chất có trong chế phẩm.

8.5. Định lượng

Cân thuốc trong 20 viên, tính khối lượng trung bình viên, làm đồng nhất. Tiến hành theo phương pháp quy 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.

9. Phép thử độ hòa tan của viên nén và viên nang

(Dissolution test for tablets and capsules)

9.1. Khái niệm

Độ hòa tan của một chế phẩm là tỷ lệ hoạt chất được giải phóng ra khỏi dạng thuốc theo thời gian với các điều kiện quy định trong từng chuyên luận.

Với mỗi chế phẩm có các quy 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).

9.2. Thiết bị

Tuỳ thiết bị có thể có một bình hoặc 6 - 8 bình thử.

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 có gắn với một bộ phận khuấy bao gồm trục quay A và giỏ hình trụ ống B. Trục kim loại phải quay được một cách nhẹ nhàng, không bị tắc nghẽn 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 0,254mm, có cạnh hình vuông của lỗ rây là 0,381mm; 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 μ m 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 - 27mm trong quá trình thử.

3. Một chậu cách thủy để duy trì môi trường hòa tan ở nhiệt độ $37^{\circ}\text{C} \pm 0,5$



Hình 6.1. Thiết bị thử độ hòa tan của viên nén, viên nang của Pharma TEST

9.2.2. Thiết bị kiểu cách khuấy (Paddle apparatus)

Thiết bị này giống như thiết bị giỏ quay mô tả ở trên, chỉ khác là giỏ được thay bằng cách khuấy. Cách khuấy được lắp đặt sao cho cđi 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 2mm so với trục của bình và cạnh đáy của cánh khuấy cách mặt đáy trong của bình từ 23 - 27mm. Thiết bị được vận hành sao cho cánh khuấy quay tròn một cách nhẹ nhàng và không có rung động rõ rệt.

9.3. Cách thử

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 đệm 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 quy định $\pm 1\%$). Làm ấm môi trường hòa tan đến nhiệt độ $37 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$.

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 cách quấy:* 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.

9.3.3. Vận hành thiết bị

Vận hành thiết bị ngay ở tốc độ quay được chỉ dẫn trong chuyên luận riêng.

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 quy định là $\pm 2\%$. Vị trí hút mẫu ở khoảng giữa bề mặt môi trường hòa tan và mặt trên của giỏ quay hay cạnh trên của cánh khuấy; điểm này phải cách thành bình ít nhất 10mm. Trừ trường hợp phân tích mẫu liên tục, đo mẫu tự động khi đó mẫu lấy đầu 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 hòa 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.

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.

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 quy 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 được chất giải phóng so với hàm lượng ghi trên nhãn được đánh giá theo bảng 6.13 và bảng 6.14 (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, hòa tan vỏ nang rỗng trong một thể tích môi trường hòa 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 6.13. 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 6.14. 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.

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 1000ml dung dịch acid hydrocloric 0,1M 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 quy 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 ĐDVN III).

Hoặc:

Trong môi trường acid hydrocloric 0,1M: theo bảng 6.15

Trong môi trường đệm pH 6,8: Đánh giá như ở bảng 6.13 và 6.14

Bảng 6.15. Giới hạn về phần trăm dược chất giải phóng đối với viên bao, viên nang tan trong ruột (môi trường thử là HCl 0,1M) - Theo USP 24 - trang 1947

Lần	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 về độ hòa tan. 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 về độ hòa tan. 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 về độ hòa tan. - Không đạt: Mẫu thử không đạt yêu cầu về độ hòa tan.

Ví dụ:

. Viên nang cephalexin (ĐĐVN III, trang 53 - 54)

Thiết bị: Giỏ quay

Môi trường hòa tan: 1000ml 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 262nm với mẫu nước 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: 900ml dung dịch đệm phosphat pH 7,2 (phối hợp 250ml dung dịch KH_2PO_4 0,2M với 175ml dung dịch NaOH 0,2M, thêm nước vừa đủ 1000ml).

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 1cm với mẫu trắng là dung dịch đệm phosphat pH 7,2.

Tính hàm lượng ibuprofen theo A (1%, 1cm) là 449 ở bước sóng 221nm.

Yêu cầu: không được ít hơn 85% lượng ibuprofen ($C_{13}H_{18}O_2$) ghi trên nhãn được hòa tan trong 60 phút.

10. Thử độ rã của viên nén và viên nang

(Disintegration test for tablets and capsules)

10.1. Khái niệm

Độ rã của viên nén, viên nang là khả năng tan rã của chúng trong môi trường thử theo quy định định (thường là nước), bằng thiết bị thử độ rã đã được quy định định (Máy thử độ sã Erureka hay một thiết bị tương đương) trong thời gian nhất định đã được quy định định ở từng chuyên luận.

10.2. Thiết bị



Thiết bị bao gồm:

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 dài thành ống khoảng 2 mm
2. Một đĩa hình trụ đặt trên mỗi ống, có đường kính 20,55 - 20,85 mm và chiều dài 9,35 - 9,65 mm, được làm bằng chất dẻo trong suốt có tỷ trọng 1,18 - 1,20. Đĩa có 5 lỗ hổng, đường kính mỗi lỗ là 2mm, 1 lỗ ở giữa còn 4 lỗ còn lại đặt cách đều nhau được 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 vị trí thẳng đứng trong 6 lỗ trống của 2 tấm nhựa cứng trong suốt có đường kính 90 mm và chiều dài 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 0,635mm và kích thước mắt lỗ là 2mm.
4. Hai tấm nhựa được cố định và cách đều nhau 77,5mm 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 thể vận hành thiết bị chuyển động lên xuống một khoảng từ 50 - 60mm 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 100ml chứa chất lỏng đã được quy 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 15mm và khi giá ống thử ở vị trí thấp nhất thì lưới kim loại cách đáy ống thủy tinh ít nhất 25mm 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 $37^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$.

10.3. Cách thử

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 đặt đĩa chất dẻo vào từng ống.

10.3.2. Vận hành thiết bị

Nhúng giá đỡ vào trong cốc đựng chất lỏng và vận hành thiết bị theo thời gian quy định.

10.3.3. Đánh giá kết quả

- Sau thời gian quy định hoặc khi thấy các viên đã 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 đặt. 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 quy định.

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 2N.

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.

LƯỢNG GIÁ

1. Trình bày tiêu chuẩn và kỹ thuật kiểm nghiệm chung của thuốc bột?
2. Trình bày tiêu chuẩn và kỹ thuật kiểm nghiệm chung của viên nang?
3. Phân loại các viên nang? Cho biết những yêu cầu riêng cho từng loại nếu có?
4. Trình bày tiêu chuẩn và kỹ thuật kiểm nghiệm chung của thuốc viên nén?
5. Phân loại các loại viên nén? Cho biết cách thử độ rã đối với từng loại?
6. Trình bày tiêu chuẩn và kỹ thuật kiểm nghiệm chung của thuốc tiêm và thuốc tiêm truyền?

7. Trình bày tiêu chuẩn và kỹ thuật kiểm nghiệm chung của thuốc nhỏ mắt?
8. Trình bày tiêu chuẩn và kỹ thuật kiểm nghiệm chung của thuốc mỡ và thuốc mỡ tra mắt?
9. Trình bày cách thử tốc độ hòa tan và đánh giá kết quả của viên nén paracetamol 500mg; viên nang cephalixin 500mg và viên bao diclofenac 50mg?
10. Anh (chị) hãy cho biết cách thử độ rã và đánh giá kết quả của viên nén acid ascorbic 100mg; viên nang cloxacilin 250mg và viên bao cimetidin 400mg?
11. Anh (chị) hãy đề xuất tiêu chuẩn và quy trình kiểm nghiệm cho viên nén A có hàm lượng hoạt chất là 1,5mg/viên.
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.
13. Người ta tiến hành định lượng paracetamol trong viên nén paracetamol 500mg như sau: Cân 20 viên được khối lượng 14,6853g. Nghiền mịn. Cân 0,2205g bột viên, hòa tan trong vừa đủ 200ml dung môi. Lắc đều, lọc. Pha loãng 1,00ml dịch lọc thành 100,0ml trong bình định mức bằng dung môi. Mật độ quang của dung dịch này ở 257nm là 0,501.
Hỏi chế phẩm có đạt yêu cầu về hàm lượng không? Biết paracetamol có A (1%, 1cm) ở bước sóng 257nm là 715.
14. Thử độ hòa tan của viên nén ciprofloxacin 250mg theo ĐĐVN III, sau khi dùng 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 $\mu\text{g/ml}$ có độ hấp thụ là 0,505 đo trong cùng điều kiện.

PHẦN THỰC HÀNH

Bài 1

KIỂM NGHIỆM BỘT NaHCO_3

MỤC TIÊU

1. Chuẩn bị được hóa chất dụng cụ để kiểm nghiệm được thuốc bột trên đúng qui trình kỹ thuật..
2. Kiểm tra được một số yêu cầu kiểm nghiệm của thuốc bột trên.

NỘI DUNG

1. Thuốc bột NaHCO_3 .



NaHCO_3

P.t.l: 84,0

Natri hydrocarbonat phải chứa từ 99,0 đến 101,0% NaHCO_3

2. Bảng các hóa chất cần chuẩn bị.

STT	TÊN HÓA CHẤT	NỒNG ĐỘ	CÁCH PHA	KẾT QUẢ	
				Có	Không
1					
2					
3					
4					
5					
6					
7					
8					
9					
10					
11					

1. Nội dung kiểm nghiệm

Tính chất

Bột kết tinh trắng. Tan trong nước, thực tế không tan trong ethanol 96%. Khi đun nóng ở trạng thái khô hoặc ở trong dung dịch, nó chuyển dần thành natri carbonat.

Định tính

A. Thêm vào 5ml dung dịch S 0,1 ml dung dịch phenolphthalein (CT), màu hồng nhạt xuất hiện. Đun nóng, khí bay lên và dung dịch có màu đỏ.

B. Phải cho phản ứng của carbonat và bicarbonat (Phụ lục 7.1)

C. Dung dịch S cho phản ứng của natri (Phụ lục 7.1)

Độ trong và màu sắc của dung dịch

Dung dịch S: Hòa tan 5,0g chế phẩm trong 90ml nước không có carbon dioxyd (TT) và pha loãng thành 100ml bằng cùng dung môi.

Dung dịch S phải trong (Phụ lục 5.12) và không màu (Phụ lục 5.17, phương pháp 2).

Carbonat

pH của dung dịch S vừa mới pha phải không được lớn hơn 8,6 (Phụ lục 5.9)

Clorid

Không được quá 0,015% (Phụ lục 7.4.5)

Thêm vào 7ml dung dịch S, 2ml acid nitric (TT), pha loãng thành 15ml bằng nước và tiến hành thử.

Sulfat

Không được quá 0,015% (Phụ lục 7.4.12)

Thêm acid hydrocloric (TT) vào hỗn dịch chứa 1,0g chế phẩm trong 10ml nước đến khi trung tính và thừa khoảng 1ml rồi pha loãng thành 15ml bằng nước và tiến hành thử.

Amoni

Không được quá 20 phần triệu (Phụ lục 7.4.1)

Lấy 10ml dung dịch S pha loãng thành 15ml bằng nước và tiến hành thử theo phương pháp A. Dùng hỗn hợp gồm 5ml nước và 10ml dung dịch amoni mẫu 1 phần triệu để chuẩn bị mẫu đối chiếu.

Arsen

Không được quá 2 phần triệu (Phụ lục 7.4.2)

Lấy 0,5g chế phẩm tiến hành thử theo phương pháp A

Calci

Không được quá 0,01% (Phụ lục 7.4.3)

Thêm acid hydrocloric (TT) vào hỗn dịch chứa 1,0g chế phẩm trong 10ml nước cho đến khi trung tính, pha loãng thành 15ml bằng nước và tiến hành thử.

Kim loại nặng

Không được quá 10 phần triệu (Phụ lục 7.4.7)

Hòa tan 2,0g chế phẩm trong hỗn hợp gồm 2ml acid hydrocloric (TT) và 18ml nước. Lấy 12ml dung dịch này tiến hành thử theo phương pháp 1. Dùng dung dịch chì mẫu 1 phần triệu làm mẫu đối chiếu.

Sắt

Không được quá 20 phần triệu (Phụ lục 7.4.11)

Hòa tan 0,5g chế phẩm trong 5ml dung dịch acid hydrocloric loãng (TT), pha loãng thành 10ml bằng nước và tiến hành thử.

Định lượng

Hòa tan 1,500g chế phẩm trong 50ml nước không có carbon dioxyd (TT). Chuẩn độ bằng dung dịch acid hydrocloric 1M, dùng 0,2ml dung dịch da cam methyl (CT) làm chỉ thị.

1ml dung dịch acid hydrocloric 1M tương đương với 84,0mg NaHCO_3 .

2. Mẫu phiếu kiểm nghiệm.

Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam
Độc lập - Tự do - Hạnh phúc

Phiếu kiểm nghiệm

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

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

Thủ trưởng cơ quan
(Ký và đóng dấu)

Bài 2

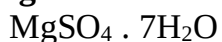
KIỂM NGHIỆM $MgSO_4$

MỤC TIÊU

1. Chuẩn bị được hóa chất, dụng cụ để kiểm nghiệm $MgSO_4$ đúng qui trình kỹ thuật.
2. Kiểm tra được một số yêu cầu kiểm nghiệm của $MgSO_4$

NỘI DUNG

1. Magie sulfat



P.t.l: 246,5

Magnesi sulfat phải chứa từ 99,0 đến 100,5% $MgSO_4$, tính theo chế phẩm đã làm khô.

2. Bảng các hóa chất cần chuẩn bị.

STT	TÊN HÓA CHẤT	NỒNG ĐỘ	CÁCH PHA	KẾT QUẢ	
				Có	Không
1					
2					
3					
4					
5					
6					
7					
8					
9					
10					
11					

3. Nội dung kiểm nghiệm

Tính chất

Bột kết tinh trắng hay tinh thể không màu, bóng. Dễ tan trong nước, rất dễ tan trong nước sôi, thực tế không tan trong ethanol 96%

Định tính

Hòa tan 0,50g chế phẩm trong 10ml nước. Dung dịch phải cho phản ứng định tính của magnezi và sulfat (Phụ lục 7.1)

Độ trong và màu sắc của dung dịch

Dung dịch S: Hòa tan 5,0g chế phẩm trong nước vừa đủ 50ml

Dung dịch S phải trong (Phụ lục 5.12) và không màu (Phụ lục 5.17. Phương pháp 2).

Giới hạn acid - kiềm

Thêm 0,05ml dung dịch đỏ phenol (CT) vào 10ml dung dịch S. Dung dịch phải chuyển màu khi thêm không được quá 0,2ml dung dịch acid hydrocloric 0,01M hoặc dung dịch natri hydroxyd 0,01M.

Clorid

Không được quá 0,03% (Phụ lục 7.4.5)

Lấy 1,7ml dung dịch S pha loãng thành 15ml và tiến hành thử

Kim loại nặng

Không được quá 10 phần triệu (Phụ lục 7.4.7)

Lấy 12ml dung dịch S và tiến hành thử theo phương pháp 1. Dùng dung dịch chì mẫu 1 phần triệu để chuẩn bị mẫu đối chiếu.

Sắt

Không được quá 20 phần triệu (Phụ lục 7.4.11)

Lấy 5ml dung dịch S pha loãng thành 10ml bằng nước và tiến hành thử

Arsen

Không được quá 20 phần triệu (Phụ lục 7.4.2)

Lấy 0,5g chế phẩm tiến hành thử theo phương pháp A

Mất khối lượng do làm khô

Từ 48,0 đến 52,0% (Phụ lục 5.16)

(0,500g; 110 - 120°C, 1 giờ; sau đó 400°C)

Định lượng

Hòa tan 0,450g chế phẩm trong 100ml nước và tiến hành chuẩn độ theo phương pháp định lượng magnesi bằng chuẩn độ complexon (Phụ lục 6.11).

1ml dung dịch natri edetat 0,1M tương đương với 12,04mg MgSO₄

4. Mẫu phiếu kiểm nghiệm

Bộ y tế
Tên cơ quan
kiểm nghiệm thuốc

Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam
Độc lập - Tự do - Hạnh phúc

Địa chỉ cơ quan

Phiếu kiểm nghiệm

Mẫu kiểm nghiệm:

Nơi sản xuất:

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:.....

Thử theo: Dược điển Việt Nam III

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

Yêu cầu	Kết quả

Kết luận: Mẫu thử này đạt/không 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)

Bài 3

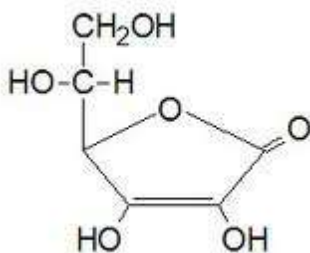
KIỂM NGHIỆM VIÊN NÉN VITAMIN C

MỤC TIÊU

1. Chuẩn bị được hóa chất, dụng cụ để kiểm nghiệm viên nén Vitamin C đúng qui trình kỹ thuật.
2. Kiểm tra được một số yêu cầu trong kiểm nghiệm thuốc viên nén Vitamin C.

NỘI DUNG

1. Viên nén Vitamin C



Là viên nén chứa acid ascorbic

Chế phẩm phải đáp ứng các yêu cầu trong chuyên luận "Thuốc viên nén" (Phụ lục 1.15) và các yêu cầu sau đây:

Hàm lượng acid ascorbic ($C_6H_8O_6$) từ 95,0 đến 110,0% so với lượng ghi trên nhãn.

2. Bảng các hóa chất cần chuẩn bị.

STT	TÊN HÓA CHẤT	NỒNG ĐỘ	CÁCH PHA	KẾT QUẢ	
				Có	Không
1					
2					
3					
4					
5					
6					
7					
8					
9					
10					
11					

3. Nội dung kiểm nghiệm

Tính chất

Viên màu trắng hay trắng ngà, gần như không mùi

Định tính

Lấy một lượng chế phẩm đã được nghiền thành bột mịn tương ứng với khoảng 0,10g acid ascorbic, lắc với 10ml nước. Lọc. Dịch lọc có phản ứng acid với giấy quỳ (CT), làm mất màu xanh của dung dịch 2,6 diclorophenol idophenol (CT), khử dung dịch bạc nitrat 5% (TT) và cho một tua đen.

Lấy 5ml dịch lọc, thêm 0,05ml dung dịch mới pha natri nitroprusiat 1% (TT), 2ml dung dịch natri hydroxyd 2M và cuối cùng nhỏ từng giọt dung dịch acid hydrocloric 25% (TT): màu vàng sẽ chuyển thành màu lam.

Định lượng

Cân chính xác 20 viên, tính khối lượng trung bình và nghiền thành bột mịn. Cân chính xác một lượng bột viên tương ứng khoảng 0,200g acid ascorbic cho vào bình định mức 100ml, thêm hỗn hợp (bao gồm 100ml nước mới đun sôi để nguội và 10ml dung dịch acid acetic 1M) vừa đủ tới vạch. Lắc kỹ và lọc nhanh, dùng giấy lọc khô. Loại bỏ 20ml dịch lọc đầu. Hút chính xác 50ml dịch lọc, thêm 1ml dung dịch hồ tinh bột và định lượng bằng dung dịch iod 0,1N cho đến khi xuất hiện màu xanh lam bền vững ít nhất trong 30 giây.

1ml dung dịch iod 0,1N tương đương với 8,806mg $C_6H_8O_6$.

4. Mẫu phiếu kiểm nghiệm

Bộ y tế
Tên cơ quan
kiểm nghiệm thuốc

Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam
Độc lập - Tự do - Hạnh phúc

Địa chỉ cơ quan

Phiếu kiểm nghiệm

Mẫu kiểm nghiệm:

Nơi sản xuất:

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:

Thử theo: Dược điển Việt Nam III

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

Yêu cầu	Kết quả

Kết luận: Mẫu thử này đạt/không 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)

Bài 4

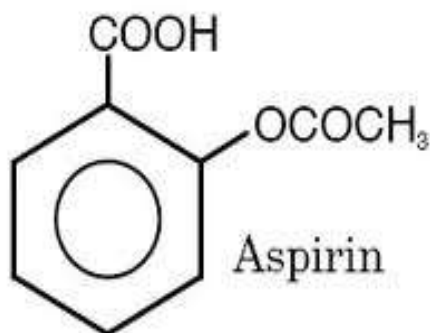
KIỂM NGHIỆM VIÊN NÉN ASPIRIN

MỤC TIÊU

1. Chuẩn bị được hóa chất, dụng cụ để kiểm nghiệm viên nén Aspirin đúng qui trình kỹ thuật.
2. Kiểm tra được một số yêu cầu trong kiểm nghiệm thuốc viên nén Aspirin

NỘI DUNG

1. Viên nén Aspirin



Là viên nén chứa acid acetylsalicylic

Chế phẩm phải đáp ứng các yêu cầu trong chuyên luận "Thuốc viên nén" (Phụ lục 1.15) và các yêu cầu sau:

Hàm lượng của acid acetylsalicylic ($C_9H_8O_4$) từ 95,0 - 105,0% so với lượng ghi trên nhãn.

2. Bảng các hóa chất cần chuẩn bị.

STT	TÊN HÓA CHẤT	NỒNG ĐỘ	CÁCH PHA	KẾT QUẢ	
				Có	Không
1					
2					
3					
4					
5					
6					
7					
8					
9					
10					
11					

3. Nội dung kiểm nghiệm

Tính chất

Viên màu trắng

Định tính

Đun sôi 0,3g bột viên trong 2 đến 3 phút với 10ml dung dịch natri hydroxyd 10% (TT). Để nguội, thêm dung dịch acid sulfuric 10% (TT) cho đến khi thừa acid, sẽ có tủa kết tinh và có mùi acid acetic. Thêm 1 ml dung dịch sắt (III) clorid 0,5% (TT) sẽ có màu tím.

