

# Nghiên cứu xây dựng quy trình định lượng propan-2-ol trong viên nén bao phim bằng phương pháp sắc ký khí với kỹ thuật tiêm pha hơi tĩnh

Phan Lê Hiền, Hà Minh Hiền\*

Viện Kiểm nghiệm Thuốc TP. Hồ Chí Minh

## Summary

The gas chromatographic with static head - space injection method for determination propan-2-ol in coated tablets was reported here. A widebore column was used with ZB-624 as the stationary phase (30 m x 0.53 mm), 3.0  $\mu\text{m}$  in film thickness. Carrier gas: Helium for chromatography, with a linear velocity of 22.5 cm/s. The initial temperature of the column was at 40 °C for 1.6 min, then raising the temperature at a rate of 3 °C per min to 65 °C, next to 175°C at a rate of 20 °C per min and maintaining it for 8 min. Maintaining the temperature of the injection port at 200 °C and that of the flame - ionisation detector at 200 °C, the equilibration temperature was of 85 °C with equilibration time for 20 min. The method was validated following the ICH guidelines: The linearity was good at the range of 1.96 – 294 ppm ( $r > 0.9995$ ); RSD of intra-and inter-day precision variations < 15.0 %; mean recovery was (92.66 %  $\pm$  3.93 %) (RSD = 6.67 %).

**Keywords:** Propan-2-ol, coated tablets, head - space gas chromatography.

## Đặt vấn đề

Propan-2-ol hay 2-propanol ( $\text{C}_3\text{H}_8\text{O}$ ) là chất lỏng không màu, có mùi đặc biệt. Hòa tan trong nước và ethanol [1]. Theo hướng dẫn của ICH Q3C(R6) về tạp chất là dung môi cho phép tồn dư trong dược phẩm, nhằm bảo đảm sự an toàn của người bệnh khi đánh giá nguy cơ, propan-2-ol thuộc nhóm 3, là dung môi có độc tính thấp đối với người [2]. Mặc dù vậy, có nhiều nhà sản xuất quan tâm đến sức khỏe cộng đồng và chất lượng sản phẩm nên đã kiểm soát lượng propan-2-ol tồn dư trong thuốc, ví dụ, trong công thức bào chế viên nén bao phim chứa được chất clopidogrel có sử dụng dung môi này cho dịch bao phim. Tuy nhiên, việc áp dụng phương pháp mất khối lượng do làm khô với mức chất lượng không quá 0,5 % để xác định giới hạn propan-2-ol theo hướng dẫn trong Q3C(R6) [2] có thể không được chấp nhận bởi cơ quan

quản lý chất lượng thuốc do không đạt tính đặc hiệu. Thật vậy, nếu tiêu chuẩn chất lượng viên nén bao phim có chỉ tiêu độ ẩm với mức chất lượng cao hơn 0,5 % sẽ không đáp ứng đánh giá được propan-2-ol  $\leq$  5000 ppm. Nhằm hỗ trợ các nhà sản xuất có phương pháp xác định dung môi tồn dư propan-2-ol mang tính đặc hiệu, bài báo này cung cấp một quy trình phân tích bằng phương pháp sắc ký khí với kỹ thuật tiêm pha hơi tĩnh để định lượng propan-2-ol trong viên nén bao phim.

## Nguyên liệu và phương pháp

### Mẫu nghiên cứu

Chế phẩm: Viên nén baophim GEANUS 75 mg; Số lô: 031119; Hạn dùng: 24/11/2023; Nơi sản xuất: Công ty Cổ phần Dược ST.

Công thức bào chế cho 1 viên: Clopidogrel: 75 mg, microcrystalline cellulose, tinh bột ngô, natri croscarmellose, natri stearyl fumarat, colloidal anhydrous silica, hpmc, peg 400, peg 6000, bột talc, lactose monohydrat, titan dioxyd, oxid sắt đỏ, isopropyl alcohol, nước tinh khiết.

### Thiết bị, thuốc thử và chất chuẩn

**Cân phân tích, dụng cụ thủy tinh** đã được hiệu chuẩn theo GLP và ISO/IEC 17025: 2005 và các dụng cụ thông thường khác.

**Máy sắc ký khí GC Shimadzu 2010 Plus HS 20:** Bộ chích mẫu pha hơi tự động HS-20,

Chịu trách nhiệm: Hà Minh Hiền

Email: haminhkien@yahoo.com

Ngày nhận: 04/5/2021

Ngày phân biện: 11/10/2021

Ngày duyệt bài: 25/11/2021

đầu dò FID-2010 Plus, buồng tiêm mẫu kiểu chia dòng/không chia dòng SPL-2010 Plus với bộ điều khiển dòng khí bằng kỹ thuật số AFC, phần mềm xử lý dữ kiện LabSolutions phiên bản 2.5.