Độ hòa tan (Phụ lục 8.4)

Thiết bị kiểu cách khuấy

Môi trường hòa tan: 500ml dung dịch thêm pH 4,5 được pha bằng cách hòa tan 29,9g natri acetat trong nước, thêm 16,6 ml acid acetic băng và thêm nước vừa đủ 10.000ml.

Tốc độ quay: 50 vòng/phút

Thời gian: 45 phút

Cách tiến hành: Hút 20ml dung dịch màu thử, lọc. Đo ngay lập tức độ hấp thụ ánh sáng của dịch lọc (nếu cần pha loãng với môi trường hòa tan) ở bước sóng 265nm (Phụ lục 3.1), trong cốc đo dày 1cm, so với màu trắng là môi trường hòa tan. Song song đo độ hấp thụ ánh sáng của dung dịch acid acetylsalicylic chuẩn có nồng độ tương đương được pha trong môi trường hòa tan.

Từ hàm lượng $C_9H_8O_4$ trong acid acetylsalicylic chuẩn tính hàm lượng $C_9H_8O_4$ có trong dung dịch mẫu thử.

Yêu cầu: Không được ít hơn 70% lượng acid acetylsalicylic $C_9H_8O_4$ so với lượng ghi trên nhãn được hòa tan trong 45 phút.

Giới hạn acid salicylic tự do

Không được quá 0,3%

Cần một lượng bột viên tương ứng với 0,2g acid acetylsalicylic, lắc với 4ml ethanol 96% (TT) và pha loãng với nước đến 100ml ở nhiệt độ không quá 10°C. Lọc ngay bằng giấy lọc và lấy 50ml dịch lọc, thêm 1ml dung dịch phen sắt amoni 0,2% (TT) mới pha, trộn đều và để yên trong 1 phút. Dung dịch này không được có màu tím thâm hơn màu của dung dịch mẫu (gồm 1 ml dung dịch phen sắt amoni 0,2% mới pha vào hỗn hợp của 3ml dung dịch acid salicylic 0,010% (kl/tt) mới pha, 2ml ethanol 96% (TT) và nước vừa đủ 50ml). Tiến hành thử trong 2 ống nghiệm Nessler hoặc cho vào hai ống nghiệm giống nhau để so sánh màu của chúng.

Định lượng

Cân chính xác 20 viên, tính khối lượng trung bình và nghiền thành bột mịn. Cân chính xác một lượng bột viên tương ứng với 0,5g acid acetylsalicylic. Thêm 30 ml dung dịch natri hydroxyd 0,5N đun sôi nhẹ trong 10 phút, rồi chuẩn độ lượng natri hydroxyd 0,5N thừa bằng dung dịch acid hydrocloric 0,5N, dùng dung dịch đỏ phenol (CT) làm chỉ thị. Thử một mẫu trắng như trên nhưng không có chế phẩm. Hiệu số giữa 2 lần chuẩn độ biểu thị lượng dung dịch natri hydroxyd đã dùng để định lượng.

1ml dung dịch natri hydroxyd 0,5N tương đương với 45,04mg $C_9H_8O_4$.

4. Mẫu phiếu kiểm nghiệm

Độc lập - Tự do - Hạnh phúc

Phiếu kiểm nghiệm

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

Thủ trưởng cơ quan
(Ký và đóng dấu)

Bài 5

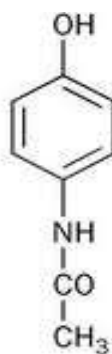
KIỂM NGHIỆM VIÊN NÉN PARACETAMOL

MỤC TIÊU

1. Chuẩn bị được hóa chất, dụng cụ để kiểm nghiệm viên nén Paracetamol đúng qui trình kỹ thuật.
2. Kiểm tra được một số yêu cầu trong kiểm nghiệm thuốc viên nén Paracetamol.

NỘI DUNG

1. Viên nén Paracetamol.



(4) N-(4-Hydroxyphenyl) ethanamide
(acetaminophen, US; paracetamol, UK)

Là viên nén chứa paracetamol

Chế phẩm phải đáp ứng các yêu cầu trong chuyên luận "Thuốc viên nén" (Phụ lục 1.15) và các yêu cầu sau đây:

Hàm lượng của paracetamol $C_8H_9NO_2$:

Đối với viên 100mg: từ 90,0 đến 110,0% so với lượng ghi trên nhãn

Đối với viên 300mg và 500mg từ 95,0 đến 105,0% so với lượng ghi trên nhãn.

2. Bảng các hóa chất cần chuẩn bị.

STT	TÊN HÓA CHẤT	NỒNG ĐỘ	CÁCH PHA	KẾT QUẢ	
				Có	Không
1					
2					
3					
4					
5					
6					
7					
8					
9					
10					
11					

3. Nội dung kiểm nghiệm

Tính chất

Viên màu trắng, không mùi

Định tính

Chế phẩm phải đáp ứng các yêu cầu định tính trong chuyên luận "nang paracetamol"

Độ hòa tan (Phụ lục 8.4)

Thử theo chuyên luận "Nang paracetamol"

Aminophenol

Thử theo chuyên luận "Nang paracetamol"

Tạp chất liên quan

Thử theo chuyên luận "Nang paracetamol"

Định lượng

Cân 20 viên, tính khối lượng trung bình viên, nghiền thành bột mịn. Cân chính xác một lượng bột viên tương ứng khoảng 0,15g paracetamol, cho vào bình định mức 200ml, thêm 50ml dung dịch natri hydroxyd 0,1N (TT), 100ml nước, lắc 15 phút, thêm nước đến vạch. Lắc đều, lọc qua giấy lọc khô, bỏ 20-30ml dịch lọc đầu.

Lấy chính xác 10ml dịch lọc cho vào bình định mức 100ml. Thêm nước vừa đủ đến vạch, lắc đều.

Lấy chính xác 10ml dung dịch trên cho vào bình định mức 100ml, thêm 10ml dung dịch natri hydroxyd 0,1N rồi thêm nước đến vạch, lắc đều. Đo độ hấp thụ của dung dịch thu được ở bước sóng 257nm (Phụ lục 3.1), dùng cốc dày 1cm. Mẫu trắng là dung dịch natri hydroxyd 0,01N. Tính hàm lượng paracetamol ($C_8H_9NO_2$) theo A (1%, 1cm); lấy 715 là giá trị A (1%, 1cm) ở bước sóng 257nm.

4. Mẫu phiếu kiểm nghiệm

Bộ y tế
Tên cơ quan
kiểm nghiệm thuốc

Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam
Độc lập - Tự do - Hạnh phúc

Địa chỉ cơ quan

Phiếu kiểm nghiệm

Mẫu kiểm nghiệm:

Nơi sản xuất:

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:

Thử theo: Dược điển Việt Nam III

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

Yêu cầu	Kết quả

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

Hà Nội, ngày tháng năm

Thủ trưởng cơ quan
(Ký và đóng dấu)

Bài 6

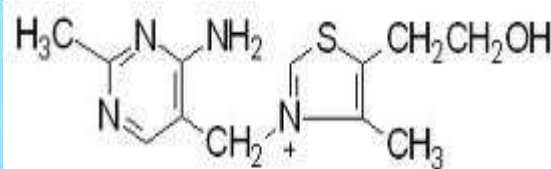
KIỂM NGHIỆM THUỐC TIÊM VITAMIN B₁

MỤC TIÊU

1. Chuẩn bị được hóa chất, dụng cụ để kiểm nghiệm thuốc tiêm Vitamin B₁ đúng qui trình kỹ thuật.
2. Kiểm tra được một số yêu cầu trong kiểm nghiệm thuốc tiêm Vitamin B₁

NỘI DUNG

1. Thuốc tiêm Vitamin B₁.



Là dung dịch vô khuẩn của thiamin hydroclorid trong nước để pha thuốc tiêm.

Chế phẩm phải đáp ứng các yêu cầu trong chuyên luận "Thuốc tiêm, thuốc tiêm truyền" (Phụ lục 1.14) và các yêu cầu sau đây:

Hàm lượng thiamin hydroclorid C₁₂H₁₇ClN₄OS. HCl từ 95,0 đến 105,0% so với lượng ghi trên nhãn.

2. Bảng các hóa chất cần chuẩn bị.

STT	TÊN HÓA CHẤT	NỒNG ĐỘ	CÁCH PHA	KẾT QUẢ	
				Có	Không
1					
2					
3					
4					
5					
6					
7					
8					
9					
10					
11					

3. Nội dung kiểm nghiệm

Tính chất

Dung dịch trong, không màu hoặc có màu hơi vàng

Định tính

A. Lấy 1- 2ml chế phẩm, thêm vài giọt dung dịch natri hydroxyd 10% (TT), vài giọt dung dịch kali fericyanid 5% (TT), vài mililit n - butanol (TT), lắc mạnh khoảng 1-2 phút. Lớp alcol có huỳnh quang màu tím xanh hiện lên rất rõ nếu dưới ánh sáng tử ngoại. Huỳnh quang biến mất khi acid hóa dung dịch và xuất hiện trở lại khi kiềm hóa dung dịch.

B. Lấy 1-2ml chế phẩm, thêm vài giọt dung dịch acid nitric loãng (TT), vài giọt dung dịch bạc nitrat 5% (TT), sẽ xuất hiện tủa trắng lớn nhỏ tan trong dung dịch amoniac (TT)

pH

2,5 đến 4,0 (Phụ lục 5.9)

Định lượng

Phương pháp 1: Lấy chính xác một lượng chế phẩm tương ứng với 0,05g thiamin hydrocloric (TT), thêm 50ml nước, 2ml dung dịch acid hydrocloric, rồi tiến hành thử như mô tả ở phương pháp 1 của mục định lượng trong chuyên luận "Viên nén Vitamin B₁" bắt đầu từ: "... đun sôi, cho thêm nhanh từng giọt 4ml dung dịch acid silicowolframic 10% (TT)...".

Chú ý: Bì trước khi cân phải được xử lý như phễu có tủa

1g tủa Thiamin silicowolframat tương đương với 192,9mg C₁₂H₁₇ClN₄OS.HCl.

Phương pháp 2: Tiến hành theo phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) (Phụ lục 4.3).

Pha động: Giống như trong chuyên luận "Viên nén Vitamin B₁"

Dung dịch chuẩn: Giống như trong chuyên luận "Viên nén Vitamin B₁"

Dung dịch thử: Pha loãng một thể tích chính xác chế phẩm với dung dịch acid hydrocloric 0,05N để được dung dịch có nồng độ chính xác khoảng 0,05 mg thiamin hydroclorid trong 1ml, lọc qua màng lọc 0,45 µm.

Điều kiện sắc ký: Giống như trong chuyên luận "Viên nén Vitamin B₁"

Tiến hành PLC với dung dịch thử và dung dịch chuẩn trong cùng điều kiện. Kết quả được tính theo công thức:

$$X(\text{mg / ml}) = \frac{S_t \times m_c \times n}{S_c \times V}$$

Trong đó:

S_c, S_r: Diện tích pic của dung dịch chuẩn và dung dịch thử

m_c: Nồng độ dung dịch chuẩn (mg/ml)

V: Thể tích thuốc tiêm đem thử (ml)

n: Độ pha loãng của mẫu thử

1mg C₁₂H₁₇ N₅O₄S tương đương với 1,030 mg C₁₂H₁₇N₄OS. HCl

4. Mẫu phiếu báo cáo

Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam
Độc lập - Tự do - Hạnh phúc

Phiếu kiểm nghiệm

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

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

Thủ trưởng cơ quan
(Ký và đóng dấu)

Bài 7

KIỂM NGHIỆM THUỐC NHỎ MẮT CLORAMPHENICOL 0.4%

MỤC TIÊU

1. Chuẩn bị được hóa chất, dụng cụ để kiểm nghiệm thuốc nhỏ mắt Cloramphenicol 0,4% đúng qui trình kỹ thuật.
2. Kiểm tra được một số yêu cầu trong kiểm nghiệm thuốc nhỏ mắt Cloramphenicol 0,4%

NỘI DUNG

1. Thuốc nhỏ mắt Cloramphenicol



Thuốc nhỏ mắt cloramphenicol 0,4% là dung dịch vô khuẩn của cloramphenicol trong nước.

Chế phẩm phải đạt các yêu cầu trong chuyên luận "Thuốc nhỏ mắt" (Phụ lục 1.12) và các yêu cầu sau đây:

Hàm lượng của cloramphenicol $C_{11}H_{12}Cl_2N_2O_5$ từ 90,0 đến 110,0% so với lượng ghi trên nhãn.

2. Bảng các hóa chất cần chuẩn bị.

STT	TÊN HÓA CHẤT	NỒNG ĐỘ	CÁCH PHA	KẾT QUẢ	
				Có	Không
1					
2					
3					
4					
5					
6					
7					
8					
9					
10					
11					

3. Nội dung kiểm nghiệm

Tính chất

Dung dịch trong suốt, không màu

Định tính

Lấy 1 thể tích dung dịch chứa 50mg cloramphenicol, thê

m 15ml nước cất. Chiết 4 lần, mỗi lần 25ml ether (TT). Gộp các dịch chiết rồi bốc hơi đến khô. Cẩn thu được thử theo phần định tính cloramphenicol trong chuyên luận "Viên nén cloramphenicol" bắt đầu từ "sắc ký lớp mỏng...".

2-amino - 1 (4 - nitrophenyl) propan - 1,3 - diol

Không được quá 8,0% của hàm lượng cloramphenicol đã quy định. Hòa loãng một thể tích chế phẩm với nước để có đồng nồng độ dịch cuối cùng là 0,1% cloramphenicol. Lấy 20ml dung dịch này, thêm 5ml dung dịch acid hydrochloric 1M và chiết 4 lần liên tiếp với 30, 10, 10, 10ml ether (TT), trước đó đã lắc với dung dịch acid hydrochloric 1M. Loại bỏ lớp ether. Pha loãng phần dung dịch nước bằng dung dịch acid hydrochloric 1M đến 100ml, rồi đo độ hấp thụ của dung dịch này ở cực đại 272nm (Phụ lục 3.1). Tính hàm lượng của 2-amino - 1 (4 - nitrophenyl) propan - 1,3 - diol, lấy 474 là giá trị A (1%, 1cm) ở cực đại hấp thụ là 272nm.

pH

Từ 7,0 đến 7,5 (Phụ lục 5.9)

Định lượng

Hòa loãng một thể tích chứa 25mg cloramphenicol với nước đến 250ml. Lấy 10ml dung dịch này cho vào bình định mức 100ml, rồi thêm nước cho đủ. Lắc kỹ. Đo độ hấp thụ của dung dịch này ở bước sóng cực đại 278nm (Phụ lục 3.1), cốc đo dày 1cm. Tính hàm lượng cloramphenicol $C_{11}H_{12}Cl_2N_2O_5$ theo A (1%, 1cm). Lấy 297 là giá trị A (1%, 1cm) ở cực đại hấp thụ 278nm.

4. Mẫu phiếu kiểm nghiệm

Bộ y tế
Tên cơ quan
kiểm nghiệm thuốc

Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam
Độc lập - Tự do - Hạnh phúc

Địa chỉ cơ quan

Phiếu kiểm nghiệm

Mẫu kiểm nghiệm:

Nơi sản xuất:

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:

Thử theo: Dược điển Việt Nam III

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

Yêu cầu	Kết quả

Kết luận: Mẫu thử này đạt/không 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)

Bài 8

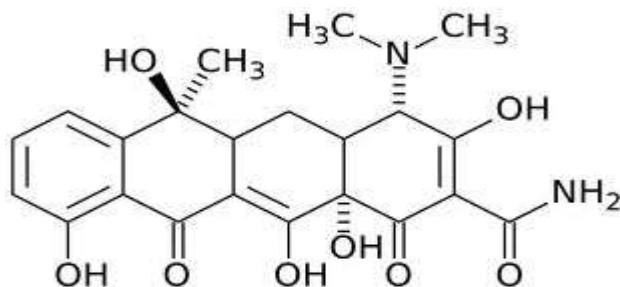
KIỂM NGHIỆM THUỐC MỠ TETRACYCLIN

MỤC TIÊU

1. Chuẩn bị được hóa chất, dụng cụ để kiểm nghiệm thuốc mỡ Tetracyclin đúng qui trình kỹ thuật.
2. Kiểm tra được một số yêu cầu trong kiểm nghiệm thuốc mỡ Tetracyclin

NỘI DUNG

1. Thuốc mỡ Tetracyclin.



Tetracyclini hydrochloridum là (4S, 4aS, 5aS, 6S, 12aS) - 4 - dimethylamino - 1, 4, 4a, 5, 5a, 6, 11, 12a - octahydro - 3, 6, 10, 12, 12a - pentahydroxy - 6 - methyl - 1, 11 - dioxonaphthacen - 2 - carboxamid hydroclorid, phải chứa từ 95,0 đến 100,5% $C_{22}H_{24}N_2O_8 \cdot HCl$, tính theo chế phẩm đã làm khô.

2. Bảng các hóa chất cần chuẩn bị.

STT	TÊN HÓA CHẤT	NỒNG ĐỘ	CÁCH PHA	KẾT QUẢ	
				Có	Không
1					
2					
3					
4					
5					
6					
7					
8					
9					
10					
11					

3. Nội dung kiểm nghiệm

(Kiểm nghiệm theo các tiêu chí trên ngoài ra còn theo yêu cầu chuyên luận thuốc mỡ tra mắt) phụ lục 1.10

Định tính

A. Phương pháp sắc ký lớp mỏng (Phụ lục 4.4). Bản mỏng: Silicagel H. Điều chỉnh pH của dung dịch natri edetat 10% đến 8,0 bằng dung dịch natri hydroxyd 40% (TT), phun đều dung dịch này lên bản mỏng (khoảng 10ml cho bản mỏng 100ml x 200mm) để khô bản mỏng trên nền phẳng ít nhất 1 giờ. Trước khi dùng sấy bản mỏng ở 100°C trong 1 giờ.

Dung môi khai triển: Nước - methanol - methylen clorid (6 : 35 : 59)

Dung dịch thử: Hòa tan 5mg chế phẩm trong methanol (TT) vừa đủ 10ml

Dung dịch đối chiếu (1): Hòa tan 5mg tetracyclin hydrochlorid trong chuẩn trong methanol (TT) vừa đủ 10ml. Dung dịch đối chiếu (2): Hòa tan 5mg tetracyclin hydrochlorid chuẩn, 5mg clortetracyclin hydrochlorid chuẩn, 5mg doxycyclin hydrochlorid chuẩn trong methanol (TT) vừa đủ 10ml.

Cách tiến hành: Chấm riêng biệt lên bản mỏng 1 μ l mỗi dung dịch trên. Triển khai sắc ký đến khi dung môi đi được 15cm. Làm khô bản mỏng bằng luồng không khí và quan sát dưới ánh sáng tử ngoại ở bước sóng 365nm. Trên sắc ký đó, vết chính của dung dịch thử phải có vị trí, màu sắc và kích thước như vết chính của dung dịch đối chiếu (1). Phép thử chỉ có giá trị khi trên sắc ký đồ, dung dịch đối chiếu (2) cho 3 vết tách riêng biệt rõ ràng.

B. Thêm 5ml acid sulfuric đậm đặc (TT) vào 2mg chế phẩm, xuất hiện màu đỏ tím. Thêm tiếp 2,5ml nước, màu chuyển sang vàng.

C. Chế phẩm cho phản ứng đặc trưng của ion clorid (Phụ lục 7.1).

pH

Hòa tan 0,1g chế phẩm trong nước không có carbon dioxyd (TT), pH của dung dịch này phải từ 1,8 đến 2,8 (Phụ lục 5.9).

Góc quay cực riêng

Từ -240 đến -255⁰, tính theo chế phẩm đã làm khô (Phụ lục 5.13).

Hòa tan 0,250g chế phẩm trong dung dịch acid hydrocloric 0,1M vừa đủ 25,0ml.

Tạp chất liên quan

Tiến hành phương pháp sắc ký lỏng (Phụ lục 4.3). Điều kiện sắc ký như ở mục định lượng.

Tiêm dung dịch đối chiếu (5). Phép thử chỉ có giá trị khi tỷ lệ giữa tín hiệu của pic thu được (anhydro - tetracyclin) và nhiễu nền không được nhỏ hơn 3. Tiêm dung dịch thử và dung dịch đối chiếu (4).

Trên sắc ký đồ thu được của dung dịch thử, diện tích của các pic tương ứng với 4-epitetracyclin, anhydro-tetracyclin, 4-epianhydro tetracyclin không được lớn hơn diện tích của các pic tương ứng của dung dịch đối chiếu (4) (theo thứ tự: 3,0%, 0,5% và 0,5%). Nếu xuất hiện pic bất kỳ trên đuôi của pic chính, thì diện tích của pic đó không được lớn hơn 50,0% diện tích của pic tương ứng với 4-epitetracyclin của dung dịch đối chiếu (4) (1,5%).

Kim loại nặng

Không được quá 40 phần triệu (Phụ lục 7.4.7)

Lấy 0,5g chế phẩm tiến hành theo phương pháp 3

Dùng 2,5ml dung dịch chì mẫu 10 phần triệu để chuẩn bị mẫu đối chiếu

Mất khối lượng do làm khô

Không được quá 2,0% (Phụ lục 5.16)

(1,000g; 60⁰C; phosphor pentoxyd, áp suất không quá 670 Pa; 3 giờ)

Tro sulfat

Không được quá 0,5% (Phụ lục 7.7, phương pháp 2)

Dùng 1,0g chế phẩm

Định lượng

Tiến hành phương pháp sắc ký lỏng (Phụ lục 4.3)

Pha động: Cân 80.0g 2-methyl-2-propanol (TT), chuyển vào bình định mức dung tích 100ml bằng 200ml nước, thêm 100ml dung dịch dikali hydrôphosphat 3,5% đã được điều chỉnh đến pH 9,0 bằng dung dịch acid phosphoric loãng (TT), 200ml

dung dịch tetrabutylamoni hydrosulfat 1% đã được điều chỉnh đến pH 9,0 bằng dung dịch natri hydroxyd loãng (TT), 10ml dung dịch natri edetat 4% đã được điều chỉnh đến pH 9,0 bằng dung dịch natri hydroxyd loãng (TT), thêm nước vừa đủ đến vạch.

Dung dịch thử: Hòa tan 25,0mg chế phẩm trong dung dịch acid hydrocloric 0,01M vừa đủ 25,0ml.

Dung dịch chuẩn: Hòa tan 25,0 mg tetracyclin hydrocloric chuẩn trong dung dịch acid hydrocloric 0,01M vừa đủ 25,0ml.

Dung dịch đối chiếu (1): Hòa tan 15,0mg 4 epitetracyclin hydroclorid trong dung dịch acid hydrocloric 0,01M vừa đủ 50,0ml.

Dung dịch đối chiếu (2): Hòa tan 10,0mg anhydrotetracyclin hydroclorid trong dung dịch acid hydrocloric 0,01M vừa đủ 100,0ml.

Dung dịch đối chiếu (3): Hòa tan 10,0mg 4 epianhydrotetracyclin hydroclorid trong dung dịch acid hydrocloric 0,01M vừa đủ 50,0ml.

Dung dịch đối chiếu (4): Trộn 20ml dung dịch đối chiếu (1), 10,0ml dung dịch đối chiếu (2), 5,0ml dung dịch đối chiếu (3), thêm dung dịch acid hydrocloric 0,01M vừa đủ 200,0ml.

Dung dịch đối chiếu (5): Pha loãng 1,0ml dung dịch đối chiếu (2) thành 50,0ml bằng dung dịch acid hydrocloric 0,01M.

4. Mẫu phiếu kiểm nghiệm.

Bộ y tế
Tên cơ quan
kiểm nghiệm thuốc

Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam
Độc lập - Tự do - Hạnh phúc

Địa chỉ cơ quan

Phiếu kiểm nghiệm

Mẫu kiểm nghiệm:

Nơi sản xuất:

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:.....

Thử theo: Dược điển Việt Nam III

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

Yêu cầu	Kết quả

Kết luận: Mẫu thử này đạt/không 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)

Bài 9

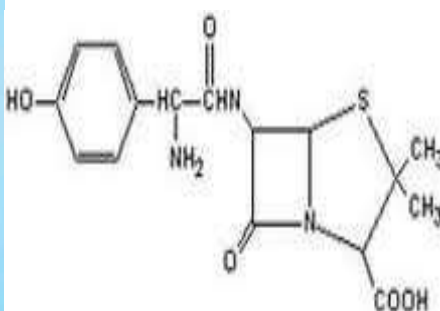
KIỂM NGHIỆM VIÊN NANG AMOXICILIN

MỤC TIÊU

1. Chuẩn bị được hóa chất, dụng cụ để kiểm nghiệm thuốc viên nang Amoxicilin đúng qui trình kỹ thuật.
2. Kiểm tra được một số yêu cầu trong kiểm nghiệm thuốc viên nang Amoxicilin.

NỘI DUNG

1. Viên nang Amoxicilin



Là nang cứng có chứa amoxicilin trihydrat

Chế phẩm phải đáp ứng các yêu cầu trong chuyên luận "Thuốc nang" (Phụ lục 1.11) và các yêu cầu sau đây:

Hàm lượng amoxicilin $C_{16}H_{19}N_3O_5S$ từ 92,5 đến 110,0% so với lượng ghi trên nhãn (tính theo loại khan).

2. Bảng các hóa chất cần chuẩn bị.

STT	TÊN HÓA CHẤT	NỒNG ĐỘ	CÁCH PHA	KẾT QUẢ	
				Có	Không
1					
2					
3					
4					
5					
6					
7					
8					
9					
10					
11					

3. Nội dung kiểm nghiệm.

Tính chất

Nang cứng, bột thuốc trong nang màu trắng ngà, không mùi hay gần như không mùi.

Định tính

Chế phẩm phải đáp ứng các yêu cầu trong chuyên luận "Viên nén amoxicilin".

Nước (Phụ lục 6.6)

Không được quá 14,5%. Phương pháp K_{af} Fischer dùng khoảng 0,100g bột thuốc.

Độ hòa tan (Phụ lục 8.4)

Thiết bị kiểu giỏ quay. Tốc độ quay 100 vòng/phút, áp dụng cho nang chứa 250mg amoxicilin.

Thiết bị kiểu cánh khuấy. Tốc độ quay 75 vòng/phút áp dụng cho nang chứa 500mg amoxicilin.

Môi trường hòa tan 900ml nước

Thời gian: 60 phút

Cách tiến hành: Lấy một lượng dung dịch, lọc, bỏ vài ml dịch lọc đầu, pha loãng nếu cần. Đo độ hấp thụ ở bước sóng cực đại khoảng 272nm (Phụ lục 3.1) trong cốc đo dày 1cm, mẫu trắng là nước cất. So sánh với dung dịch amoxicilin trihydrat chuẩn trong nước có nồng độ tương đương.

Yêu cầu: không được ít hơn 70,0% lượng amoxicilin C₁₆H₁₉N₃O₅S so với lượng ghi trên nhãn được hòa tan sau 60 phút.

Định lượng

Bằng phương pháp đo iod (Phụ lục 6.3) nhiệt độ thí nghiệm 25 ± 2°C

Dung dịch thử: Cân 20 nang, tính khối lượng trung bình thuốc trong nang M (g) nghiền mịn: Cân chính xác một lượng bột thuốc P (g) tương ứng với khoảng 0,100g amoxicilin, hòa tan trong nước vừa đủ 100ml. Lắc kỹ, lọc, bỏ khoảng 20ml dịch lọc đầu.

Lấy chính xác 2,0ml dung dịch thử cho vào bình nón nút mài có dung tích 100ml, thêm 20ml dung dịch natri hydroxyd 1N, lắc đều, để yên 15 phút. Thêm 2,4 ml dung dịch acid hydrocloric 1N và 10,0ml dung dịch iod 0,01N, đập ngay nút bình. Để yên 15 phút, chuẩn độ iod thừa bằng dung dịch natri thiosulfat 0,01N đến khi mất màu, chỉ thị là dung dịch hồ tinh bột (CT) cho vào lúc gần điểm kết thúc. Ghi v, ml

Lấy 20ml dung dịch thử cho vào bình nón nút mài khác có dung tích 100ml, thêm 0,12ml dung dịch acid hydrocloric 1N, thêm 10,0ml dung dịch iod 0,01N. Chuẩn độ ngay bằng dung dịch natri thiosulfat 0,01N đến khi mất màu, chỉ thị là dung dịch hồ tinh bột (CT) cho vào lúc gần điểm kết thúc. Ghi V, ml (mẫu trắng của dung dịch thử).

Dung dịch chuẩn: Cân chính xác A (g) amoxicilin trihydrat chuẩn tương ứng khoảng 0,100g amoxicilin, hòa tan trong nước vừa đủ 100ml.

Song song tiến hành như dung dịch thử, bắt đầu từ "Lấy chính xác 2,0ml..."

Thể tích dung dịch natri thiosulfat 0,01N dùng cho mẫu chuẩn là v_c ml và mẫu trắng là V_c ml.

Hàm lượng amoxicilin so với lượng ghi trên nhãn được tính theo công thức.

$$\frac{(V_t - v_t) \times A \times C \times (100 - B) \times M \times 100}{(V_c - v_c) \times P \times 10000 \times D}$$

C: Lượng (g) amoxicilin có trong 100g amoxicilin trihydrat chuẩn

B: Lượng (g) nước có trong 100g amoxicilin trihydrat chuẩn

D: Lượng (g) amoxicilin trong một nang theo nhãn

4. Mẫu phiếu kiểm nghiệm

Bộ y tế

Tên cơ quan

Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam

Độc lập - Tự do - Hạnh phúc

Phiếu kiểm nghiệm

.....

[illegible]

Thủ trưởng cơ quan
(Ký và đóng dấu)

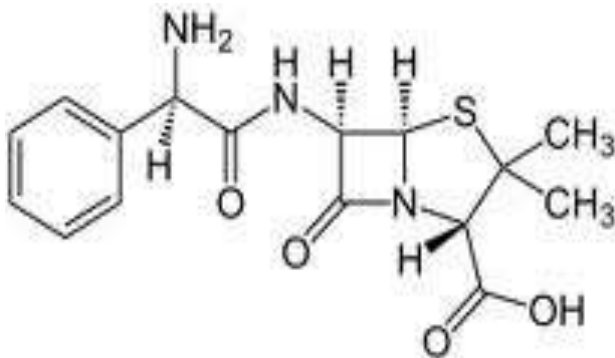
Bài 12

KIỂM NGHIỆM VIÊN NANG AMPICILIN

MỤC TIÊU

1. Chuẩn bị được hóa chất, dụng cụ để kiểm nghiệm thuốc viên nang Ampicilin đúng qui trình kỹ thuật.
2. Kiểm tra được một số yêu cầu trong kiểm nghiệm thuốc viên nang Ampicilin

NỘI DUNG



Là viên nang, chứa ampicilin hoặc ampicilin trihydrat. Chế phẩm phải đáp ứng các yêu cầu trong chuyên luận "Thuốc viên nang" (phụ lục 1.11) và các yêu cầu sau đây:

Hàm lượng của ampicilin $C_{16}H_{19}N_3O_4S$ từ 92,5 đến 107,5% so với lượng ghi trên nhãn (tính theo loại khan).

2. Bảng các hóa chất cần chuẩn bị.

STT	TÊN HÓA CHẤT	NỒNG ĐỘ	CÁCH PHA	KẾT QUẢ	
				Có	Không
1					
2					
3					
4					
5					
6					
7					
8					
9					
10					
11					

3. Nội dung kiểm nghiệm.

Tính chất

Viên màu trắng hay trắng ngà, gần như không có mùi

Định tính

A. Lấy một lượng bột viên tương ứng khoảng 10mg ampicilin, thêm 10ml nước, lắc kỹ, lọc. Thêm vào dung dịch lọc 2ml thuốc thử Fehling (TT) xuất hiện ngay màu tím đỏ.

B. Phương pháp sắc ký lớp mỏng (Phụ lục 4.4)

Bản mỏng silicagel GF₂₅₄ dày khoảng 0,3mm đã hoạt hóa ở 100°C trong một giờ.

Hệ dung môi khai triển: Aceton - nước - toluen - acid acetic băng (65 : 10 : 10 : 2,5).

Thuốc thử hiện màu: Dung dịch ninhydrin 0,3% trong ethanol (TT)

Dung dịch thử: Lắc một lượng bột viên tương ứng với 100mg ampicilin trong 20ml hỗn hợp gồm aceton và acid hydrocloric 0,1N (4 : 1). Lọc.

Dung dịch đối chiếu: Là dung dịch 0,5% ampicilin trong hỗn hợp gồm aceton - acid hydrocloric 0,1N (4 : 1).

Tiến hành: Chấm riêng biệt lên bản mỏng 2 µl mỗi dung dịch trên. Sau khi triển khai sắc ký được khoảng 15cm, lấy bản mỏng ra, để khô ở nhiệt độ phòng. Phun thuốc thử hiện màu, sau đó sấy ở 90°C trong 15 phút. Trên sắc ký đồ, vết của dung dịch thử và của dung dịch đối chiếu phải giống nhau về màu sắc và giá trị R_f.

Độ hòa tan (Phụ lục 8.4)

Thiết bị kiểu cách khuấy

Dung môi hòa tan: 900ml nước vừa mới cất

Tốc độ quay: 100 vòng/phút

Thời gian: 45 phút

Phương pháp thử: Lấy một thể tích thích hợp của mẫu thử và lọc ngay qua một màng lọc có lỗ lọc trung bình không lớn hơn 1,0 µm, bỏ 1ml dịch lọc đầu. Lấy chính xác một lượng dịch lọc chứa khoảng 1mg ampicilin, pha loãng với dung dịch 1% của formaldehyd trong acid hydrocloric 0,3M tới vừa đủ 50,0ml. Đun nóng dung dịch tới 90°C ± 5°C trong nồi cách thủy bằng nhiệt trong 60 phút. Để nguội, đo độ hấp thụ của dung dịch ở cực đại khoảng 352nm (Phụ lục 3.1). Song song trong cùng điều kiện, tiến hành tương tự với dung dịch nước của ampicilin chuẩn có nồng độ tương đương. Tính hàm lượng của C₁₆H₁₉N₃O₄S.

Yêu cầu: không được ít hơn 70% lượng ampicilin C₁₆H₁₉N₃O₄S so với lượng ghi trên nhãn được hòa tan trong 45 phút.

Mất khối lượng do làm khô

Cân chính xác khoảng 100ml bột thuốc, sấy trong chân không dưới áp suất 5 mmHg ở 60°C trong 3 giờ. Đối với viên có chứa ampicilin khan, lượng mất đi không quá 4,0%.

Đối với viên có chứa ampicilin trihydrat, lượng mất đi không quá 13,0%.

Định lượng

Bằng phương pháp đo iod (Phụ lục 6.3), nhiệt độ thí nghiệm 25 ± 2°C.

Dung dịch thử: Cân 20 viên, tính khối lượng trung bình của viên M (g). Cân chính xác một lượng bột viên P (g) tương ứng khoảng 0.100g ampicilin, hòa tan trong nước vừa đủ 100ml. Lắc kỹ, lọc bỏ khoảng 20ml dịch lọc đầu.

Lấy chính xác 2,0ml dung dịch thử cho vào bình nón nút mài có dung dịch 100ml, thêm 2,0ml dung dịch natri hydroxyd 1N, lắc đều, để yên 15 phút. Thêm 2,4ml dung dịch acid hydrocloric 1 N và 10,0ml dung dịch iod 0,01N, đậy ngay nút bình. Để yên 15 phút, chuẩn độ iod thừa bằng dung dịch natri thiosulfat 0,01N đến khi mất màu, chỉ thị là dung dịch hồ tinh bột (CT) cho vào lúc gần cuối chuẩn độ, ghi V_t (ml).

Lấy 2,0ml dung dịch thử cho vào một bình nón nút mài có dung tích 100ml khs, thêm 0,12ml dung dịch acid hydrocloric 1N và 10,0ml dung dịch iod 0,01N. Chuẩn độ ngay bằng dung dịch natri thiosulfat 0,01N đến khi mất màu, chỉ thị là dung dịch hồ tinh bột (CT) cho vào lúc gần điểm kết thúc. Ghi V_t (ml) (mẫu trắng của dung dịch thử).

Dung dịch chuẩn: Cân chính xác A (g) ampicilin trihydrat chuẩn tương ứng 0,100g ampicilin, hòa tan trong nước vừa đủ 100ml. Song song tiến hành như dung dịch thử, bắt đầu từ: "lấy chính xác 2,0ml...".

Thể tích dung dịch natri thiosulfat 0,01N dùng cho mẫu chuẩn là V_c là mẫu trắng của chuẩn là V_c .

Hàm lượng ampicilin trong một viên tính theo khối lượng trung bình của viên, tính theo công thức sau:

$$\frac{(V_t - v_t) \times A \times C \times (100 - B) \times M \times 100}{(V_c - v_c) \times P \times 10000 \times D}$$

C: Lượng g ampicilin có trong 100g ampicilin trihydrat chuẩn

D: Lượng (g) ampicilin trong 1 viên theo nhãn

4. Mẫu phiếu kiểm nghiệm

Bộ y tế
Tên cơ quan
kiểm nghiệm thuốc

Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam
Độc lập - Tự do - Hạnh phúc

Địa chỉ cơ quan

Phiếu kiểm nghiệm

Mẫu kiểm nghiệm:

Nơi sản xuất:

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:

Thử theo: Dược điển Việt Nam III

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

Yêu cầu	Kết quả

Kết luận: Mẫu thử này đạt/không 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)

Bài 11

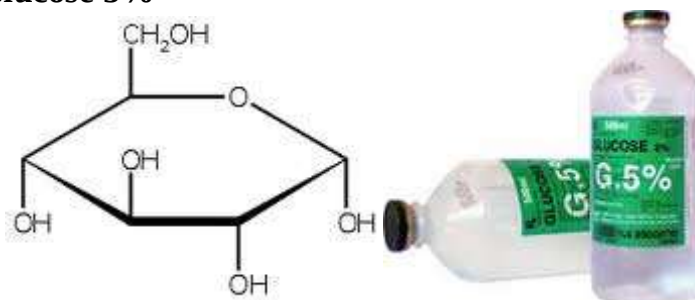
KIỂM NGHIỆM DỊCH TRUYỀN GLUCOSE 5%

MỤC TIÊU

1. Chuẩn bị được hóa chất, dụng cụ để kiểm nghiệm thuốc dịch truyền Glucose 5% đúng qui trình kỹ thuật.
2. Kiểm tra được một số yêu cầu trong kiểm nghiệm thuốc dịch truyền Glucose 5%

NỘI DUNG

1. Dịch truyền Glucose 5%



Là dung dịch vô khuẩn của glucose khan hoặc glucose ngâm một phân tử nước trong nước để pha thuốc tiêm. Dung dịch được pha chế theo chỉ dẫn về thuốc tiêm đối với glucose, không được cho thêm chất bảo quản, sau khi pha chế phải tiệt khuẩn ngay.

Chế phẩm phải đáp ứng các yêu cầu trong chuyên luận "Thuốc tiêm, thuốc tiêm truyền" (Phụ lục 1.14) và các yêu cầu sau đây:

Hàm lượng glucose C₆H₁₂O₆: từ 95,0 đến 105,0% so với lượng ghi trên nhãn.

2. Bảng các hóa chất cần chuẩn bị.

STT	TÊN HÓA CHẤT	NỒNG ĐỘ	CÁCH PHA	KẾT QUẢ	
				Có	Không
1					
2					
3					
4					
5					
6					
7					
8					
9					
10					
11					

3. Nội dung kiểm nghiệm.

Tính chất

Dung dịch trong, không màu. Với các dung dịch có chứa từ 20% C₆H₁₂O₆ trở lên, màu vàng của dung dịch có thể hơi vàng nhưng không đậm hơn màu vàng rơm nhạt.

Định tính

A. Lấy 1ml thuốc tiêm, thêm 5ml thuốc thử Fehling (TT). Đun sôi sẽ xuất hiện tủa đồng (I) oxyd có màu đỏ gạch.

B. Dung dịch thu được trong phần định lượng có độ quay cực hữu tuyến.

Hydroxymethylfurfural và các chất liên quan

Pha loãng một thể tích thuốc tiêm tương ứng với 1,0g $C_6H_{12}O_6$ với nước đến vừa đủ 250ml. Độ hấp thụ của dung dịch thu được ở cực đại 284nm (Phụ lục 3.1) không được lớn hơn 0,25.

pH

3,5 đến 6,5 (Phụ lục 5.9). Sử dụng dung dịch được chuẩn bị bằng cách pha loãng thuốc tiêm với nước cất pha tiêm nên cần đến nồng độ tương đương 5% (kl/tt) $C_6H_{12}O_6$ và thêm vào mỗi 100ml dung dịch này 0,3ml dung dịch kali clorid bão hòa.

Kim loại nặng

Không được quá 0,0005C%, trong đó C là lượng $C_6H_{12}O_6$ tính ra gam có trong 1ml thuốc tiêm quy định trên nhãn (Phụ lục 7.4.7, phương pháp I).

Lấy 1 thể tích thuốc tiêm tương ứng với 4g $C_6H_{12}O_6$ điều chỉnh đến thể tích 20ml bằng cách đem bốc hơi hoặc thêm nước. Dùng 12ml dung dịch thu được để thử.

Chất gây sốt

Theo phương pháp thử chất gây sốt (Phụ lục 10.5). Sử dụng 5ml (dung dịch 50%) hoặc 10ml (dung dịch 5%, 10%, 20% hoặc 25%) cho 1kg thể trọng thử.

Sự nhiễm tiểu phân lạ

Khi được đóng ở thể tích từ 100ml trở lên, tiến hành xác định giới hạn tiểu phân (Phụ lục 8.9). Thuốc tiêm phải đạt yêu cầu của phép thử "Tiểu phân không nhìn thấy bằng mắt thường".

Định lượng

Lấy chính xác một thể tích thuốc tiêm tương ứng với 2 đến 5g glucose $C_6H_{12}O_6$, thêm 0,2ml dung dịch amoniac 5M (TT) và nước vừa đủ 100ml. Trộn đều, để yên 30 phút rồi xác định góc quay cực trong ống dài 2dm (Phụ lục 5.13).

Giá trị góc quay cực đo được nhân với 0,9477 là khối lượng tính ra gam của glucose $C_6H_{12}O_6$ có trong thể tích thuốc tiêm lấy ra định lượng.