**Chất chuẩn:**

- Propan-2-ol; Số lô: IKI24; Hàm lượng: 99,9 % C<sub>3</sub>H<sub>8</sub>O; Nguồn gốc: Hãng Fisher.

- Propan-1-ol; Số lô: K48349297; Hàm lượng: 99,5 % C<sub>3</sub>H<sub>8</sub>O; Nguồn gốc: Hãng Merck.

**Hóa chất:** Nước; Số lô: 190421; Nguồn gốc: Viện Kiểm nghiệm Thuốc TP. Hồ Chí Minh.

**Phương pháp nghiên cứu**

**Chuẩn bị các dung dịch**

**Dung dịch chuẩn:** Cân chính xác khoảng 200 mg chuẩn propan-2-ol cho vào bình định mức 100 ml và bổ sung nước đến thể tích. Lấy chính xác 5 ml dung dịch này pha loãng thành 50 ml bằng nước. Lấy chính xác 5 ml dung dịch trên cho vào lọ đựng mẫu tiêm 10 ml thu được dung dịch chuẩn.

**Dung dịch thử:** Cân chính xác khoảng 200 mg bột thuốc vào lọ đựng mẫu tiêm 10 ml, thêm vào lọ chính xác 5 ml nước thu được dung dịch thử.

**Dung dịch phân giải:** Hòa tan propan-1-ol và propan-2-ol trong nước để được dung dịch chuẩn hỗn hợp có nồng độ mỗi chuẩn khoảng 0,2 mg/ml. Lấy chính xác 5 ml dung dịch trên cho vào lọ đựng mẫu tiêm 10 ml thu được dung dịch phân giải.

Đóng kín các lọ đựng mẫu tiêm chứa các dung dịch chuẩn, thử và phân giải nói trên bằng nút cao su có bao lớp polytetrafluoroethylen và giữ bởi một vòng chụp ngoài bằng nhôm. Lắc mạnh để có một dung dịch đồng nhất.

**Điều kiện sắc ký**

**Điều kiện:** Detector: Ion hóa ngọn lửa, nhiệt độ: 200 °C. Cột: Widebore (30 m x 0,53 mm), độ dày lớp bao 3,0 μm với poly[(cyanopropyl)

(phenyl)][dimethyl]siloxan. Nhiệt độ cột: 40 °C/1,6 min, 65 °C (tăng 3 °C/min), 175 °C/8 min (20 °C/min). Nhiệt độ buồng tiêm mẫu: 200 °C. Nhiệt độ cân bằng: 80 °C. Thời gian cân bằng: 20 min. Khí mang: Helium dùng cho sắc ký. Tốc độ dòng tuyến tính: 22,5 cm/s. Tỷ lệ chia dòng: 1:50. Thể tích tiêm: 1 ml.

**Cách tiến hành:** Thử tính phù hợp hệ thống: Tiêm dung dịch phân giải: Độ phân giải giữa pic propan-1-ol và propan-2-ol không được dưới 10. Tiêm dung dịch chuẩn: Độ lệch chuẩn tương đối của thời gian lưu và diện tích pic propan-2-ol trên 6 lần tiêm nhắc lại phải lần lượt không quá 2,0 % và 15,0 %. Số đĩa lý thuyết phải không được nhỏ hơn 15000. Hệ số đối xứng phải không quá 2,0. Tiêm lần lượt dung dịch chuẩn và dung dịch thử. Tính lượng (ppm) của propan-2-ol (C<sub>3</sub>H<sub>8</sub>O) theo công thức:

$$X (g) = (R_U / R_S) \times M_{St} \times 5000 / M_{Sp}$$

Trong đó:

*R<sub>U</sub>/R<sub>S</sub>:* Diện tích pic của propan-2-ol có được từ sắc ký đồ của dung dịch thử/dung dịch chuẩn;

*M<sub>St</sub>:* Khối lượng mẫu chuẩn (mg);

*M<sub>Sp</sub>:* Khối lượng của mẫu thử (mg).

**Các chỉ tiêu thẩm định phương pháp phân tích:** Tính đặc hiệu, tính tuyến tính, độ chính xác, độ đúng theo hướng dẫn của ICH [3].