4. Mẫu phiếu kiểm nghiệm

Bộ y tế

Tên cơ quan

kiểm nghiệm thuốc

Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam

Độc lập - Tự do - Hạnh phúc

Địa chỉ cơ quan

Phiếu kiểm nghiệm

Mẫu kiểm nghiệm:

Nơi sản xuất:

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:.....

Thử theo: Dược điển Việt Nam III

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

Bài 12

KIỂM NGHIỆM DỊCH TRUYỀN NaCl 0.9%

MỤC TIÊU

1. Chuẩn bị được hóa chất, dụng cụ để kiểm nghiệm thuốc dịch truyền NaCl 0,9% đúng qui trình kỹ thuật.
2. Kiểm tra được một số yêu cầu trong kiểm nghiệm thuốc dịch truyền NaCl 0,9%.

NỘI DUNG

1. Dịch truyền NaCl 0.9%



Dung dịch vô khuẩn của natri clorid trong nước để thuốc tiêm. Chế phẩm phải đáp ứng các yêu cầu trong chuyên luận "Thuốc tiêm, thuốc tiêm truyền", mục "Dung dịch tiêm truyền" (Phụ lục 1.14) và các yêu cầu sau đây:

Hàm lượng natri clorid NaCl không ít hơn 0,850% và không nhiều hơn 0,950% so với lượng ghi trên nhãn.

2. Bảng các hóa chất cần chuẩn bị.

STT	TÊN HÓA CHẤT	NỒNG ĐỘ	CÁCH PHA	KẾT QUẢ	
				Có	Không
1					
2					
3					
4					
5					
6					
7					
8					
9					
10					
11					

3. Nội dung kiểm nghiệm.

Tính chất

Dung dịch trong, không màu

Định tính

Chế phẩm phải có phản ứng của ion natri và ion clorid (Phụ lục 7.1)

pH

Từ 4,5 đến 7,0 (Phụ lục 5.9)

Kim loại nặng

Không được quá 0,3 phần triệu

Bốc hơi 67ml chế phẩm còn khoảng 20ml, thêm 2ml acid acetic loãng 6% và pha loãng vừa đủ 25ml, chuyển vào ống Nessler dung tích 50ml, điều chỉnh pH khoảng 3,0 đến 4,0 bằng acid acetic loãng hoặc amoniac loãng, pha loãng với nước thành 35ml, trộn đều, thêm 10ml dung dịch hydrogen sulfid vừa mới pha, trộn đều, pha loãng với nước thành 50ml.

Tiến hành song song với một ống chuẩn được chuẩn bị bằng cách lấy 1ml dung dịch chì mẫu 20 phần triệu. Pha loãng với nước thành 25ml rồi tiếp tục làm ống thử từ đoạn chuyển vào ống Nessler.

Quán át theo chiều dọc ống trên nền trắng, màu của ống thử không được đậm hơn màu của ống chuẩn.

Vô khuẩn

Đạt vô khuẩn (Phụ lục 10.8)

Nội độc tố vi khuẩn

Không được quá 0,5 EU (Phụ lục 10.3)

Định lượng

Lấy chính xác 10,0ml chế phẩm, cho vào một bình nón có dung tích 100ml, thêm 3 giọt dung dịch Kali cromat (CT). Chuẩn độ bằng dung dịch bạc nitrat 0,1 N đến khi có tua hồng.

1ml dung dịch bạc nitrat 0,1N tương đương với 5,844mg NaCl.

4. Mẫu phiếu kiểm nghiệm

Bộ y tế

Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam

Tên cơ quan

Độc lập - Tự do - Hạnh phúc

kiểm nghiệm thuốc

Địa chỉ cơ quan

Phiếu kiểm nghiệm

Mẫu kiểm nghiệm:

Nơi sản xuất:

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:

Thử theo: Dược điển Việt Nam III

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

Yêu cầu	Kết quả

Kết luận: Mẫu thử này đạt/không 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)

PHA DUNG DỊCH THUỐC THỬ

Pha các dung dịch thuốc thử (theo phụ lục 2.8- Dược điển Việt Nam III)

1. Các dung dịch acid, dung dịch kiềm

Dung dịch acid hydrochloric HCl 2%; 7,3%; 10%; 2N.

Dung dịch acid hydrochloric HCl xN (xN).

Pha loãng 85 x ml dung dịch acid hydrochloric đậm đặc với nước vừa đủ 1000ml.

Dung dịch acid hydrochloric HCl 1%.

Pha loãng 2,4 ml dung dịch acid hydrochloric HCl đậm đặc với nước vừa đủ 100ml.

Dung dịch acid hydrochloric HCl 7,3%.

Dung dịch acid hydrochloric HCl 10%

Dung dịch acid nitric HNO₃ 13%; 16%; 2N.

Dung dịch acid nitric HNO₃ xN (xN).

Pha loãng 63 x ml dung dịch acid nitric đậm đặc với nước vừa đủ 1000ml.

Dung dịch acid nitric HNO₃ 16%

Pha loãng 23 g acid nitric (16,2 ml HNO₃ đậm đặc) với nước vừa đủ 100ml.

Dung dịch acid nitric HNO₃ 13%

Pha loãng 14,6 ml acid nitric đậm đặc vừa đủ 100ml.

Dung dịch acid sulfuric H₂SO₄ 10%

Cho cẩn thận từ từ và lắc luôn 6ml dung dịch acid sulfuric đậm đặc vào 50 ml nước, làm nguội, thêm nước vừa đủ 100ml.

Dung dịch acid salicylic 0,01%

Cân chính xác 0,01g acid salicylic pha vào 0,1ml acid acetic băng trong ethanol vừa đủ 100ml.

Dung dịch amoni hydroxyd 10%.

Lấy 440 ml dung dịch ammoniac đậm đặc hòa vào nước, thêm nước vừa đủ 1000ml.

Dung dịch đệm ammoniac pH 10,0.

Hòa tan 5,4g amoni clorid trong 20 ml nước, thêm 35 ml dung dịch ammoniac 10M và thêm nước vừa đủ 100ml.

Dung dịch ammoniac xM: pha loãng 75x ml ammoniac đậm đặc với nước vừa đủ 1000ml.

Dung dịch natri hydroxyd 10%, 2M.

Dung dịch Natri hydroxyd 10%

Hòa tan 10g Natri hydroxyd vào nước, để nguội và thêm nước vừa đủ 100 ml.

Dung dịch Natri hydroxyd 2M:

Hòa tan 80 g Natri hydroxyd vào nước, để nguội và thêm nước vừa đủ 1000ml.

Dung dịch acid axetic 2M, 30% (5M).

Dung dịch acid axetic xM:

Pha loãng 57x ml (60 x g) acid axetic băng với nước vừa đủ 1000ml.

2. Các dung dịch muối không màu

Dung dịch bạc nitrat 2%; 5%; 0,1N (1,75%)

Dung dịch bạc nitrat x %

Hòa tan xg bạc nitrat với nước vừa đủ 100ml.

Dung dịch bạc clorid 6,1%; 25%.

Hòa tan x g bạc clorid với nước vừa đủ 100ml.

Dung dịch calci clorid 20%; 7,35%.

Hòa tan x g calci clorid với nước vừa đủ 100ml.

Dung dịch amoni oxalat 4%

Dung dịch amoni oxalat x%:

Hòa tan x g amoni oxalat với nước vừa đủ 100ml.

Dung dịch magie sulfat 10%

Dung dịch magie sulfat x%

Hòa tan x g magie sulfat với nước vừa đủ 100ml.

Dung dịch kali iodide 10%

Dung dịch kali iodide x%

Hòa tan x g kali iodide với nước vừa đủ 100ml.

Dung dịch natri edetat 0,01M (dung dịch Trilon B 0,01M).

Hòa tan 3,72 g Trilon B (Dinatri dihydro ethylentetra acetate) với nước rồi pha loãng vừa đủ 1000ml.

3. Các thuốc thử có màu

Thuốc thử Streng

Dung dịch A: Hòa tan 10g uranyl acetate vào 38,2 ml acid acetic 30% , thêm nước vừa đủ 100ml.

Dung dịch B: Hòa tan 30g kẽm acetate vào 19,1ml acid axetic 30%. Thêm nước vừa đủ 100ml.

Trộn A với B để lắng 24h, gạn lấy dung dịch trong.

Thuốc thử Nessler

Pha dung dịch bão hòa thủy ngân clorid(1): 6g/100ml.

Hòa tan 10g KI trong 10 ml nước (2).

Thêm từng ít một và khuấy đều (1) vào (2) cho tới khi xuất hiện kết tủa đỏ bền.

Thêm 30g KOH, sau khi tan hết lại thêm 1ml (1).

Pha loãng với nước vừa đủ 300ml. Để lắng, gạn lấy phần dung dịch trong.

Phèn sắt amoni 0,2%

Hòa tan 0,2g phèn sắt amoni với nước vừa đủ 100ml.

Dung dịch kali pemanganat 0,02M

Hòa tan 0,64g kali pemanganat với 20 ml nước đun sôi rồi pha loãng vừa đủ 1000ml.

Dung dịch sắt (III) clorid 0,5%

Hòa tan 0,5g sắt (III) clorid với nước vừa đủ 100ml.

PHA DUNG DỊCH MẪU, DUNG DỊCH CHUẨN ĐỘ, CHỈ THỊ

1. Pha các dung dịch mẫu (theo phụ lục 2.4- Dược điển VN III).

Dung dịch amoni mẫu 100 phần triệu

Cân chính xác 0,297g amoni clorid đã sấy khô ở 100-105°C đến khối lượng không đổi, hòa tan vào nước trong bình định mức 1000ml. Thêm nước vừa đủ đến vạch

Dung dịch amoni mẫu 1 phần triệu

Pha loãng một thể tích amoni mẫu 100 phần triệu amoni thành 100 thể tích với nước trước khi sử dụng.

Dung dịch clorid mẫu 500 phần triệu

Cân chính xác 0,0824g natri clorid đã sấy khô ở 100-105°C đến khối lượng, hòa tan vào nước trong bình định mức 100ml. Thêm nước vừa đủ đến vạch.

Dung dịch clorid mẫu 5 phần triệu

Pha loãng một thể tích dung dịch clorid mẫu 500 phần triệu clorid thành 100 thể tích với nước ngay trước khi sử dụng.

Dung dịch sulfat mẫu 1000 phần triệu

Cân chính xác 0,181g kali sulfat đã sấy khô ở 100- 105°C đến khối lượng không đổi, hòa tan vào nước trong bình định mức 100ml. Thêm nước vừa đủ đến vạch.

Dung dịch sulfat mẫu một phần triệu

Pha loãng một thể tích dung dịch sulfat mẫu 100 phần triệu sulfat thành 100 thể tích ngay với nước trước khi sử dụng.

Dung dịch calci mẫu 1000 phần triệu

Cân chính xác 0,0625g calci cacbonat đã sấy khô ở 100- 105°C đến khối lượng không đổi, cho vào bình định mức 250ml. Thêm 3ml acid acetic 5M, lắc cho tan. Thêm nước vừa đủ đến vạch.

Dung dịch calci mẫu 100 phần triệu trong ethanol:

Pha loãng 1 thể tích dung dịch calci mẫu 100 phần triệu calci thành 10 thể tích với ethanol ngay trước khi sử dụng.

Dung dịch calci mẫu 10 phần triệu trong nước:

Pha loãng một thể tích dung dịch calci mẫu 100 phần triệu calci thành 100 thể tích với nước ngay trước khi sử dụng.

2. Pha các dung dịch chuẩn độ

Dung dịch bạc nitrat 0,1M (0,1N)

1ml dung dịch chứa 0,01699g bạc nitrat (AgNO_3)

Điều chế: Hòa tan 17,5g bạc nitrat tinh thể trong nước và pha loãng với nước vừa đủ 1lit.

Chuẩn độ: cân chính xác 0,12 g chất gốc chuẩn natri clorid, hòa tan trong 50 ml nước, thêm vài giọt dung dịch kali cromat (chỉ thị). Chuẩn độ bằng dung dịch bạc nitrat đã điều chế đến khi xuất hiện kết tủa đỏ nhạt.

Tính hệ số hiệu chỉnh K của dung dịch chuẩn độ, trong đó $T = 0,005845\text{g/ml}$ (1ml dung dịch AgNO_3 0,1N tương đương với 0,005845g NaCl).

Bảo quản trong lọ thủy tinh màu hổ phách hay nâu, tránh ánh sáng.

Lưu ý: chuẩn chất gốc natri clorid (NaCl) được chuẩn bị bằng cách nung NaCl (loại tinh khiết phân tích) ở 500- 650°C trong 40- 50 phút.

Dung dịch acid hydrochloric 1M (1N)

1ml dung dịch chứa 0,03646g acid hydrochloric (HCl)

Điều chế: Lấy 85ml acid hydrochloric đậm đặc (TT) pha loãng với nước vừa đủ 1lit

Chuẩn độ: cân chính xác 0,50g chất chuẩn gốc natri cacbonat, hòa tan trong 50ml nước, thêm 2 giọt dung dịch metyl da cam (CT). Chuẩn độ bằng dung dịch acid hydrochloric đã điều chế đến khi chuyển màu sang hồng cam. Đun sôi 2 phút, để nguội rồi chuẩn độ tiếp đến màu hồng cam.

Tính hệ số hiệu chỉnh K của dung dịch chuẩn độ, trong đó $T = 0,053\text{g/ml}$.

Lưu ý: Chất chuẩn gốc natri cacbonat (Na_2CO_3) được chuẩn bị bằng cách sấy Na_2CO_3 khan (loại tinh khiết phân tích) ở $270\text{-}300^\circ\text{C}$ trong khoảng 40-50 phút.

Dung dịch acid hydrochloric 0,5N (0,5M)

1ml dung dịch chứa 0,01823g acid hydrochloric (HCl)

Điều chế: Lấy 42 ml acid hydrochloric đậm đặc (TT) pha loãng với nước vừa đủ 1 lit.

Chuẩn độ: Cân chính xác 0,250g chất chuẩn gốc natri cacbonat, hòa tan trong 50 ml nước, thêm hai giọt dung dịch metyl da cam (CT). Chuẩn độ bằng dung dịch acid hydrochloric đã điều chế đến khi chuyển sang màu hồng cam. Đun sôi 2 phút, để nguội rồi chuẩn tiếp đến màu hồng cam.

Tính hệ số hiệu chỉnh K của dung dịch chuẩn độ, trong đó $T = 0,0265\text{g/ml}$.

Lưu ý: Chất chuẩn gốc natri cacbonat (Na_2CO_3) được chuẩn bị bằng cách sấy Na_2CO_3 khan (loại tinh khiết phân tích) ở $270\text{-}300^\circ\text{C}$ trong khoảng 40-50 phút.

Dung dịch kali bromat 0,1M (0,1N).

1ml dung dịch chứa 0,002784g kali bromat (KBrO_3).

Điều chế: Cân chính xác 2,7840g chất chuẩn gốc kali bromat, hòa tan vào nước cất trong một bình định mức 1 lít và thêm nước vừa đủ đến vạch.

Tính hệ số hiệu chỉnh K của dung dịch chuẩn độ.

Lưu ý: Chất chuẩn gốc kali bromat (KBrO_3) được chuẩn bị bằng cách nghiền nhỏ, sấy kali bromat (loại tinh khiết phân tích) ở $100\text{-}110^\circ\text{C}$ trong 3-4 giờ.

Dung dịch natri hydroxyd 0,5N (0,5M).

1ml dung dịch chứa 0,0200g natri hydroxyd (NaOH).

Điều chế: Hòa tan 25g natri hydroxyd (TT) trong 25ml nước. Đậy kín bình chứa bằng nút cao su, để yên 1 ngày rồi gạn lấy nước trong ở phía trên và pha loãng với nước cất rồi mới đun sôi để nguội đến vừa đủ 1 lit.

Chuẩn độ: Lấy chính xác 10,00ml dung dịch natri hydroxyd đã điều chế, thêm 2 giọt dung dịch metyl da cam (CT). Chuẩn độ bằng dung dịch acid hydrochloric 1N đến khi chuyển màu sang hồng da cam.

Tính hệ số hiệu chỉnh K của dung dịch chuẩn độ.

Bảo quản trong lọ thủy tinh trung tính nút kín bằng nút cao su, hoặc chai nhựa tổng hợp polyvinyl, hoặc polyolefin nút kín. Cần thường xuyên chuẩn độ lại dung dịch.

Dung dịch kali iodat 0,1M (0,1N)

1ml dung dịch chứa 0,003567g kali iodat (KIO_3)

Điều chế: Cân chính xác 3,5670g chất chuẩn gốc kali iodat, hòa tan vào nước cất trong một bình định mức 1lit và thêm nước vừa đủ đến vạch.

Tính hệ số hiệu chỉnh K của dung dịch chuẩn độ.

Lưu ý: Chất chuẩn gốc Kali iodat (KIO_3) được chuẩn bị bằng cách sấy kali iodat (loại tinh khiết phân tích) ở $120\text{-}140^\circ\text{C}$ trong 1,5 – 2 giờ.

3. Pha chế các chất chỉ thị (Theo phụ lục 2.10- Dược điển VN III).

Dung dịch kalicromat (CT)

Hòa tan 5 g kali cromat trong nước và thêm nước vừa đủ 100ml.

Khi dùng, cứ 100ml dung dịch lúc cuối chuẩn độ, cho thêm 1-2 ml dung dịch chỉ thị.

Dung dịch phenol phtalein (CT)

Hòa tan 0,1g phenol phtalein trong 80ml ethanol 96% (TT) và thêm nước vừa đủ 100ml.

Thử độ nhạy: lấy 100 ml nước không có carbon dioxyd, thêm 0,1 ml dung dịch phenol phtalein(CT), hỗn hợp phải không màu. Khi thêm không quá 0,2ml dung dịch natri hydroxyd 0,02N, hỗn hợp phải chuyển sang màu hồng.

Dung dịch da cam methyl (CT)

Hòa tan 0,1g da cam methyl trong 80 ml nước và thêm ethanol 96% (TT) vừa đủ 100ml.

Thử độ nhạy: Lấy 100ml nước không có cacbon dioxyd, thêm 0,1ml dung dịch da cam methyl (CT), hỗn hợp có màu vàng. Khi thêm không quá 0,1ml dung dịch acid hydrochloric 0,1N, màu của hỗn hợp phải chuyển sang đỏ.

Dung dịch đỏ methyl (CT)

Hòa tan 0,1g đỏ methyl trong một hỗn hợp của 1,86ml dung dịch natri hydroxyd 0,1N và 50ml ethanol 96% (TT). Sau khi tan hết thêm nước vừa đủ 100ml.

Thử độ nhạy: Lấy 100ml nước không có cacbon dioxyd, thêm 0,05ml dung dịch acid hydrochloric 0,02N và 0,1ml dung dịch đỏ metyl (CT), hỗn hợp có màu đỏ. Khi thêm không quá 0,1ml dung dịch natri hydroxyd 0,02N, màu của hỗn hợp phải chuyển sang vàng.

Dung dịch đỏ phenol (CT)

Hòa tan 0,1g đỏ phenol với 2,82ml dung dịch natri hydroxyd 0,1N và 20 ml ethanol 96% (TT). Sau khi tan hết, thêm nước vừa đủ 100ml.

Thử độ nhạy: lấy 100ml nước không có cacbon dioxyd, thêm 0,1ml dung dịch đỏ phenol (CT), hỗn hợp phải có màu vàng. Khi thêm không quá 0,1ml dung dịch natri hydroxyd 0,02N, màu của dung dịch phải chuyển sang tím đỏ.

Dung dịch hồ tinh bột (CT)

Nghiền 1g tinh bột trong cối với 5ml nước cho đến khi thành một hỗn hợp đồng nhất rồi vừa đổ vừa khuấy vào 100ml nước sôi. Đun sôi tiếp 2-3 phút cho đến khi thu được một chất lỏng chỉ hơi đục.

Dung dịch chỉ pha để dùng trong 2-3 ngày. Muốn dùng được lâu hơn phải thêm 10 mg thủy ngân (II) iodide.

Thử độ nhạy: Lấy 5ml dung dịch hồ tinh bột (CT) pha loãng với nước thành 100ml, thêm 2 giọt dung dịch iod 0,1N, dung dịch phải có màu xanh.

Hỗn hợp đen eriocrom T (CT)

Nghiền trộn đều 0,1g đen eriocrom T với 99,0g natri clorid (TT)

Thử độ nhạy: Hòa tan 0,05g hỗn hợp đen eriocrom T (CT) trong 100ml nước, dung dịch có màu tím. Thêm 0,3 ml dung dịch ammoniac 10% (TT), dung dịch chuyển sang màu xanh, khi thêm tiếp không quá 0,1ml dung dịch magnesi sulfat 1% (TT) màu phải chuyển sang tím.

CÁC HÓA CHẤT VÀ THUỐC THỬ

Acid acetic băng

Acid acetic kết tinh được



Dùng loại tinh khiết phân tích

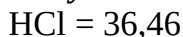
Chất lỏng không màu, mùi hăng cay.

Khối lượng riêng: khoảng 1,05g/ml

Điểm đông đặc: khoảng 16°C.

Hàm lượng CH_3COOH : không được nhỏ hơn 98,0% kl/kl.

Acid hydrochloric (acid hydrochloric đậm đặc)



Dùng loại tinh khiết phân tích

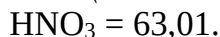
Chất lỏng không màu, bốc khói.