**Kết quả**

**Khảo sát tính phù hợp của hệ thống sắc ký**

Tiến hành sắc ký 6 lần dung dịch phân giải và dung dịch chuẩn, ghi lại sắc ký đồ. Thông số về sắc ký như độ phân giải giữa pic propan-1-ol và propan-2-ol (chỉ trình bày độ phân giải thấp nhất), thông số về độ chụm của kết quả định tính, định lượng thể hiện ở % RSD đối với: Thời gian lưu và diện tích, hệ số đối xứng và số đĩa lý thuyết của pic propan-2-ol trên 6 lần tiêm đều đạt yêu cầu quy định và được trình bày trong bảng 1.

**Bảng 1. Thử tính phù hợp của hệ thống sắc ký (n = 6)**

STT	Thời gian lưu pic propan-2-ol (min)	Diện tích pic propan-2-ol	Hệ số đối xứng pic propan-2-ol	Số đĩa lý thuyết pic propan-2-ol	Độ phân giải
1	4,631	470056	1,118	19986	
2	4,632	483527	1,113	19861	
3	4,633	460509	1,113	19874	14,068
4	4,634	470523	1,123	19876	
5	4,635	455305	1,115	19782	
6	4,634	452629	1,122	19890	
<b>Trung bình</b>	4,633	456425	1,117	19878	
<b>RSD (%)</b>	0,03	2,48	0,39	0,33	

### Tính đặc hiệu

Kết quả cho thấy sắc ký đồ mẫu thử cho pic có cùng thời gian lưu với pic trong sắc ký đồ của mẫu chuẩn (độ lệch < 0,5 %), đảm bảo

tính đặc hiệu. Sắc ký đồ mẫu trắng là dung môi (nước), mẫu placebo không cho pic có cùng thời gian lưu với pic chính trong sắc ký đồ của dung dịch chuẩn.

**Bảng 2. Kết quả khảo sát tính đặc hiệu**

	Thời gian lưu (min)	Độ lệch thời gian lưu (%)
Chuẩn propan-2-ol	4,632	
Thử	4,650	0,39
Mẫu trắng	Không phát hiện pic	
Mẫu placebo	Không có pic có cùng thời gian lưu	

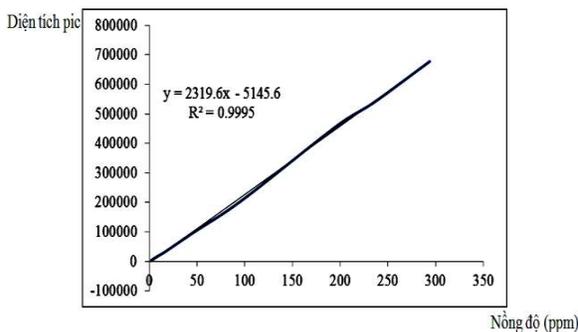
### Tính tuyến tính

Chuẩn bị 10 dung dịch chuẩn có nồng độ từ 150 % theo quy trình định lượng đến nồng độ giới hạn định lượng (LOQ). Xây dựng đồ thị

tương quan giữa nồng độ các dung dịch chuẩn và diện tích pic propan-2-ol thu được trên các sắc ký đồ (đường chuẩn) bằng phương pháp bình phương tối thiểu (hình 1).

**Bảng 3. Kết quả khảo sát tính tuyến tính**

Nồng độ propan-2-ol (ppm)	293,946	235,157	195,964	97,982	47,031
Diện tích pic trung bình	677647	538118	457943	209312	99672
Nồng độ propan-2-ol (ppm)	19,596	14,109	9,406	3,919	1,960
Diện tích pic trung bình	40231	27576	19083	7729	3964



**Hình 1. Đồ thị tương quan giữa nồng độ các dung dịch chuẩn và diện tích pic của propan-2-ol**

### Ghi chú:

Hệ số tương quan  $r = 0,9998 (> 0,999)$ .

Hệ số b không vượt quá 1% đáp ứng của chất chuẩn ở nồng độ định lượng (khoảng 200 ppm) theo phương pháp để xuất.

### Độ chính xác

Đánh giá dựa vào độ lặp lại trong ngày, kiểm nghiệm viên (KNV) 1 chuẩn bị mẫu để định lượng 6 lần theo quy trình phân tích. KNV 2 tiến hành tương tự nhưng khác ngày. Độ chính xác trung gian của phương pháp là RSD % kết quả định lượng của 2 KNV.

**Bảng 4. Kết quả khảo sát độ lặp lại của phương pháp định lượng propan-2-ol**

STT	Khối lượng mẫu thử (mg)	Diện tích pic propan-2-ol	Hàm lượng propan-2-ol (ppm)
1	199,4	1324	13,98
2	199,5	1299	11,91
3	199,5	1297	13,69
4	196,1	1002	10,76
5	199,9	1433	15,09
6	200,0	1143	12,03
Trung bình			12,91
RSD% (n = 6)			12,44

**Bảng 5. Kết quả khảo sát độ lặp lại và độ chính xác trung gian của phương pháp định lượng propan-2-ol**

KNV 1 (n = 6)	Hàm lượng (ppm)		
	Kết quả kiểm nghiệm	Trung bình (n = 12)	RSD% (n = 12)
	Propan-2-ol: 12,91 ± 1,69		
KNV 2 (n = 6)	Propan-2-ol: 10,77 ± 1,15	Propan-2-ol: 11,84 ± 1,10	Propan-2-ol: 14,56

**Giới hạn phát hiện (LOD):** 0,6 ppm dựa vào tỷ lệ đáp ứng so với nhiễu, S/N = 3:1.

**Giới hạn định lượng (LOQ):** 2,0 ppm, dựa vào tỷ lệ đáp ứng so với nhiễu, S/N = 10:1.

**Độ lặp lại tại LOQ (2 ppm)**

**Bảng 6. Kết quả khảo sát độ lặp lại của phương pháp định lượng propan-2-ol tại LOQ**

STT	Thời gian lưu pic propan-2-ol (min)	Diện tích pic propan-2-ol
1	4,661	3638
2	4,660	3714
3	4,659	3701
4	4,660	3645
5	4,646	4102
6	4,646	3826
<b>Trung bình</b>	4,655	3771
<b>RSD % (n = 6)</b>	0,16	4,66

Kết quả RSD (%) của độ lặp lại, độ chính xác trung gian và độ lặp lại tại LOQ đều đạt tiêu chuẩn chấp nhận (< 15,0 %). Độ chính xác của phương pháp đạt yêu cầu để định lượng propan-2-ol trong viên nén bao phim bằng phương pháp sắc ký khí với kỹ thuật tiêm pha hơi tĩnh.

#### **Độ đúng**

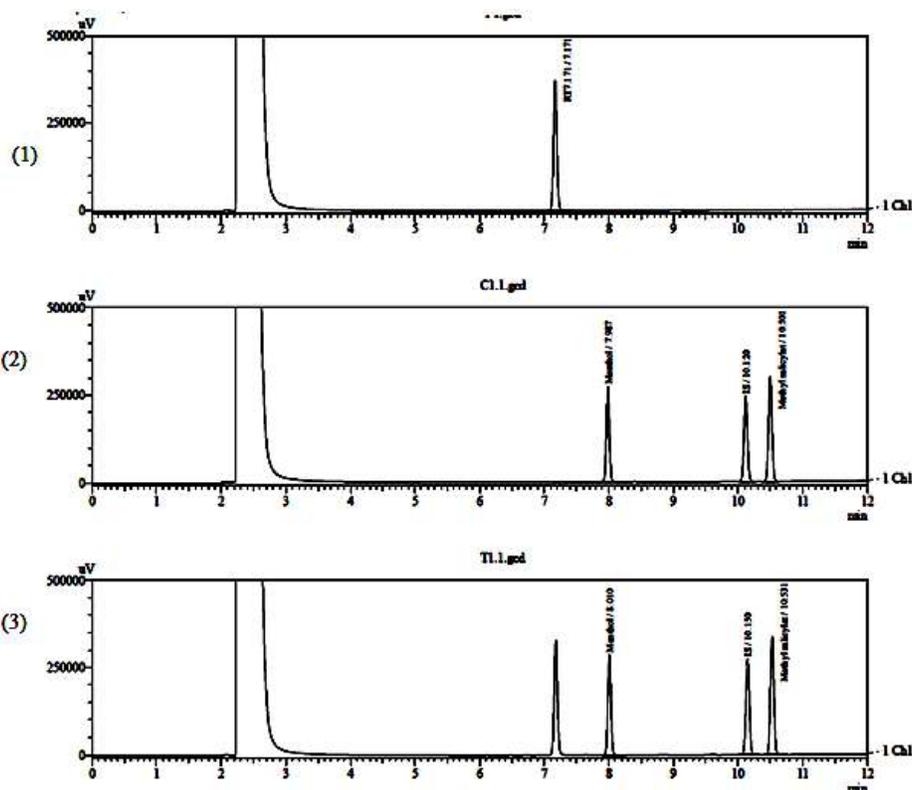
Cân một lượng chuẩn propan-2-ol cho vào mẫu thuốc để khi chuẩn bị mẫu theo quy trình phân tích thì thu được các dung dịch có nồng độ nằm trong khoảng LOQ, 15 %, 25 %, 50 %, 100 %, 120 % và 150 % so với nồng độ định lượng. Ở mỗi mức nồng độ thực hiện 3 lần. Tính lượng propan-2-ol tìm thấy. Tính tỉ lệ phục hồi là phần trăm lượng tìm thấy trên lượng chuẩn thêm.