Tỷ trọng ở 20°C: khoảng 1,18g/ml

Hàm lượng HCl: 35-38% (kl/kl), khoảng 11,5M.

Bảo quản ở nhiệt độ không quá 30°C, trong bao bì polyethylene hoặc vật liệu không phản ứng với acid hydrochloric.

Acid nitric (acid nitric đậm đặc)



Dùng loại tinh khiết phân tích.

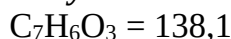
Chất lỏng bốc khói, ăn mòn, có nồng độ mol khoảng 16M.

Khối lượng riêng: khoảng 1,42g/ml.

Hàm lượng HNO_3 khoảng 70% (kl/kl)

Bảo quản tránh ánh sáng.

Acid salicylic



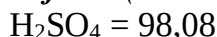
Dùng loại tinh khiết phân tích.

Tinh thể không màu

Điểm chảy: khoảng 160°C.

Các dung dịch acid salicylic không bảo quản được lâu, chỉ pha trước khi dùng.

Acid sulfuric (acid sulfuric đậm đặc)

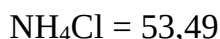


Chất lỏng sánh như dầu, ăn mòn mạnh.

Khối lượng riêng: khoảng 1,84 g/ml

Hàm lượng H_2SO_4 : khoảng 96%.

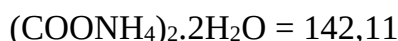
Amoni clorid



Dùng loại tinh khiết phân tích

Tinh thể trắng, không mùi, vị mát, hơi chat.

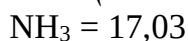
Amoni oxalate



Dùng loại tinh khiết phân tích.

Tinh thể không màu, tan trong nước.

Ammoniac (ammoniac đậm đặc)



Dùng loại tinh khiết phân tích.

Chất lỏng trong, không màu, mùi mạnh đặc biệt.

Tỷ trọng ở 20°C: khoảng 0,91g/ml.
Hàm lượng NH₃: khoảng 25% (13,5M).

Bạc nitrat

AgNO₃ = 169,87

Dùng loại tinh khiết phân tích

Tinh thể không màu hay màu trắng, chuyển thành màu xám, nâu hay đen khi để ngoài không khí và có mặt của chất hữu cơ.

Các dung dịch bạc nitrat vẫn bảo quản trong lọ thủy tinh màu, nút nhám.

Bạc clorid

BaCl₂.2H₂O = 244,28.

Dùng loại tinh khiết phân tích.

Tinh thể không màu, dễ tan trong nước

Calci clorid

CaCl₂.2H₂O = 147,0

Dùng loại tinh khiết phân tích

Tinh thể không màu dễ tan trong nước

Kali iodide

KI = 166,01

Dùng loại tinh khiết phân tích

Tinh thể không màu hay bột kết tinh trắng.

Dễ tan trong nước, tan được trong ethanol

Kali pemanganat

KMnO₄ = 158,04

Dùng loại tinh khiết phân tích

Tinh thể màu tím sẫm. Tan trong nước.

Các dung dịch KMnO₄ cần bảo quản trong chai thủy tinh tối màu nút mài, tránh ánh sáng.

Magnesi sulfat

MgSO₄.7H₂O = 246,8

Dùng loại tinh khiết phân tích

Natri hydroxyd

NaOH = 40

Dùng loại tinh khiết phân tích, có chứa hàm lượng kiềm toàn phần không nhỏ hơn 97% tính theo NaOH và không được có quá 2,0% Na₂CO₃

Cục trắng hay thoi hình trụ, dễ hút ẩm

Bảo quản trong đồ đựng kín.

Nước không có carbon dioxyd

Đun sôi một lượng nước cần thiết trong 10 phút rồi làm nguội đến 20°C, tránh sự thâm nhập của carbon dioxyd từ không khí. Nước không có carbon dioxyd phải đáp ứng yêu cầu sau: thêm vào 10ml nước 1 giọt dung dịch phenol phtalein (CT) và 0,05ml dung dịch kali hydroxyd 0,01N, hỗn hợp phải có màu hồng bền vững trong ít nhất 120 giây.

Phèn sắt amoni

Sắt (III) amoni sulfat

FeNH₄(SO₄)₂. 12H₂O = 482,2.

Tinh thể tím nhạt, lên hoa ngoài không khí. Tan trong 0,8 phần nước, không tan trong ethanol. Dung dịch nước có phản ứng acid. Cho màu đỏ thẫm với dung dịch sulfocyanid.

Sắt (III) clorid

$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O} = 270,30$

Dùng loại tinh khiết phân tích

Khối kết tinh màu vàng nâu hay vàng cam, dễ chảy nước. Rất dễ tan trong nước, tan trong ethanol và ether

Bảo quan trong đồ đựng kín.

Dung dịch sắt (III) clorid x%

Hòa tan xg sắt (III) clorid (TT) trong nước vừa đủ 100ml.

Thuốc thử Nessler

Hòa tan 10g kali iodide (TT) trong 10 ml nước và thêm từng ít một, vừa thêm vừa khuấy đều, dung dịch bão hòa thủy ngân diclorid (TT) cho tới khi xuất hiện tủa đỏ bền. thêm 30g kali hydroxyd (TT), sau khi tan hết lại thêm 1ml dung dịch bão hòa thủy ngân diclorid. Pha loãng với nước vừa đủ 200ml. Để yên và gạn lấy phần nước trong.

Cho 3 giọt thuốc thử Nessler vào 10ml dung dịch amoni mẫu 2 phần triệu NH_4 , màu vàng cam phải xuất hiện ngay tức khắc.

Bảo quản trong lọ thủy tinh màu da cam có nút mài, tránh ánh sáng.

Trilon B

Dinatri dihydro ethylendiamin tetra acetate, natri acetate

$\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{Na}_2\text{O}_8 \cdot 2\text{H}_2\text{O} = 372,24$

Muối dinatri của acid ethylendiamintetra acetate

Dùng loại tinh khiết phân tích.

Bột kết tinh trắng, tan tốt trong nước, không tan trong các dung môi hữu cơ, thông thường. Hóa chất không hút ẩm, bền vững ở thể khô cũng như trong dung dịch.

CÁC CHẤT CHỈ THỊ

Da cam methyl

Helianthin

Bột kết tinh màu da cam, đôi khi có ánh nâu. Khó tan trong nước, dễ tan trong nước nóng, không tan trong ethanol.

Vùng chuyển màu: pH 3,0 (đỏ) đến 4,4 (vàng)

Đen eriocrom T

Mordant black 11

Bột màu đen hơi nâu có óng ánh kim loại, ít tan trong nước lạnh. Tan trong ethanol và methanol. Trong môi trường kiềm (pH = 9,5- 10,0) dung dịch đen eriocromT có màu xanh, còn phức chất của chỉ thị với ion calci, magnesi, kẽm trong điều kiện đó có màu tím đỏ. Khi chuẩn độ những cation trên bằng trion B với chỉ thị này, màu chuyển từ đỏ sang xanh.

Đỏ methyl

Tinh thể óng ánh hay bột kết tinh màu nâu. Gần như không tan trong nước, khó tan trong ethanol, tan trong các dung dịch kiềm và carbonat kiềm.

Vùng chuyển màu pH = 6,8 (vàng) đến 8,4 (đỏ)

Kali cromat

$K_2CrO_4 = 194,20$

Tinh thể màu vàng, dễ tan trong nước, không tan trong ethanol. Trong môi trường trung tính, tác dụng với bạc nitrat cho tủa đỏ.

Phenol phtalein

Bột kết tinh trắng hay vàng nhạt. Không tan trong nước, tan trong ethanol.

Vùng chuyển màu pH = 8,2(không màu) đến 10,0 (đỏ)

PHỤ LỤC

1. Thuốc mỡ

Định nghĩa

Thuốc mỡ là thuốc có thể chất mềm, dùng để bôi lên da hay niêm mạc nhằm bảo vệ da hoặc đưa thuốc thấm qua da. Bột nhão bôi da là loại thuốc mỡ có chứa một tỷ lệ lớn các dược chất rắn không tan.

Thành phần của thuốc mỡ gồm một hay nhiều hoạt chất, được hòa tan hay phân tán đồng đều trong một tá dược hay một hỗn hợp tá dược. Tùy cách phối hợp hoặc sử dụng tá dược, mỡ được chia thành 3 loại: Mỡ không thân nước, mỡ thân nước và mỡ nhũ tương hóa nước. Mỡ nhũ tương hóa nước được coi là kem.

Kem bôi da có thể chất mềm và mịn màng do sử dụng các tá dược nhũ tương Dầu/nước hoặc Nước/dầu.

Thuốc mỡ phải đạt các yêu cầu sau:

Thuốc mỡ phải mịn, đồng nhất, không được có mùi lạ, không biến màu, không cứng lại hoặc tách lớp ở điều kiện thường, không được chảy lỏng ở nhiệt độ 37°C và phải bắt dính được trên da hay niêm mạc khi bôi.

Cách kiểm tra đánh giá sự đồng nhất của thuốc mỡ.

Lấy 4 đơn vị đóng gói, mỗi đơn vị khoảng 0,02-0,03g, trải chế phẩm lên 4 tiêu bản, bên trên đặt một phiến kính. Đặt mỗi phiến kính bằng một phiến kính thứ 2 và ép mạnh cho đến khi tạo thành một vết có đường kính khoảng 2cm. Quan sát vết thu được bằng mắt thường (cách mắt khoảng 30cm), ở 3 trong 4 tiêu bản không được nhận thấy có các tiểu phân. Nếu có các tiểu phân nhìn thấy 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

Độ đồng đều khối lượng

Cân từng đơn vị trong số 5 đơn vị đóng gói nhỏ nhất được lấy bất kỳ. Tất cả các đơn vị phải đạt qui định trong bảng cho dưới đây. Nếu có một đơn vị có khối lượng lệch ra ngoài qui định này thì phải thử ra với 5 đơn vị khác, nếu lần thử lại có quá 1 đơn vị không đạt thì lô thuốc không đạt yêu cầu.

Đối với các chế phẩm đóng gói trong hộp hoặc lọ thì sau khi cân cả vỏ thuốc phải bỏ hết thuốc ra, dùng bông lau sạch thuốc, cân vỏ rồi tính theo lượng thuốc trong từng hộp hoặc lọ.

Thuốc mỡ	Khối lượng ghi trên nhãn (KLN)	% chênh lệch so với KLN
	Dưới 10g	15
	10-20g	10
	Trên 20-50g	8
	Trên 50g	5

Thuốc mỡ tra mắt

Phải được xếp vào các chế phẩm vô khuẩn vì vậy qui trình pha chế, sản xuất phải đảm bảo điều kiện vô khuẩn. Hỗn hợp tá dược được đun nóng chảy, lọc và tiệt trùng ở 150°C trong 1 giờ. Thuốc mỡ tra mắt phải vô khuẩn và không được phát hiện thấy có *Staphylococcus aureus* và *Pseudomonas aeruginosa* trong thành phẩm cuối cùng.

Ngoài yêu cầu thuốc mỡ nói chung, thuốc mỡ tra mắt phải đạt các yêu cầu sau đây:

Các phần tử kim loại:

Số lượng các phần tử kim loại nằm trong giới hạn cho phép: Lấy 10g ống thuốc, bóp hết thuốc chứa bên trong vào từng đĩa petri riêng có đường kính 6cm, đáy bằng, không có các vết xước và các phần tử lạ nhìn thấy được. Đặt 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 50µm 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 phần tử 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.

Giới hạn kích thước các phần tử: Trải một lượng nhỏ chế phẩm thành một lớp mỏng trên bản soi của kính hiển vi, phủ phiến kính lên trên và soi. Không được có phần tử nào của thuốc có kích thước lớn hơn 75 µm.

2. Thuốc nang

Yêu cầu chất lượng chung:

Độ đồng đều hàm lượng (phụ lục 8.2)

Nếu như không có chỉ dẫn khác, yêu cầu này áp dụng cho các thuốc nang có chứa một hay nhiều hoạt chất trong đó có các hoạt chất có hàm lượng nhỏ hơn 2mg hay nhỏ hơn 2% (kl/kl) so với khối lượng thuốc trong nang. Yêu cầu này không áp dụng với các thuốc có chứa nhiều Vitamin và các nguyên tố vi lượng.

Độ đồng đều khối lượng (Phụ lục 8.3)

Nếu phép thử độ đồng đều hàm lượng đã được tiến hành với tất cả các hoạt chất có trong nang thì không cần phải thử độ đồng đều khối lượng.

Thuốc nang cứng:

Ngoài các yêu cầu trên còn có thêm yêu cầu về độ rã (phụ lục 8.6)

Nếu không có chỉ dẫn khác, dùng nước làm chất lỏng, thời gian rã phải trong vòng 30 phút.

3. Thuốc nhỏ mắt.

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.

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.

pH

pH phải nằm trong giới hạn quy định

Đo bằng máy đo pH - Phụ lục 5.9 - ĐĐVN III.

Độ vô khuẩn

Thuốc nhỏ mắt phải vô khuẩn

Cách thử: Nếu không có quy định riêng thì tiến hành thử và đánh giá theo "Thử vô trùng" phụ lục 10.8

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 μ g pha rắn.

Kết quả:

- Không được có quá 20 tiểu phân có kích thước lớn hơn 25 μ m.
- Không được có quá 2 tiểu phân có kích thước lớn hơn 50 μ m.
- Không được có tiểu phân nào có kích thước lớn hơn 90 μ m.

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.

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.

4. Thuốc tiêm, thuốc tiêm truyền.

Độ trong

Dung dịch để tiêm khi kiểm tra bằng mắt thường ở điều kiện quy định phải trong và hầu như không có tạp cơ học. Theo phụ lục 8.9, mục B - DĐVN 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 B - DĐVN 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 - DĐVN III.

Nhũ tương phải không thấy dấu hiệu của sự tách hợp

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.

Màu sắc

Không màu hoặc có màu do hoạt chất tùy theo từng chuyên luận. Tiến hành so sánh với màu mẫu - Phụ lục 5.17 - DĐVN III.

pH

pH phải nằm trong giới hạn quy định

Tiến hành đo pH bằng máy đo pH - Phụ lục 5.9 - DĐVN III.

Độ vô khuẩn

Thuốc tiêm phải vô khuẩn phụ lục 10.8

Nội độc tố vi khuẩn

Phép thử nội độc tố vi khuẩn thực hiện khi có yêu cầu được quy định trong chuyên luận riêng. Thử theo Phụ lục 10.3 - DĐVN III.

Khi đã thử nội độc tố vi khuẩn thì không phải thử chất gây sốt, trừ khi có quy định khác.

Chất gây sốt

Thuốc tiêm phải không có chất gây sốt. Thử theo Phụ lục 10.5 - DĐVN III. Phép thử này được tiến hành đối với:

- Thuốc tiêm đóng liều đơn lẻ có thể tích từ 15ml trở lên và không có quy định phép thử nội độc tố.

- Thuốc tiêm đóng liều đơn lẻ có thể tích nhỏ hơn 15ml nhưng trên nhãn có ghi "không có chất gây sốt" và không có quy định phép thử nội độc tố.

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 5ml:

+ 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 5ml, 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 5ml.

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 quy định được lấy ra.

Thể tích của chế phẩm phải nằm trong giới hạn cho phép theo **bảng dưới đây**.

Thể tích ghi trên nhãn (ml)	Phần trăm chênh lệch
Tới 5ml	+ 15
Từ 5ml tới 50ml	+ 10
Trên 50ml	+ 5

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 quy định trong tiêu chuẩn, hàm lượng của từng hoạt chất trong chế phẩm phải nằm trong giới hạn cho phép theo bảng dưới đây.

Lượng ghi trên nhãn	Phần trăm chênh lệch
Dạng dung dịch	± 5
Dạng bột	± 10

5. Thuốc viên nén

Các yêu cầu.

Độ rã : phụ lục 8.6.

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

Bảng Giới hạn cho phép chênh lệch khối lượng đối với viên nén

Khối lượng trung bình viên	Phần trăm chênh lệch
Tới 80mg	±10
Trên 80mg đến 250mg	±7,5
Trên 250mg	±5

Nếu có yêu cầu thử độ đồng đều hàm lượng thì không phải thử độ đồng đều khối lượng.

Độ đồng đều hàm lượng: xem phụ lục 8.2.

Trừ các chỉ dẫn khác, viên nén có hàm lượng hoạt chất dưới 2mg hoặc dưới 2% (kl/kl) thì phải thử độ đồng đều về hàm lượng.

Cách thử: Lấy 10 viên 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 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.

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.

Độ hòa tan: phụ lục 8.4

5.1. Xem phần phương pháp quang phổ hấp thụ tử ngoại khả biến (SGK)

5.2. Xem phần phương pháp quang phổ hồng ngoại (SGK)

5.3. Xem phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao (SGK).

5.4. Xem phần Sắc ký lớp mỏng (SGK)

5.5. Xác định chỉ số pH

Hiệu chuẩn máy: Xem thêm ĐĐVN III- PL92

Phương pháp đo.

Nhúng sâu các điện cực vào trong dung dịch cần khảo sát và đo trị số pH ở chính nhiệt độ đo của các dung dịch đệm chuẩn khi hiệu chuẩn máy. Sau cùng đo lại trị số pH của dung dịch đệm chuẩn dùng để hiệu chuẩn máy và điện cực. Nếu sự khác nhau giữa lần đọc này và trị số gốc của dung dịch đệm chuẩn ấy lớn hơn 0,05 thì các phép đo phải làm lại.

Khi đo các dung dịch có pH trên 10 phải đảm bảo rằng điện cực thủy tinh đang dùng là phù hợp, chịu được các điều kiện kiềm và cần áp dụng các hệ số điều chỉnh trong phép đo.

Tất cả các dung dịch và các dịch treo của chế phẩm khảo sát và các dung dịch đệm chuẩn phải được pha lẫn với nước không có lẫn Carbon dioxyd

Các dung dịch đệm chuẩn: Xem thêm ĐĐVN III- PL92

5.6. Xác định độ trong của dung dịch

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

Pha dung dịch mẫu.

Chuẩn đục: Hòa tan 1,0g Hydrazin sulfat trong nước vừa đủ 100ml và để yên trong 4-6h. Thêm 25 ml dung dịch thu được vào một dung dịch chứa 2,5g hexamin trong 25ml nước, lắc kỹ và để yên trong 24h.

Nếu được bảo quản trong lọ thủy tinh tốt, không có khuyết tật ở bề mặt thì hỗn dịch thu được bền vững trong vòng 2 tháng.

Hỗn dịch này phải không được bám dính vào thủy tinh và phải được lắc kỹ trước khi dùng.

Để có chuẩn đục, pha loãng 15ml dung dịch trên tới 1000 ml với nước. Chuẩn đục này chỉ sử dụng trong vòng 24h.

Hỗn dịch chuẩn đối chiếu.

Các hỗn dịch chuẩn đối chiếu từ I tới IV được chuẩn bị như dung dịch trong bảng.

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

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

Cách thử:

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

Cách đánh giá kết quả:

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

5.7. Xác định mất khối lượng do làm khô.

Mất khối lượng do làm khô là sự giảm khối lượng của mẫu thử biểu hiện bằng phần trăm (kl/kl) khi được làm khô trong điều kiện xác định ở mỗi chuyên luận. Sự giảm khối lượng thu được sau khi làm khô biểu thị sự mất đi lượng nước hút ẩm, một phần nước được kết tinh và lượng chất dễ bay hơi khác trong mẫu thử.

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

Phương pháp 1: Sấy trong tủ sấy ở áp suất thường.

Phương pháp 2: Sấy ở áp suất giảm.

Phương pháp 3: Làm khô trong bình hút ẩm với những chất hút ẩm mạnh như acid Sulfuric đậm đặc, Calci clorid khan, silicagel v.v..

Với mỗi phương pháp, các điều kiện tiến hành cụ thể được qui định riêng trong mẫu thử. Nếu chuyên luận ghi:

“Không quá 1% (1g, 105°C, 4 giờ)” có nghĩa là dùng phương pháp 1, một gam mẫu thử đem sấy trong tủ sấy ở áp suất thường trong thời gian 4 giờ, khối lượng giảm đi không quá 10 mg.

“Không quá 0,5% (1g, 105°C, phosphor pentoxyd 24 giờ)” có nghĩa là dùng phương pháp 2: một gam mẫu thử đem sấy 24 giờ trong dụng cụ sấy ở áp suất giảm (2kPa) có chất hút ẩm Phosphor pentoxyd, khối lượng giảm đi không quá 5mg.

“Không quá 0,2% (1g, Silicagel, 4 giờ)” có nghĩa là dùng phương pháp 2: một giam mẫu thử đem sấy 24 giờ trong dụng cụ sấy ở áp suất giảm (2kPa) có chất hút ẩm silicagel, khối lượng giảm đi không quá 2mg.

Nêu chuyên luận không qui định thời gian làm khô có nghĩa là phải làm khô đến khối lượng không đổi, tức là sự chênh lệch khối lượng sau khi sấy thêm 1 giờ trong tủ sấy hoặc 6 giờ trong bình hút ẩm so với lần sấy trước đó không quá 0,5mg.