**Bảng 7. Kết quả khảo sát độ đúng của phương pháp định lượng propan-2-ol**

Mức nồng độ	Tỉ lệ phục hồi propan-2-ol (%)	RSD (n = 3) (%)	Mức nồng độ	Tỉ lệ phục hồi propan-2-ol (%)	RSD (n = 3) (%)
LOQ	83,6 (80,0 - 110,0)	5,15	100 %	92,1 (90,0 - 107,0)	2,44
15 %	84,1 (80,0 - 110,0)	0,33	120 %	96,2 (95,0 - 105,0)	2,80
25 %	88,1 (80,0 - 110,0)	4,93	150 %	100,2 (95,0 - 105,0)	6,76
50 %	95,3 (90,0 - 107,0)	1,34			
<b>Trung bình</b> <b>(n = 21)</b>				92,66 ± 3,93	
<b>RSD</b> <b>(n = 21) (%)</b>				6,67	

Tỉ lệ phục hồi ở các mức nồng độ đều nằm trong khoảng theo quy định của AOAC với RSD % không quá 10,0 % (< 15,0 %). Kết quả thẩm định

các thông số cho thấy đạt tiêu chuẩn chấp nhận theo ICH và AOAC <sup>[4]</sup>.



Hình 2. Sắc ký đồ của dung dịch mẫu chuẩn (1) và mẫu thử (2) chuẩn bị theo phương pháp đề xuất

### Bàn luận

Dược điển Việt Nam V có phụ lục 10.14 về xác định dung môi tồn dư. Quy trình mô tả trong phụ lục này được áp dụng để xác định dung môi tồn dư trong các trường hợp: (1) - Định tính dung môi nhóm 1 và dung môi nhóm 2 tồn dư trong dược chất, tá dược hay dược phẩm; (2) - Thử giới hạn dung môi nhóm 1 và dung môi nhóm 2 khi chúng tồn tại trong dược chất, tá dược hay dược phẩm; (3) - Định lượng dung môi nhóm 2 khi lượng tồn dư lớn hơn 1000 phần triệu (0,1 %) hoặc định lượng dung môi nhóm 3 tồn dư khi có yêu cầu [1]. Tuy nhiên, chỉ thấy có hướng dẫn công việc cho phân tích dung môi nhóm 1 và 2 với quy trình cụ thể và sắc ký đồ kèm theo [1]. Phụ lục 10.13 về xác định hàm lượng methanol và propan-2-ol bằng phương pháp sắc ký khí sử dụng cột nhồi [1] ngày càng ít phổ biến. Theo phụ lục 10.14, thử nghiệm chỉ có giá trị nếu độ lệch chuẩn tương đối (RSD) của các hiệu số giữa ba cặp diện tích pic của chất phân tích thu được từ dung dịch đối chiếu và dung dịch thử nhỏ hơn 15 % [1]. Vì vậy, chọn tiêu chuẩn chấp nhận để đánh giá chỉ tiêu thẩm định độ chính xác là RSD không quá 15 %.

### Kết luận

Phương pháp đề nghị để định lượng propan-2-ol trong viên nén bao phim bằng phương pháp sắc ký khí kỹ thuật tiêm pha hơi tĩnh được thẩm định theo hướng dẫn của ICH đạt độ đúng, chính xác và tin cậy.

### Tài liệu tham khảo

1. Dược điển Việt Nam V (2017), PL 63, tr. 225-229.
2. International conference on Harmonization of technical requirements for registration of Pharmaceuticals for Human Use (2016), *Impurities: Guideline for residual solvents Q3C(R6)*, pp. 4.
3. International conference on Harmonization of technical requirements for registration of Pharmaceuticals for Human Use (2005), *Validation of analytical procedure: Text and methodology*, pp. 1-13.
4. AOAC Official Methods of Analysis (2016), *Guidelines for standard method performance requirements, Appendix F*, AOAC International, pp. 7-9.