Cách tiến hành:

Dùng hộp lồng thủy tinh hoặc chén cân có nắp mài làm bì đựng mẫu thử, làm khô bì trong thời gian 30 phút theo phương pháp và điều kiện qui định trong chuyên luận rồi cân để xác định khối lượng bì. Cân ngay vào bì này một lượng chính xác mẫu thử bằng khối lượng qui định trong chuyên luận với sai số $\pm 10\%$. Nếu không có chỉ dẫn gì đặc biệt thì lượng mẫu thử được dàn mỏng thành lớp có độ dày không quá 5mm. Nếu mẫu thử có kích thước lớn thì nghiền nhanh tới kích thước dưới 2mm trước khi cân. Tiến hành làm khô trong điều kiện qui định của chuyên luận và trong cùng một dụng cụ đã làm khô bì. Nếu dùng phương pháp sấy thì nhiệt độ cho chép chỉ chênh lệch $\pm 2^{\circ}\text{C}$ so với nhiệt độ qui định. Sau khi sấy phải làm nguội tới nhiệt độ phòng cân trong bình hút ẩm có Silicagel rồi cân ngay.

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

Nếu mẫu thử ở dạng viên nang hoặc viên bao thì phải bỏ vỏ và nghiền tới kích thước dưới 2mm rồi lấy một lượng bột viên tương đương không ít hơn 4 viên đem thử.

Nếu mẫu thử là dược liệu, khi chuyên luận riêng không có chỉ dẫn gì là đặc biệt thì tiến hành theo phương pháp 1. Dược liệu phải được làm thành mảnh nhỏ đường kính không quá 3 mm, lượng đem thử là 5 mm và không quá 10 mm đối với dược liệu có cấu tạo xốp. Nhiệt độ và thời gian sấy theo yêu cầu của chuyên luận riêng.

5.8. Xác định màu sắc của dung dịch .

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

Phương pháp 2:

Dùng ống thủy tinh trung tính, không màu, trong suốt, giống hệt nhau, có đường kính trong từ 15-25 mm để so sánh lớp dung dịch thử có bề dày 40 mm với lớp chất lỏng có bề dày 40 mm của nước cất, hoặc dung môi, hoặc dung dịch màu chuẩn (bảng 2a tới 2e) theo chỉ dẫn trong chuyên luận. Quan sát dung dịch dọc theo trục ống trong ánh sáng khuếch tán trên nền trắng.

Cách pha chế dung dịch màu chuẩn: Xem PL-99 ĐĐVN III.

5.9. Xác định nhiệt độ nóng chảy. Xem PL-100 ĐĐVN III

6. Định lượng các họ kháng sinh họ Penicilin bằng phương pháp đo iod.

Tiến hành thí nghiệm ở nhiệt độ $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$.

Dung dịch chuẩn: Cân chính xác một lượng thích hợp chất chuẩn qui định trong từng chuyên luận về mới được làm khô trong những điều kiện cụ thể của từng chuyên luận, hòa tan vào dung môi đã được ghi vào bảng 1 và pha loãng với dung môi đó để được dung dịch có nồng độ ở khoảng nồng độ qui định trong bảng một.

Dung dịch thử: Nếu không có chỉ định gì khác trong chuyên luận riêng, cân chính xác một lượng mẫu thử thích hợp hòa tan trong dung môi ghi trong bảng 1 và pha loãng với dung môi đó để được một dung dịch có nồng độ ghi trong bảng 1.

Phương pháp tiến hành.

Làm mất hoạt tính và chuẩn độ: Hút 2 ml dung dịch chuẩn cho vào một bình nón có nút mài và 2ml dung dịch thử cho một bình nón nút mài khác, thêm vào mỗi bình 2ml dung dịch Natri hydroxyd 1N, lắc đều và để yên 15 phút. Tiếp theo cho vào mỗi bình 2,4 ml dung dịch acid Hydrocloric 1N, thêm 10 ml dung dịch iod 0,01N. Đậy ngay bình và để yên 15 phút. Chuẩn độ bằng dung dịch Natri thiosulfat 0,01N đến gần điểm kết thúc, thêm 1 giọt dung dịch hồ tinh bột (CT) và tiếp tục chuẩn độ đến màu xanh.

Mẫu trắng:

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

Tính toán

Tính số microgam (hay đơn vị) kháng sinh chuẩn tương đương (F) với mỗi ml dung dịch Natri thiosulfat 0,01N bằng công thức:

$$2 \cdot C \cdot P / (B - I).$$

Trong đó:

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

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

B là thể tích tính bằng ml của dung dịch Natri thiosulfat 0,01N tiêu thụ trong mẫu trắng của dung dịch chuẩn.

I là thể tích tính bằng ml của dung dịch Natri thiosulfat 0,01N tiêu thụ trong phép thử làm mất hoạt tính và chuẩn độ của dung dịch chuẩn.

Tính hàm lượng của mẫu thử bằng công thức được cho trong từng chuyên luận.

Chất kháng sinh	Dung môi	Nồng độ cuối cùng
Amoxicilin	Nước	1 mg/1ml
Ampicilin	Nước	1,25mg/1ml

7. Phương pháp chuẩn độ Complexon

Magnesi.

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

1ml dung dịch trilon B 0,1 M tương đương với 2,431 mg Mg.

7.1. Các phản ứng định tính.

Alkaloid

Hòa tan vài mg chế phẩm hoặc một lượng chế phẩm theo chỉ dẫn trong chuyên luận trong 5ml nước, thêm dung dịch acid Hydrocloric 2M đến khi có phản ứng acid, thêm 1 ml dung dịch thuốc thử Dragendroff, xuất hiện tủa màu cam hay đỏ cam.

Carbonat và Hydrocarbonat.

A. Cho vào ống nghiệm khoảng 0,1g chế phẩm, thêm 2 ml nước, hoặc lấy 2 ml dung dịch chế phẩm đã được chỉ dẫn trong chuyên luận. Thêm 2ml dung dịch acid acetic 2M. Đậy ngay nút đã lắp sẵn một ống thủy tinh nhỏ uốn góc.

Đun nhẹ ống nghiệm, khí thoát ra được dẫn vào một ống nghiệm khác có chứa sẵn 5 ml dung dịch calci clorid sao cho đầu ống thủy tinh nhỏ phải ngập ngay trong dung dịch này, sẽ cho tủa trắng, tủa này tan trong acid hydrocloric quá thừa.

B. Cho vào ống nghiệm khoảng 0,1g chế phẩm, thêm 2ml nước, hoặc lấy 2ml dung dịch chế phẩm đã được chỉ dẫn trong chuyên luận. Thêm 2 ml dung dịch Magnesi sulfat, sẽ cho tủa trắng nếu là carbonat, không tạo tủa nếu là hydrocarbonat, nhưng khi đun sôi cũng sẽ cho tủa trắng.

Clorid.

A. Hòa tan một lượng chế phẩm tương ứng với 2mg ion clorid trong 2ml nước hoặc dùng 2mk dung dịch theo chỉ dẫn trong chuyên luận. Acid hóa bằng dung dịch acid nitric 2M (TT), thêm 0,4 ml dung dịch bạc nitrat 2% (TT). Lắc và để yên sẽ tạo tủa trắng lớn nhỏ. Lọc lấy tủa, rửa tủa 3 lần, mỗi lần với 1ml nước, hòa tủa trong 2ml nước và thêm 1,5ml dung dịch amoniac 10M, tủa tan ra dễ dàng.

B. Cho vào ống nghiệm một lượng chế phẩm tương ứng khoảng từ 10-50 mg ion clorid hay một lượng theo chỉ dẫn trong chuyên luận. Thêm 1ml Kali permanganat 5% và 1 ml acid sulfuric, đun nóng sẽ giải phóng ra khí Clor có mùi đặc biệt, khí này làm xanh giấy tẩm hồ tinh bột có Kali iodid (CT) đã thấm nước

Magnesi.

Hòa tan khoảng 15mg chế phẩm trong 2ml nước, hoặc lấy 2ml dung dịch theo chỉ dẫn trong chuyên luận. Thêm 1ml dung dịch amoniac 6M (TT), tạo thành tủa trắng, tủa này tan khi thêm 1ml dung dịch di natri hydrophosphat (TT), sẽ có tủa kết tinh trắng.

Natri.

a. Dùng một dây bạch kim hay đũa thủy tinh, lấy một hạt chất thử hay một giọt chế phẩm, đưa vào ngọn lửa không màu, ngọn lửa sẽ nhuộm thành màu vàng.

b. Hòa tan khoảng 50mg chế phẩm trong 2ml nước, hoặc lấy 2ml dung dịch theo chỉ dẫn trong chuyên luận. Acid hóa dung dịch bằng Acid acetic loãng (TT), thêm 1ml dung dịch Magnesi uranyl acetat (TT), cọ thành ống nghiệm bằng dung dịch thủy tinh nếu cần, sẽ có kết tinh màu vàng.

Phosphat.

a. Hòa tan khoảng 50 mg chế phẩm trong 3ml nước, hoặc dùng 3 ml dung dịch theo chỉ dẫn trong chuyên luận. Acid hóa dung dịch bằng acid nitric loãng (TT), thêm 2ml dung dịch amoni molybdat (TT) sẽ hiện tủa màu vàng.

b. Hòa tan khoảng 0,1g chế phẩm trong 2ml nước, hoặc dùng 2ml dung dịch theo chỉ dẫn trong chuyên luận. Trung tính hóa dung dịch bằng acid nitric loãng (TT) hoặc dung dịch Natri hydroxyd (TT). Thêm 1ml dung dịch bạc Nitrat 45 (TT) sẽ tạo tủa vàng, màu của tủa không thay đổi khi đun sôi, tủa tan khi thêm dung dịch amoniac 10 M(TT)

Sulfat.

a. Hòa tan 45mg chế phẩm trong 5 ml nước, hoặc dùng 5ml dung dịch theo chỉ dẫn trong chuyên luận, thêm 1ml dung dịch acid hydrocloric 2M (TT) và 1ml dung dịch Bari clorid 5% (TT), sẽ có tủa trắng được tạo thành.

b. Thêm 0,1ml dung dịch iod 0,1N vào hỗn dịch thu được ở phản ứng trên, hỗn dịch có màu vàng (phân biệt với sulfit và dithionit) nhưng mất màu khi thêm từng

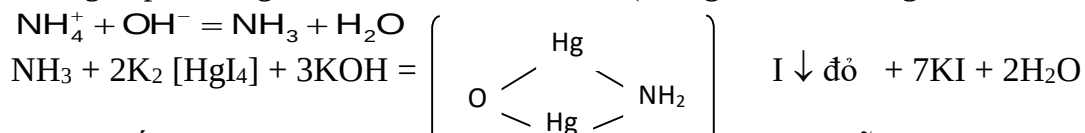
giọt dung dịch thiếc (II) clorid (TT) phân biệt với iodat. Đun sôi hỗn hợp, không được tạo thành tuả có màu, phân biệt với selenat và tungstat.

7.1.1. Amoni.

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

Phương pháp A:

Nguyên tắc: Thuốc thử Nesler (TT) là dung dịch kiềm của Kaliiodomercurat $K_2[HgI_4]$ phản ứng với NH_3 cho tuả màu đỏ (lượng nhỏ cho dung dịch màu vàng):



Tiến hành: Hòa tan một lượng các phẩm thử như chỉ dẫn trong chuyên luận với 14ml nước trong một ống nghiệm, kiềm hóa nếu cần bằng dung dịch NaOH 2M (TT), thêm nước cho đủ 15ml. Thêm 0.3ml dung dịch thuốc thử Nessler (TT), lắc đều rồi để yên 5 phút. So sánh màu tạo thành trong ống thử với màu mẫu được chuẩn bị đồng thời. Khi so màu, quan sát dọc theo trục ống trong ánh sáng khuếch tán trên nền trắng. Màu trong ống thử không được đậm hơn ống mẫu.

Màu mẫu: Lấy chính xác 10ml dung dịch amoni mẫu 1 phần triệu NH_4 cho vào ống nghiệm, pha loãng với nước thành 15ml. Thêm 0.3ml thuốc thử Nessler (TT), lắc đều rồi để yên 5 phút.

Phương pháp B:

Cho một lượng theo chỉ dẫn chế phẩm đã nghiền mịn vào một bình 25ml có nút đáy bằng polyetylen và hòa tan hoặc phân tán trong 1ml nước. Thêm 0.3g Magnesi oxyd nặng. Đậy bình ngay sau khi đã đặt xuống dưới nắp polyetylen một mẫu giấy tẩm mangan bạc rộng 5mm đã được làm ẩm bằng vài giọt nước. Lắc xoay trong bình, tránh chất lỏng bắn lên và để yên ở 40°C trong 30 phút.

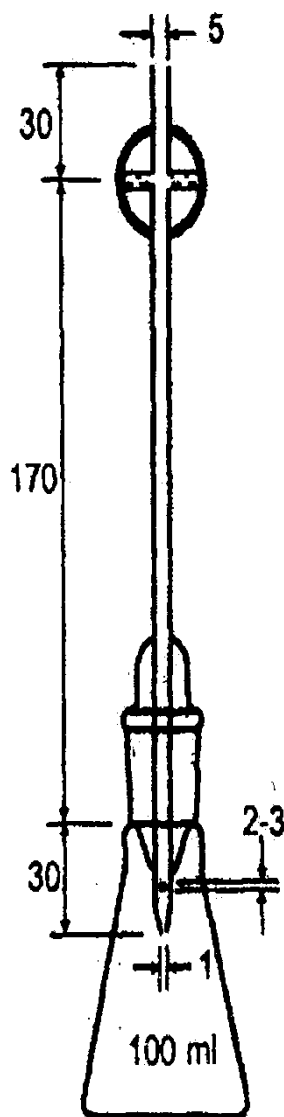
Màu xám nếu xuất hiện trên mẫu giấy tẩm mangan bạc ở bình thử không được đậm hơn ở bình mẫu được tiến hành đồng thời trong cùng điều kiện với lượng dung dịch amoni mẫu đã được chỉ dẫn trong chuyên luận, 1ml nước và 0.3g magnesi oxyd nặng (TT).

7.1.2. Arsenit.

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

Phương pháp A:

Nguyên tắc: Các hợp chất của Arsen phản ứng với Hydro mới sinh (do phản ứng của Kẽm với acid) tạo thành AsH_3 ở dạng khí. Khí này bay lên gặp giấy tẩm muối thủy ngân II, cho các phản ứng màu từ vàng đến đỏ nâu: $AsH_2(HgCl)$; $AsH(HgCl)_2$; $As(HgCl)_3$, As_2Hg_3



Dụng cụ :

Bộ dụng cụ thử Arsen gồm một bình nén nút mài cỡ 100ml được đậy bằng nút thủy tinh mài, xuyên qua nút có một ống thủy tinh dài khoảng 200mm, đường kính trong là 5 mm. Phần dưới của ống thủy tinh được kéo nhỏ lại để có đường kính trong là 1mm. Cách đầu ống 15mm có một lỗ trên thành ống với đường kính 2-3mm.

Khi gắn ống thủy tinh này vào nút thì lỗ này phải cắt mặt dưới của nút ít nhất là 3mm. Đầu trên của ống thủy tinh có một đĩa tròn phẳng, mặt phẳng đĩa vuông góc với trục ống.

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

Tiến hành:

Cho vào ống thủy tinh khoảng 50-60 mg bột tấm chì acetat. Đặt một miếng giấy thấm thủy ngân (II) bromid, hình tròn hay hình vuông, có kích thước đủ để phủ kín lỗ tròn giữa 2 ống thủy tinh, giữ chặt 2 ống thủy tinh bằng 2 dây lò xo.

Cho vào bình nón một lượng chế phẩm thử theo chỉ dẫn của chuyên luận. Hòa tan hoặc pha loãng với nước thành 25ml. Thêm 15ml dung dịch HCl, 0.1ml dung dịch Thiếc (II) Clorid và 5ml dung dịch Kali iodid 20%. Để yên trong 15 phút rồi thêm 5g

kẽm hạt không có Arsen. Đây ngay bình nón bằng nút đã lắp sẵn giấy thử ở trên. Ngâm bình trong nước ở nhiệt độ ở nhiệt độ sao cho khí được giải phóng đều đặn.

Song song tiến hành một mẫu so sánh trong cùng điều kiện, dùng 1ml dung dịch arsen mẫu chỉ 1 phần triệu hòa loãng với nước thành 25ml thay co chế phẩm thử.

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

Dung dịch mẫu Arsen:

Hòa tan 0.33g Arsen trioxyd trong 5 ml dung dịch natri 2M và thêm nước vừa đủ 250ml, được dung dịch mẫu arsen 1000 phần triệu.

Pha loãng 1 thể tích dung dịch mẫu arsen 1000 phần triệu thành 10 thể tích với nước được dung dịch arsen 10 phần triệu. Dung dịch pha ngay trước khi sử dụng.

Pha loãng 1 thể tích dung dịch mẫu Arsen 10 phần triệu thành 10 thể tích với nước được dung dịch mẫu Arsen 1 phần triệu. Dung dịch này pha ngay trước khi sử dụng.

7.1.3. Calci.

Thêm 1ml dung dịch amoni oxalat 4% (TT) vào 0.2ml dung dịch Calci mẫu 100 phần triệu trong ethanol 96%. Sau 1 phút, thêm một hỗn hợp gồm 1ml dung dịch acid acetic 2M (TT) và 15ml dung dịch chế phẩm thử như chỉ dẫn trong chuyên luận và lắc.

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

Độ đục trong ống thử phải không đậm hơn độ đục chuẩn.

7.1.5. Clorid.

Nguyên tắc: Dung dịch chứa ion Cl^- cho phản ứng với dung dịch muối bạc cho muối AgCl kết tủa (nếu nồng độ Cl^- loãng thì cho dung dịch đục mờ), so sánh độ đục với dung dịch mẫu ion Cl^-



Tủa không tan trong acid nitric nhưng tan trong dung dịch Amoniac.

Tiến hành: Chuẩn bị dung dịch thử như trong chuyên luận, cho vào một ống nghiệm, pha loãng với nước đến 15ml. Thêm 1ml dung dịch acid Nitric 2M và 1ml dung dịch Bạc Nitrat 2%. Để yên 5 phút, tránh ánh sáng. So sánh độ đục tạo thành trong ống thử với độ đục chuẩn được so sánh đồng thời, quan sát dọc theo trục ống nghiệm trong ánh sáng khuếch tán trên nền đen. Độ đục trong ống thử không được lớn hơn độ đục chuẩn.

Độ đục chuẩn: Chuẩn bị cùng điều kiện ống thử nhưng thay dung dịch bằng hỗn hợp 10ml dung dịch Clorid mẫu 5 phần triệu và 5ml nước.

Dung dịch mẫu Clorid: Cân chính xác 0.0824g Natri clorid (thuốc thử) đã sấy khô ở 100- 105°C đến khối lượng không đổi, cho vào bình định mức 100ml, hòa tan với nước và thêm nước tới vạch, lắc đều được dung dịch mẫu 500 phần triệu.

Pha loãng dung dịch với nước được dung dịch clorid mẫu 5 phần triệu. Dung dịch pha ngay trước khi sử dụng.

7.1.6. Kim loại nặng.

Nguyên tắc: Ion kim loại nặng (đại diện là chì), phản ứng với Ion Sulfur cho kết tủa (hoặc dung dịch) màu đen (PbS). Thuốc thử có thể dùng là Na_2S (H_2S) hoặc thioacetamid.

So sánh màu với một dung dịch chì mẫu với cùng điều kiện phản ứng.

Tiến hành:

Dùng một trong các phương pháp sau đây, tùy theo chỉ dẫn của chuyên luận riêng.

Phương pháp 1:

Lấy 12ml dung dịch chế phẩm thử được pha chế như trong chỉ dẫn của chuyên luận, cho vào ống nghiệm, thêm 2ml dung dịch đệm Acetat pH 3.5. Lắc đều, thêm 1,2ml dung dịch thioacetamid, lắc ngay rồi để yên 2 phút. Chuẩn bị đồng thời ống mẫu dùng hỗn hợp 10ml dung dịch ion chì mẫu 1 phần triệu Pb hoặc dung dịch chì mẫu 2 phần triệu Pb tùy theo chỉ dẫn trong chuyên luận và 2ml dung dịch chế phẩm thử. So sánh màu tạo thành trong ống thử với và ống chuẩn. Màu nâu trong ống thử không được đậm hơn màu nâu trong ống chuẩn. Ống chuẩn có màu nâu nhạt khi được so sánh với ống trắng được chuẩn bị đồng thời trong cùng điều kiện, dùng 10ml nước và 2ml dung dịch chế phẩm thử.

Phương pháp 2: Hòa tan một lượng chế phẩm thử như chỉ dẫn trong chuyên luận trong một dung môi hữu cơ khi có chứa một tỷ lệ nước tối thiểu như 1,4-dioxan hoặc acetone có chứa 15% nước. Thực hiện như phương pháp 1, nhưng chuẩn bị dung dịch ion chì mẫu bằng cách pha loãng dung dịch chì mẫu 100 phần triệu Pb với dung môi được dùng để pha chế phẩm thử thành các dung dịch mẫu chì 1 phần triệu Pb hoặc 2 phần triệu Pb tùy theo chỉ dẫn trong chuyên luận.

Phương pháp 3: Dùng một bộ màng lọc lắp với một kim tiêm cỡ 50ml. Màng lọc được làm từ một chất liệu thích hợp có đường kính lỗ là 3 Micromet và được bảo vệ bởi màng lọc phụ bằng sợi thủy tinh borosilicat.

Hòa tan một lượng chế phẩm thử như chỉ dẫn trong chuyên luận trong 30ml nước, nếu không có qui định nào khác. Lọc dung dịch qua một màng lọc nhờ một áp lực nhẹ.

Tháo bộ giữ màng lọc và kiểm tra màng lọc xem có bị nhiễm bẩn không, nếu cần thì thay màng lọc và lọc lại. Lấy một phần hay toàn bộ dịch lọc như chỉ dẫn ở trong chuyên luận, thêm 2ml dung dịch đệm Acetat pH 3.5 và 1.2ml dung dịch thioacetamid. Lắc đều và để yên 10 phút. Đảo trật tự màng lọc với màng lọc phụ rồi lọc dung dịch phản ứng qua màng lọc với một áp lực nhẹ và chậm. Lấy màng lọc ra, làm khô bằng cách ép trên giấy lọc. Độ đậm của vết màu tạo thành trên màng lọc không được đậm hơn màu mẫu thu được với một thể tích dung dịch mẫu chì 1 phần triệu Pb như đã chỉ dẫn trong chuyên luận và được chỉ dẫn như cách làm với mẫu thử, bắt đầu từ câu “thêm 2ml dung dịch đệm acetat pH 3.5.....”.

Dung dịch mẫu chì:

Hòa tan 0.4g chì (II) nitrat trong nước và thêm nước cho vừa đủ 250ml, lắc đều, được dung dịch chì mẫu 1000 phần triệu.

Pha loãng 1 thể tích dung dịch mẫu chì 1000 phần triệu thành 10 thể tích với nước được dung dịch mẫu chì 100 phần triệu. Dung dịch pha ngay trước khi sử dụng.

Pha loãng 1 thể tích dung dịch chì mẫu 100 phần triệu thành 10 thể tích với nước được dung dịch chì mẫu 10 phần triệu. Dung dịch pha ngay trước khi sử dụng.

7.1.7. Sắt.

Hòa tan một lượng chế phẩm thử qui định trong nước rồi pha loãng với nước tới 10ml, hoặc lấy 10ml dung dịch chế phẩm thử như chỉ dẫn trong chuyên luận cho vào một ống Nessler. Thêm 2ml dung dịch acid citric 20% (TT) vào 0,1ml acid mercaptoacetic (TT). Lắc đều, kiểm tra bằng dung dịch amoniac 10M (TT) và pha loãng với nước tới 20ml. Chuẩn bị một dung dịch màu chuẩn trong cùng điều kiện, dùng 10ml dung dịch sắt mẫu 1 phần triệu Fe thay cho dung dịch chế phẩm thử.

Sau 5 phút, màu hồng tạo thành trong dung dịch thử không được đậm hơn màu chuẩn.

7.1.8. Sulfat.

Nguyên tắc: Dung dịch có ion sulfat tác dụng với một muối Bari (môi trường acid Hydrochlorid) cho kết tủa trắng (hoặc dung dịch đục mờ). So sánh độ đục với một mẫu:



Tiến hành: Thêm 1ml dung dịch BaCl_2 25% vào 1.5ml dung dịch sulfat mẫu 10 phần triệu SO_4^{2-} , lắc và để yên 1 phút. Thêm 15ml dung dịch chế phẩm thử đã được chỉ dẫn trong chuyên luận hoặc theo một lượng chế phẩm thử qui định đã hòa tan trong 15ml nước và 0,5ml dung dịch acid acetic 5M. Để yên 5 phút.

Độ đục tạo thành trong ống thử không được đậm hơn trong ống chuẩn, được chuẩn bị đồng thời trong cùng điều kiện nhưng dùng 15ml dung dịch sulfat mẫu 10 phần triệu SO_4^{2-} thay cho dung dịch chế phẩm thử.

7.2. Xác định tro không tan trong acid.

Phương pháp 1:

Cho 25ml acid hydrocloric 2M (TT) vào tro toàn phần, đun sôi 5 phút, lọc để tập trung những chất không tan vào một phễu thủy tinh xốp đã cân bì, hoặc vào một giấy lọc không tro, rửa bằng nước nóng rồi đem nung. Tính tỷ lệ phần trăm của tro không tan trong acid so với được liệu đã làm khô trong không khí.

7.3. Tro Sulfat

Phương pháp 2:

Nung một chén nung sứ hoặc platin tới đỏ trong 30 phút, để nguội trong bình hút ẩm rồi cân. Cho vào chén nung một lượng phù hợp mẫu thử, thêm 2ml dung dịch acid sulfuric 1M (TT) và đun nóng. Trước hết đun trên nồi cách thủy, sau đó đun cẩn thận trên nồi cách thủy rồi từ từ nâng nhiệt độ lên 600°C . Tiếp tục đốt cho tới khi có không còn những tiểu phân màu đen rồi để nguội. Thêm vài giọt dung dịch amoni carbonat 15,8% (TT), làm bốc hơi tới khô. Nung cẩn thận, để nguội rồi cân. Nung lại 15 phút và nhắc lại qui trình tới khối lượng không đổi.

PHỤ LỤC 8

8.1. Giới hạn cho phép về thể tích nồng độ, hàm lượng thuốc

Lượng hoạt chất có trong các chế phẩm bào chế được biểu thị ở các tiêu chí: Thể tích, nồng độ, hàm lượng thuốc...

Do thực tế có sai số của các dụng cụ, trang thiết bị và quá trình sản xuất mà mỗi dạng bào chế được phép có một khoảng chênh lệch về lượng so với quy định ghi trên nhãn.

Đó là giới hạn cho phép về thể tích, nồng độ, hàm lượng thuốc...

Giới hạn cho phép về thể tích

Trừ thuốc tiêm đơn liều và các thuốc có quy định đặc biệt, các dạng dung dịch có giới hạn cho phép về thể tích ghi trong bảng nay:

Bảng: giới hạn cho phép về thể tích

Loại thuốc	Thể tích ghi trên nhãn	Giới hạn cho phép (% chênh lệch)
Thuốc tiêm nhiều liều và thuốc tiêm truyền tĩnh mạch	Tối 50ml Trên 50ml	+ 10% +5%
Thuốc nước để uống và rượu thuốc	Tối 20ml Trên 20 – 50ml Trên 50ml – 150ml Trên 150ml	+10% +8% +6% +4%
Siro và cao thuốc (trừ cao động vật)	Tối 100ml Trên 100ml – 250ml Trên 250ml	+10% +8% +6%
Thuốc nhỏ mắt và thuốc nhỏ mũi	Mọi thể tích	+10%
Thuốc dung ngoài	Tất cả các loại	+10%

Lấy 5 đơn vị bất kỳ (ống, lọ...), riêng thuốc tiêm truyền có thể tích trên 100ml thì lấy 3 đơn vị. Xác định thể tích từng đơn vị bằng bơm tiêm chuẩn hoặc ống đong chuẩn sạch, khô, có độ chính xác phù hợp.

Thể tích mỗi đơn vị phải nằm trong 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.

Giới hạn cho phép về nồng độ, hàm lượng thuốc

Nếu không có quy định đặc biệt ở chuyên luận riêng, trừ vitamin và chất khoáng trong thuốc đa thành phần, các thành phẩm có giới hạn cho phép về nồng độ, hàm lượng hoạt chất ghi trong bảng sau:

Bảng: Giới hạn cho phép về nồng độ, hàm lượng

Loại thuốc	Lượng ghi trên nhãn	Giới hạn cho phép
Thuốc tiêm truyền	Dạng dung dịch Dạng bột	±5% ±10%
Dung dịch, rượu thuốc. Siro và cao thuốc	Thuốc độc A,B Thuốc thường	±5% ±10%
Thuốc viên (nén, nang)	Tối 50mg Trên 50mg đến 100mg	±10% ±7,5%

	Trên 100mg	±5%
Hoàng, bột, cốm	Tối 100mg	±15%
	Trên 100mg đến 1g	±10%
	Trên 1g đến 5g	±5%
	Trên 5g	±1%
Thuốc mỡ, cao xoa	Tối 200mg	±15%
	Trên 200mg đến 1g	±10%
	Trên 1g đến 5g	±7,5%
	Trên 5g	±3%

Cách thử:

Nồng độ, hàm lượng của các hoạt chất trong chế phẩm được thử ở tiêu chí “định lượng” ghi ở chuyên luận riêng. Về lượng chất đem thử được lấy từ một số lượng đơn vị chế phẩm đã được làm đồng đều theo quy định tính khối lượng trung bình ở phụ lục 8.3 “Độ đồng đều khối lượng”, đối với cao thuốc có nồng độ hàm lượng tính theo khối lượng trên thể tích (kl/tt) thì tuân theo quy định ở phần “Giới hạn cho phép về thể tích”

8.2. PHÉP THỬ ĐỘ ĐỒNG ĐỀU HÀM LƯỢNG

Nếu không có quy định đặc biệt ở chuyên luận riêng thì các thành phẩm tính theo đơn vị bào chế nhỏ nhất như viên, nang, ống, gói, lọ, đạn, trứng... có chứa một hoặc nhiều hoạt chất, trong đó có các hoạt chất có hàm lượng nhỏ dưới 2mg hoặc dưới 2% (kl/kl) so với khối lượng trung bình thì phải đáp ứng yêu cầu “Độ đồng đều hàm lượng”. Riêng thuốc để pha tiêm hoặc truyền tĩnh mạch nếu khối lượng nhỏ hơn hoặc bằng truyền tĩnh mạch nếu khối lượng nhỏ hơn hoặc bằng 40mg cũng phải đáp ứng yêu cầu “Độ đồng đều hàm lượng”

Yêu cầu này không áp dụng cho các chế phẩm chứa từ hai liều dung trở lên, các thuốc truyền tĩnh mạch không phân liều, các chế phẩm chứa nhiều vitamin, nguyên tố vi lượng và các trường hợp được phép miễn trừ

Phương pháp thử “Độ đồng đều hàm lượng” dựa trên cơ sở của phương ghi trong mục “Độ đồng đều hàm lượng” của chuyên luận riêng.

Trừ các chỉ dẫn trong chuyên luận riêng, phép thử “Độ đồng đều hàm lượng” phải tiến hành trên 10 đơn vị riêng rẽ, được lấy bất kỳ, kết quả được đánh giá theo phương pháp sau:

Phương pháp 1:

Áp dụng cho viên nén, viên bao, viên nang cứng, viên nang mềm, thuốc bột, thuốc cốm, thuốc nước để uống, siro, thuốc đạm, thuốc trứng...

Chế phẩm đem kiểm tra 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 một đơn vị trở lên nằm ngoài giới hạn 75 – 125% của hàm lượng trung bình.

Phương pháp 2:

Áp dụng cho thuốc tiêm, thuốc truyền tĩnh mạch, thuốc dạng bột, dạng viên nén hoặc dạng dung dịch đậm đặc để pha thuốc tiêm truyền tĩnh mạch.

Chế phẩm đạt yêu cầu phép thử nếu giá trị hàm lượng từng đơn vị đều ở 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 hoặc nếu có một đơn vị có giá trị hàm lượng nằm ngoài giới hạn 75 – 125% của hàm lượng trung bình.

Nếu 1 đơn vị có giá trị hàm lượng nằm ngoài giới hạn 85 - 115% nhưng 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 phép thử nếu không quá 1 đơn vị trong 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

8.3 PHÉP THỬ ĐỘ ĐỒNG ĐỀU KHỐI LƯỢNG

Độ đồng đều phân liều tính theo các đơn vị bào chế nhỏ nhất như viên, nang, ống, gói lọ, hộp, đạn, trứng...được biểu thị ở các tiêu chí “Độ đồng đều khối lượng” và “Độ đồng đều về hàm lượng”

Những chế phẩm nào không nằm trong quy định phải thử độ đồng đều về hàm lượng thì phải thử độ đồng đều về khối lượng

Bảng quy định độ đồng đều khối lượng

Dạng bào chế	Khối lượng trung bình (KLTB)	% Chênh lệch so với KLTB
Viên nén Viên bao phim	Nhỏ hơn hoặc bằng 80mg	10
	Trên 80mg - 250mg	7,5
	Lớn hơn hoặc bằng 300mg	5
Thuốc để pha tiêm hoặc truyền tĩnh mạch (đơn liều) dạng bột, hoặc dung dịch đậm đặc	Lớn hơn 40mg	10
Viên nén bao đường Viên hoàn	Tất cả các loại	10
Viên nang cứng Viên nang mềm	Nhỏ hơn 300mg	10
	Lớn hơn hoặc bằng 300mg	7,5
Thuốc đạn Thuốc trứng Cao dán	Tất cả các loại	5

Riêng thuốc để pha tiêm hoặc truyền tĩnh mạch, nếu khối lượng nhỏ hơn hoặc bằng 40mg thì không phải thử độ đồng đều khối lượng nhưng phải đáp ứng yêu cầu độ đồng đều hàm lượng.

Bảng quy định biến thiên khối lượng:

Dạng bào chế	Khối lượng ghi trên nhãn (KLN)	% Chênh lệch so với KLN
Thuốc bột	Dưới hoặc bằng 0,50g	10
	Trên 0,5g - 150g	7
	Trên 6g	5
		3
Thuốc cốm	Tất cả các loại	5
Thuốc mỡ Cao xoa	Dưới 10g	15
	10g - 20g	10
	Trên 20g - 50g	8
	Trên 50	5
Cao động vật	Dưới hoặc bằng 100g	5
	Trên 100 - 200g	3
	Trên 200g	2

Phương pháp thử

Phương pháp 1:

(Áp dụng cho viên nén, viên bao, đạn, trứng, cao dán). Cân 20 đơn vị bất kỳ, tính khối lượng trung bình, cân riêng khối lượng từng đơn vị. Cho phép không quá 2 đơn vị có khối lượng lệch ra ngoài quy định trong bảng A, nhưng không được có đơn vị nào lệch gấp 2 lần.

Phương pháp 2:

(Áp dụng cho viên nang cứng, nang mềm)

Cân khối lượng của một nang, sau đó với viên 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 thì cắt mở nang, bóc thuốc ra rồi dùng ether hoặc dung môi hữu cơ thích hợp để rửa sạch vỏ nang, để khô tự nhiên tới khi hết mùi dung môi, cân khối lượng của vỏ. Khối lượng thuốc trong nang được tính bằng hiệu giữa khối lượng nang thuốc và vỏ nang. Làm như vậy với 19 nang khác được lấy bất kỳ. Kết quả được đánh giá dựa vào bảng A giống như phương pháp 1.

Phương pháp 3:

(Áp dụng cho thuốc tiêm hoặc truyền tĩnh mạch (thuốc đơn liều) dạng thuốc bột hay dung dịch đậm đặc).

Loại bỏ hết nhãn, rửa sạch và làm khô bên ngoài, loại bỏ hết các nút nếu có 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°C - 105°C trong 1 giờ; nếu vỏ đựng không chịu được nhiệt độ đó thì làm khô ở nhiệt độ thích hợp tới khối lượng không đổi, để nguội trong bình hút ẩm và cân. Hiệu số khối lượng 2 lần cân là khối lượng của thuốc. Làm như vậy với 9 đơn vị khác được lấy bất kỳ. Tính khối lượng trung bình. Cho phép không quá 1 đơn vị có khối lượng lệch ra ngoài bảng A, nhưng không lệch trên 20%.

Phương pháp 4:

(Áp dụng cho thuốc bột, thuốc mỡ, thuốc cốm, cao động vật, cao xoa)

Cân từng đơn vị trong số 5 đơn vị đóng gói nhỏ nhất được lấy bất kỳ. Tất cả các đơn vị phải đạt quy định trong bảng B. Nếu có một đơn vị có khối lượng lệch ra ngoài quy định này thì phải thử lại với 5 đơn vị khác, nếu lần thử lại có quá 1 đơn vị không đạt thì lô thuốc không đạt yêu cầu.

Đối với các chế phẩm đóng gói trong hộp hoặc 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.

8.4. PHÉP THỬ ĐỘ HÒA TAN CỦA VIÊN NÉN VÀ VIÊN NANG

Phép thử độ hòa tan của viên nén và viên nang là phép thử xác định tốc độ hòa tan hoạt chất của hai dạng thuốc rắn có phân liều là viên nén và viên nang.

Nếu như không có chỉ dẫn gì khác thì sử dụng thiết bị kiểu giỏ quay như mô tả ở phần sau để thử. Tất cả các bộ phận của thiết bị có thể tiếp xúc với chế phẩm thử hoặc với môi trường hòa tan đều phải trơ về mặt hóa học, không hấp thụ, không phản ứng hoặc gây trở ngại cho chế phẩm thử. Những bộ phận, chi tiết bằng kim loại của thiết bị có thể tiếp xúc với chế phẩm hoặc môi trường hòa tan đều phải được làm bằng một loại thép không rỉ thích hợp hoặc được phủ bằng một chất liệu thích hợp sao cho chúng không phản ứng hay gây trở ngại cho chế phẩm thử hoặc môi trường hòa tan.

Không một chi tiết nào của thiết bị, kể cả nơi đặt thiết bị, làm tăng đáng kể sự rung động, lắc lư, hoặc dao động để sao cho những chuyển động này chỉ còn do chính hệ thống quay của thiết bị hoặc do dòng chảy của môi trường hòa tan gây ra.

Nên dùng những thiết bị cho phép quan sát được chế phẩm thử trong quá trình thử.

Môi trường hòa tan được chỉ dẫn trong từng chuyên luận riêng. Nếu là một dung dịch đệm thì cần phải điều chỉnh PH của nó sao cho không sai khác quá 0,05 đơn vị so với PH được chỉ định trong chuyên luận. Môi trường hòa tan phải được loại khí trước khi dùng. Các kích thước và dung sai của các thiết bị được mô tả trong các hình 8.4-1 (a-d) và 8.4-2 (a-c)

Thiết bị kiểu giỏ quay

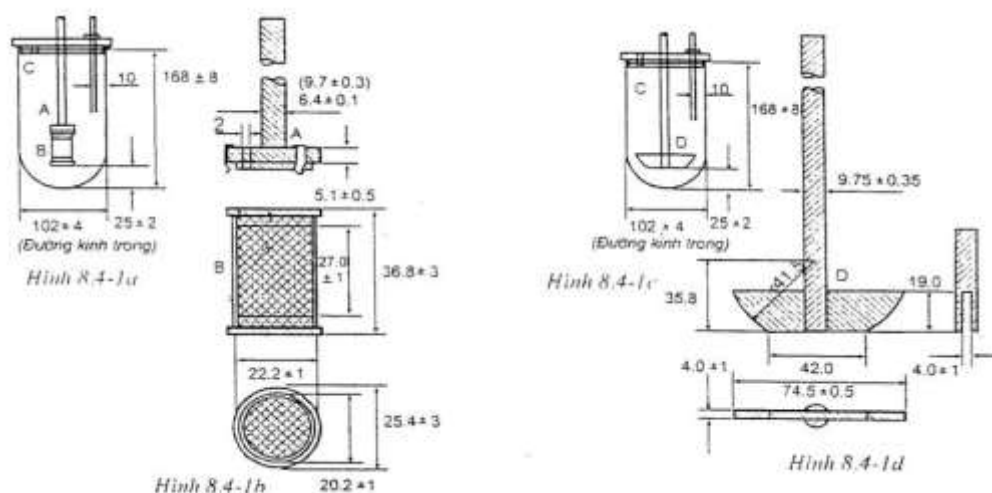
(a) một hình trụ c bằng thủy tinh borosilicat hoặc bằng chất liệu trong suốt thích hợp khác, có đáy hình bán cầu và có dung tích danh định 1000ml (hình 8.4-1a). Miệng bình này có miệng rộng được đậy bằng nắp có một số lỗ nhỏ, trong đó có 1 lỗ trùng vào tâm của nắp.

(b) 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 được chỉ định trong chuyên luận riêng. Động cơ này gắn với bộ phận khuấy bao gồm trục quay A và giỏ hình ống trụ B (hình 8.4-1b). Trục kim loại phải quay được một cách nhẹ nhàng, không bị lắc lư đáng kể trong khi quay. Bộ phận giỏ gồm 2 phần: Phần nắp trên có một lỗ thoát nhỏ được gắn với trục.

Nắp này được lắp 3 cái nhíp đàn hồi, hay bằng một cách nào đó thích hợp để có thể giữ chắc chắn phần dưới của giỏ đồng trục với trục của bình trong khi quay và cũng 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, có đường kính sợi rây là

0,254mm và có cạnh hình vuông của lỗ rây là 0,381mm; 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 μ m để làm việc trong môi trường acid. Khoảng cách của giỏ đến đáy trong của bình luôn được giữ trong khoảng 23-27 mm trong quá trình thử.

(c) Một chậu cách thủy để duy trì trong môi trường hòa tan nhiệt độ 36,5 - 37,5°C.



Hình (a-d): Thiết bị thử độ hòa tan của viên nén và viên nang (kiểu giỏ quay và kiểu cánh khuấy) (kích thước bằng mm)

Thiết bị kiểu cách khuấy

Thiết bị này giống như kiểu thiết bị giỏ quay mô tả ở trên, chỉ khác là giỏ được thay thế bằng cách khuấy D (hình 8.4-1c và 8.4-1d). Cách 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 được sắp đặt ở vị trí sao cho không lệch quá 2mm so với trục của bình và cạnh đáy của cánh khuấy cách mặt đáy trong của bình từ 23 - 27mm. Thiết bị được vận hành sao cho cánh khuấy quay tròn một cách nhẹ nhàng và không có rung động rõ rệt.

Thiết bị kiểu dòng chảy

Một bình chứa môi trường hòa tan (hình 8.4-2a)

Một bơm đẩy môi trường hòa tan lên trên qua buồng dòng chảy (hình 8.4-2a)

Một buồng dòng chảy làm bằng vật liệu trong suốt lắp thẳng đứng có kèm theo một hệ thống lọc để ngăn các tiểu phân không hòa tan (hình 8.4-2b và 8.4-2c)

Một chậu cách thủy để duy trì môi trường hòa tan ở 36,5-37,5°C

Phương pháp thử

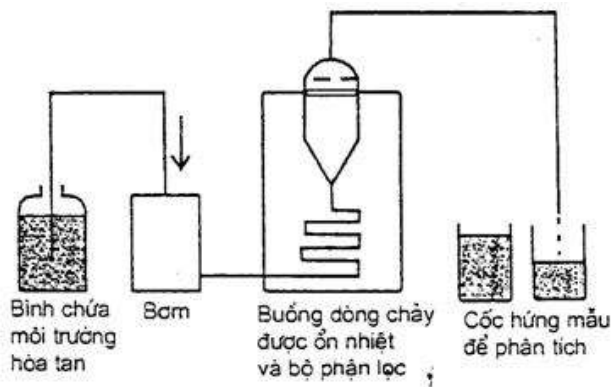
Cho một thể tích quy định môi trường hòa tan đã đuổi khí vào bình. Làm ấm môi trường hòa tan đến nhiệt độ trong khoảng 36,5-37,5°C. Nếu không có chỉ dẫn gì khác thì dùng một viên nén hay viên nang cho một lần thử.

Khi sử dụng thiết bị kiểu giỏ quay, trước tiên cho viên nén hay viên nang vào trong giỏ khô. Hạ thấp giỏ vào đúng vị trí rồi mới cho giỏ quay. Trong trường hợp dùng thiết bị kiểu cánh khuấy, cho viên nén hay viên nang chìm xuống đáy bình trước khi cho quay cánh khuấy. Có thể dùng 1 dây xoắn bằng kim loại hay thủy tinh để giữ

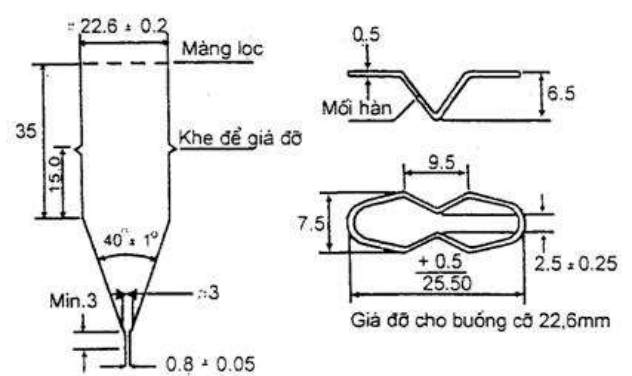
cho viên thuốc nằm ngang dưới đáy bình. Cần chú ý loại trừ bọt không khí khỏi bề mặt viên. Sau đó, cho thiết bị vận hành ngay ở tốc độ quay được chỉ dẫn trong chuyên luận riêng. Nếu dùng thiết bị kiểu dòng chảy, cho vào buồng dòng chảy một ít bi thủy tinh có đường kính khoảng 0,9 - 1,1mm, trong đó có một hạt đường kính 4,5-5,5mm

đặt ở đáy bình nón, cho viên thuốc để thử vào trong hoặc đặt lên lớp bi thủy tinh, cũng có thể giữ viên thuốc trên giá đỡ như mô tả ở hình vẽ. Lắp nối đầu lọc và cố định các bộ phận với nhau bằng một cái cặp thích hợp. Làm ấm môi trường hòa tan ở nhiệt độ trong khoảng từ 36,5 - 37,5°C và bơm nó quay đáy của buồng để có được một dòng chảy liên tục ở tốc độ quy định ($\pm 5\%$). Tùy theo chỉ dẫn ở chuyên luận

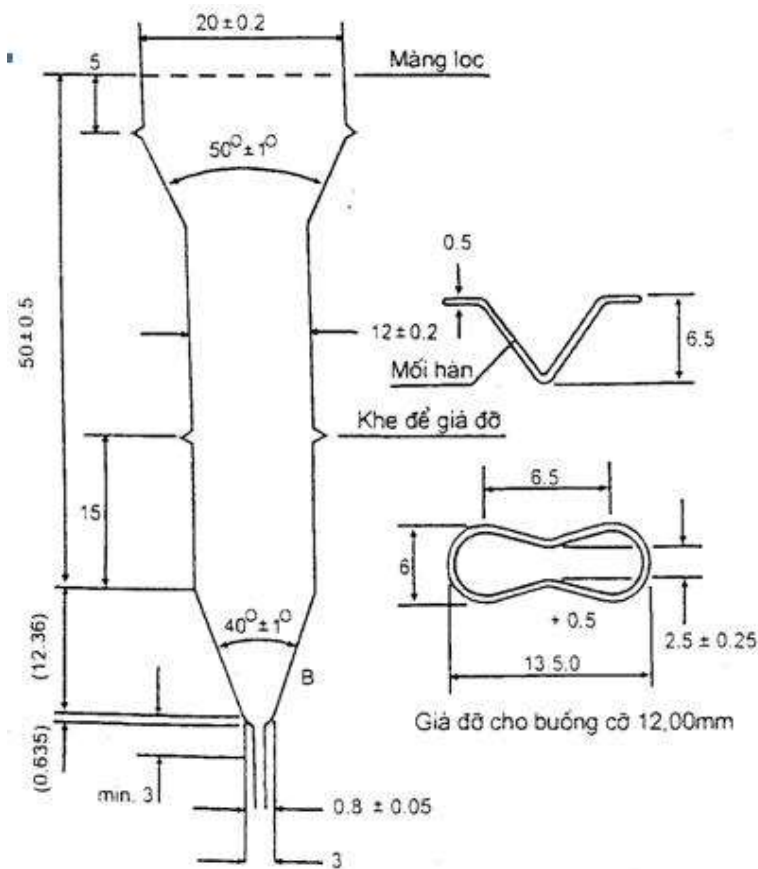
riêng mà lấy mẫu ra để thử ở phút thứ 45, hoặc sau những khoảng thời gian quy định, hoặc lấy mẫu ra liên tục.



Hình 8.4-2a



Hình 8.4-2b



Hình 8.4-2c

Hình (a-c): Thiết bị thử độ hòa tan của viên nén và viên nang (kiểu buồng chảy) kích thước bằng mm

Điểm hút mẫu ở khoảng giữa bề mặt môi trường hòa tan vào mặt trên của giỏ

Hay cạnh trên của cánh khuấy; điểm này phải cách thành bình ít nhất 10mm.

Trong trường hợp dùng thiết bị kiểu dòng chảy thì lấy mẫu ở dòng chảy sau khi đi ra khỏi buồng. Ngoại trừ các trường hợp phân tích mẫu liên tục với thiết bị kiểu giỏ quay hay thiết bị kiểu cánh khuấy, khi đó mẫu lấy ra sau khi phân tích lại trở về bình hòa tan, cũng như trong trường hợp lấy mẫu phân tích một lần, còn trong các trường hợp khác còn lại đều phải thêm 1 thể tích môi trường hòa tan bằng thể tích mẫu thử

đã lấy để phân tích hoặc cũng có thể dùng phép tính hiệu chỉnh. Lọc mẫu lấy phân tích ở 36,5 - 37,5°C và xác định lượng hoạt chất chứa trong mẫu bằng phương pháp được chỉ dẫn trong chuyên luận riêng. Cần dùng màng lọc trợ, không hấp thụ hoạt chất trong mẫu, không chứa các chất bị môi trường hòa tan chiết ra gây trở ngại cho phương pháp phân tích và phải có cỡ lỗ xốp thích hợp.

Làm lại toàn bộ thí nghiệm trên 5 lần nữa. Trong trường hợp mỗi thí nghiệm dùng một viên để thử theo chỉ định, ở mỗi một trong 6 viên được thử lượng hoạt chất đi vào dung dịch không được ít hơn 70% lượng hoạt chất quy định, trừ khi có chỉ dẫn khác trong chuyên luận. Nếu có một viên không đáp ứng yêu cầu này thì phải thử lại với 6 viên khác, lần này tất cả các viên phải đạt yêu cầu.

Khi số viên được chỉ định chỉ thử 1 lần là hay hay nhiều hơn thì toàn bộ số lần phải thử là 6 lần và trong mỗi lần thử, lượng hoạt chất đi vào dung dịch tính cho 1 viên không được ít hơn 70% lượng hoạt chất quy định, trừ khi có chỉ dẫn khác trong chuyên luận. Trường hợp này không được phép thử lại khi có viên không đạt yêu cầu.

Nếu vỏ viên nang gây trở ngại cho kỹ thuật phân tích, lấy ít nhất 6 viên nang, loại bỏ toàn lượng thuốc trong nang, hòa tan vỏ nang rỗng trong một thể tích môi trường hòa tan được chỉ dẫn trong chuyên luận riêng rồi tính hiệu chỉnh. Hệ số hiệu chỉnh không được lớn hơn 25% hàm lượng ghi trên nhãn.

8.5. PHÉP THỬ ĐỘ RÃ CỦA THUỐC ĐẠN VÀ THUỐC TRỨNG

Phép thử độ rã của thuốc đạn và thuốc trứng là phép thử xác định xem thuốc có rã hoặc mềm ra khi được đặt trong môi trường lỏng trong khoảng thời gian và dưới những điều kiện thử quy định.

Thiết bị

a) Một ống trong suốt bằng thủy tinh hay bằng chất dẻo có thành dày thích hợp, có đường kính trong 52mm và chiều cao 60mm (hình 8.5-1)

b) Một bộ phận kim loại gồm 2 đĩa làm bằng thép không gỉ, mỗi đĩa có 39 lỗ tròn có đường kính 4mm và được phân bố như trên hình vẽ. Các đĩa thép này có đường kính gần tương tự như đường kính trong của ống. Hai đĩa bằng thép được bố trí cách nhau khoảng 30mm. Bộ phận kim loại này được treo vào ống thủy tinh bằng 3 móc cách đều nhau.

Để thử độ rã của viên nén đặt âm đạo thì dùng dụng cụ trong đó bộ phận kim loại này không được treo mà lại đỡ bằng những móc ngược như mô tả 8.5-2

cách thử

Thuốc đạn: Nếu không có chỉ dẫn khác thì làm như sau: Đặt một viên lên đĩa dưới của bộ phận bằng kim loại rồi lắp đặt bộ phận này vào ống. Đưa thiết bị đã có viên thuốc thử vào một chậu chứa 4l nước ấm 36 - 37°C gắn vào một máy khuấy chậm; giữ thiết bị ở vị trí thẳng đứng chìm dưới mặt nước 90mm bằng một bộ phận thích hợp. Cứ sau 10' lại đảo ngược thiết bị thử 1 lần mà vẫn giữ chìm trong nước.

Thử lại như trên với 2 viên khác nữa.

Thuốc được coi là đã rã khi:

a) Hòa tan hoàn toàn; hoặc

b) Phân tán thành những tiểu phân rồi 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 có thể phân tán theo 1 hay 2 - 3 cách nêu ở trên; hoặc

c) Trở nên mềm ra kèm theo biến dạng mà không nhất thiết phải bị phân tán hoàn toàn thành những tiểu phân, nhưng trong trường hợp này thì khối viên không được có nhân rắn chịu được sức ép của đĩa thủy tinh.

Thuốc đạn có tá dược là thân mỡ phải rã trong thời gian không quá 30', còn thuốc đạn tan trong nước thì thời gian đó là 60', trừ khi có quy định khác.

Viên nang đặt trực tràng: thử giống như mục “thuốc đạn”. Viên thuốc được coi là rã ra khi vỏ nang gelatin vỡ ra và giải phóng các hoạt chất chứa bên trong.

Thời gian rã không được quá 30’

Thuốc trướng: tiến hành thử như mục “thuốc đạn” và đánh giá như mục “viên nang đặt trực tràng”.

Thời gian tan rã không được quá 30’.

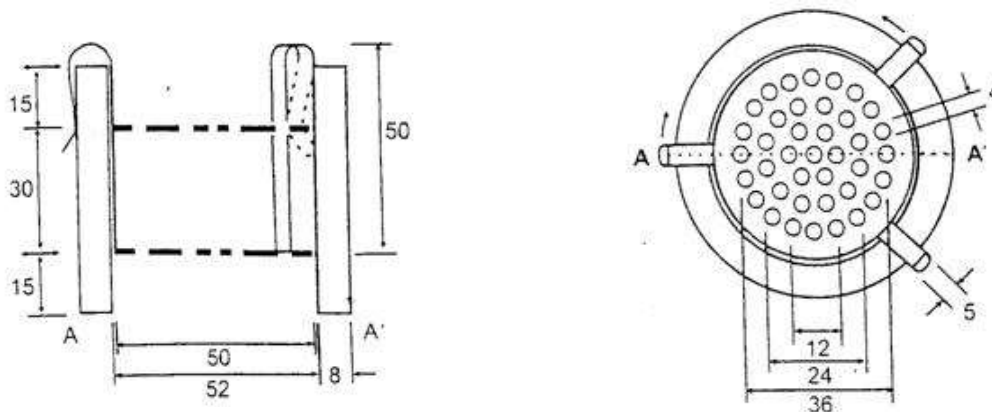
Viên nén đặt âm đạo: Đặt thiết bị thử vào 1 bình có đường kính phù hợp chứa 1 lít nước ấm 36 - 37°C. Thêm dần nước ấm đến khi mặt lỗ của đĩa kim loại vừa được phủ bằng một lớp nước.

Đặt 1 viên thuốc thử lên đĩa kim loại rồi đẩy dụng cụ bằng một tấm kính để giữ độ ẩm bên trong lặp lại phép thử với viên khác nữa.

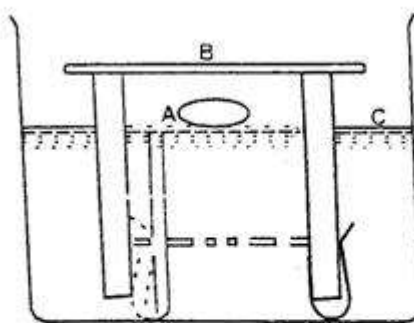
Viên thuốc được coi là rã khi:

- Không còn cấn trên đĩa kim loại, hoặc
- Nếu còn cấn trên đĩa kim loại thì đó chỉ là một khối mềm hay rỗng xốp, không có nhân rắn chắc tới mức chịu được sức ép của đĩa thủy tinh.

Thời gian rã không được quá 30’ trừ khi có quy định khác



Máy thử độ rã của thuốc đạn và thuốc trướng (kích thước bằng mm)



*Hình 8.5-2: Máy thử độ rã của viên nén đặt âm đạo
A- Viên nén đặt âm đạo; B- Tấm kính; C- Mặt nước*

8.6. PHÉP THỬ ĐỘ RÃ CỦA VIÊN NÉN VÀ VIÊN NANG

Phép thử này xác định viên nén hay viên nang có rã hay không trong khoảng thời gian quy định khi đặt trong môi trường lỏng dưới những điều kiện thực nghiệm quy định.

Mẫu thử được coi là đạt yêu cầu về độ rã khi không còn cấn, trừ những mảnh vỏ bao không tan của viên nén và viên nang còn lại trên mặt lưới của thiết bị thử hoặc dính vào bề mặt dưới đáy của đĩa đẩy. Nếu có cấn còn lại thì nó chỉ là một khối mềm không được có nhân khô rắn sờ thấy được.

Thiết bị

a) Mỗi giá đỡ ống thử thích hợp, đỡ 6 ống thủy tinh hình trụ có chiều dài 75,0 - 80,0mm, đường kính trong là 21,5mm và chiều dày của thành ống khoảng 2mm (hình 8.6)

b) Một đĩa hình trụ đặt lên mặt ống, có đường kính từ 20,55 - 20,85mm và chiều dày 9,35 - 9,65mm, được làm bằng chất dẻo trong suốt có thể trọng 1,18 - 1,20. Đĩa có 5 lỗ hồng, đường kính của mỗi lỗ là 20mm một lỗ ở giữa và 4 lỗ còn lại đặt cách đều nhau trên một vòng tròn có bán kính là 6mm tính từ tâm đĩa. Có 4 rãnh cách đều nhau được cắt bên cạnh đĩa sao cho ở mặt trên đĩa, rãnh có chiều rộng là 9,5mm và chiều sâu 2,55mm, còn tại mặt dưới của đĩa, rãnh là một hình vuông có cạnh 1,6mm.

c) Các ống được giữ ở vị trí thẳng đứng trong 6 lỗ trống của 2 tấm nhựa cứng trong suốt có đường kính là 90mm và chiều dày là 60mm. Các lỗ cách đều nhau và cách đều tâm. Mặt dưới của tấm nhựa phía dưới được gắn một tấm lưới đan bằng các sợi thép không gỉ và có đường kính 0,635mm và kích thước mắt lưới là 2,00mm

d) Hai tấm nhựa được cố định cách đều nhau 77,5mm bằng các thanh kim loại được chốt thẳng đứng ở ngoại biên 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 một bộ phận cơ có khả năng vận hành thiết bị chuyển động lên xuống một khoảng từ 50-60mm với một tần số cố định 28-32 lần trên phút.

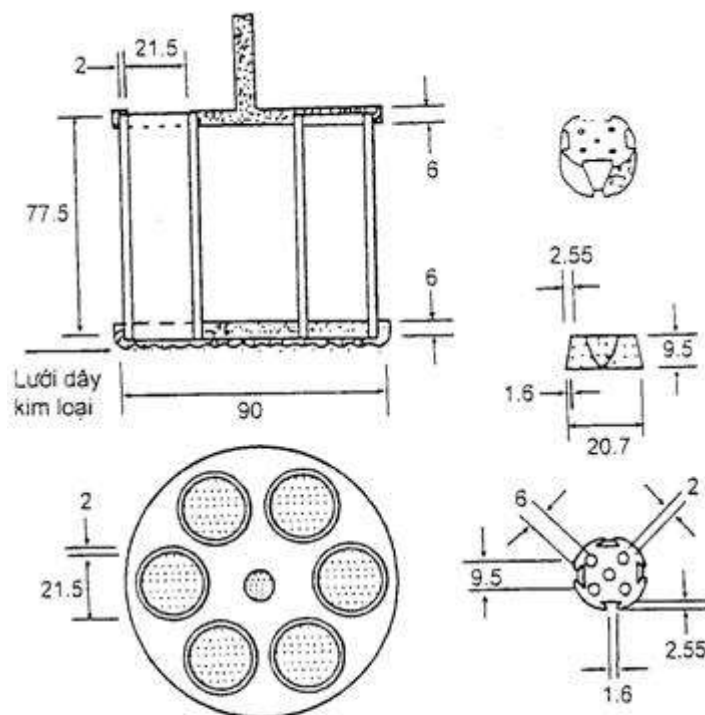
e) Giá đỡ ống thử được nhúng chìm trong một bình thích hợp, thường là cốc thủy tinh có dung tích 1000ml chứa chất lỏng đã được quy định. Thể tích chất lỏng phải đủ để sao cho khi giá ống thử ở vị trí cao nhất thì lưới kim loại phải ở dưới bề mặt chất lỏng phía trên ít nhất là 15mm và khi giá ống thử ở vị trí thấp nhất thì lưới kim loại phải cách đáy cốc thủy tinh ít nhất là 25mm và miệng của các ống thủy tinh phải còn ở phía trên bề mặt chất lỏng

f) Một thiết bị phù hợp để duy trì nhiệt độ của chất lỏng từ 36-38°C ($37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$)

Giá đỡ ống thử có thể thay đổi nhưng quy cách kỹ thuật của ống thủy tinh và lỗ mắt lưới phải đảm bảo đúng quy định.

Phương pháp thử

Trừ khi có chỉ dẫn khác trong chuyên luận riêng, cho vào mỗi ống một viên nén hoặc một viên nang rồi đẩy đĩa chất dẻo vào mỗi ống. Nhúng thiết bị vào trong cốc có chứa chất lỏng và vận hành thiết bị theo thời gian quy định. Lấy giá đỡ ống



Hình 8.6: Thiết bị đo độ rã của viên nén và viên nang
(Kích thước tính bằng mm)

thờ ra khỏi cốc chất lỏng. Mẫu thử đạt yêu cầu nếu cả 6 viên rã hết.

8.7 PHÉP THỬ ĐỘ RÃ CỦA VIÊN BAO TAN TRONG RUỘT

Thiết bị

Mô tả trong phép thử độ rã của viên nén và viên nang

Phương pháp thử

Cho vào trong mỗi ống một viên thuốc cần thử không dùng đĩa chất dẻo đặt lên trên, nhúng thiết bị vào trong cốc chứa dung dịch acid hydroclorid 0,1N (CĐ) và cho vận hành thiết bị trong 120' trừ khi có chỉ dẫn riêng trong chuyên luận. Lấy thiết bị ra khỏi chất lỏng và quan sát, không được có viên nào có dấu hiệu bị nứt làm cho hoạt chất bị hòa tan hoặc bị rã, trừ các mảnh vỏ của lớp bao. Thay chất lỏng trong cốc bằng dung dịch đệm phosphat PH 6,8, cho đĩa chất dẻo, vào mỗi ống và vận hành thiết bị trong 60'. Lấy thiết bị ra khỏi chất lỏng và quan sát. Mẫu thử đạt yêu cầu nếu tất cả 6 viên đều rã hết.

8.8. RỬA DỤNG CỤ THỦY TINH

Độ sạch của dụng cụ thủy tinh đem dùng có ảnh hưởng rất lớn đến kết quả của một phép thử hoặc một phép định lượng. Các dụng cụ thủy tinh như cốc vại có mỏ, buret, pipet, bình nón, bình cầu... Đều phải thật