

XÂY DỰNG PHƯƠNG PHÁP ĐỊNH TÍNH, ĐỊNH LƯỢNG ĐỒNG THỜI ATROPIN SULFAT VÀ BENZALKONIUM CLORID TRONG BƠM TIÊM TỰ TIÊM

TS. NGUYỄN DUY CHÍ, TS. TÔ MINH HÙNG
DS. KHUẤT BÁ LINH, DS. ĐÀO THỊ THANH THÙY
Viện KN-NC dược và TTBYT Quân đội
Phản biện khoa học: TS. PHẠM XUÂN CHUNG
Trưởng phòng Dược, Cục Quân y

TÓM TẮT: Xây dựng được phương pháp định tính, định lượng đồng thời atropin sulfat và benzalkonium clorid trong bơm tiêm tự tiêm atropin sulfat bằng kỹ thuật sắc ký lỏng hiệu năng cao.

- Điều kiện sắc ký gồm: pha động là acetonitril và dung dịch natri acetat 0,1M, pH 5,0, theo chương trình gradient, cột phenomenex C18 (250 mm x 4,6 mm; 5 μ m), detector UV ở bước sóng 210 nm, tốc độ dòng 1,0 ml/phút, thể tích tiêm mẫu 20 μ l, thời gian phân tích mẫu 20 phút.

- Phương pháp có độ đặc hiệu tốt, độ tuyến tính cao (hệ số tương quan của atropin sulfat và benzalkonium clorid lần lượt là 0,9993 và 0,9992); khoảng tuyến tính của atropin sulfat từ 0,5-3,0 mg/ml, benzalkonium clorid từ 0,025-0,15 mg/ml; độ đúng của atropin sulfat từ 98,50-101,38%, benzalkonium clorid từ 99,53-102,36%; độ lặp lại của atropin sulfat và benzalkonium clorid lần lượt là 0,82% và 1,29%.

Từ khóa: Sắc ký lỏng hiệu năng cao, atropin sulfat, benzalkonium clorid.

ABSTRACT: The high performance liquid chromatography method has been developed for simultaneous qualitative and quantitative determination of atropine sulfate and benzalkonium chloride in auto-injector of atropine sulfate.

- Chromatographic conditions include the mobile phase using acetonitrile and 0.1M sodium acetate, pH 5.0 following linear gradient programme; column phenomenex C18 (250 mm x 4.6 mm; 5 μ m), UV detector at 210 nm, flow rate of 1.0 ml/min, volume injection of 20 μ l, time for analysis is about 20 min.

- The results show that analytical method is specific, high linear (the correlation coefficients of atropine sulfate and benzalkonium chloride are 0.9993 and 0.9992, respectively); the linear range of atropine sulfate from 0.5 to 3.0 mg/ml and benzalkonium chloride from 0.025 to 0.15 mg/ml; the trueness of atropine sulfate from 98.50% to 101.38% and benzalkonium chloride of 99.53% to 102.36%; the repeatability of atropine sulfate and benzalkonium chloride are 0.82% and 1.29%, respectively.

Keywords: High performance liquid chromatography, atropine sulfate, benzalkonium chloride.

Chịu trách nhiệm nội dung: TS. Nguyễn Duy Chí, Email: duychi1273@gmail.com

Ngày nhận bài: 17/4/2018; mời phản biện khoa học: 15/5/2018; chấp nhận đăng: 30/5/2018.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ.

Bơm tiêm tự tiêm atropin sulfat là sản phẩm rất cần thiết trong cơ sở thuốc cá nhân để trang bị cho bộ đội tham gia chiến đấu. Trên chiến trường, khi bị nhiễm độc chất độc thần kinh, bơm tiêm tự tiêm được sử dụng để bộ đội tự cứu chữa hoặc cứu chữa lẫn nhau [2]. Lúc này, chỉ cần những thao tác sử dụng đơn giản, thuốc trong bơm tiêm sẽ được tự động bơm vào cơ thể. Trước đây, quân đội ta đã từng được trang bị sản phẩm này từ nguồn viện trợ của nước ngoài. Hiện nay, việc tạo nguồn gặp rất nhiều khó khăn, trong khi nhu cầu về loại bơm tiêm tự tiêm là rất cấp thiết.

Từ yêu cầu đó, Viện Kiểm nghiệm - nghiên cứu dược và trang thiết bị y tế Quân đội đã và đang tiến hành nghiên cứu sản xuất bơm tiêm tự tiêm atropin

sulfat, tạo nguồn dự trữ sẵn sàng chiến đấu và phục vụ huấn luyện. Trong công thức bơm tiêm tự tiêm đang nghiên cứu, có atropin sulfat và chất bảo quản benzalkonium clorid, nhưng chưa có phương pháp phân tích.

Vì vậy, chúng tôi thực hiện đề tài này nhằm xây dựng phương pháp định tính, định lượng đồng thời atropin sulfat và benzalkonium clorid trong bơm tiêm tự tiêm atropin sulfat bằng kỹ thuật sắc ký lỏng hiệu năng cao, kiểm soát chất lượng và xây dựng tiêu chuẩn cơ sở cho bơm tiêm tự tiêm đang được nghiên cứu.

2. VẬT LIỆU, PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU.

2.1. Vật liệu nghiên cứu:

- Acetonitril HPLC (J.T Baker), natri acetat (Merck), acid acetic băng (Merck).

- Chuẩn atropin sulfat - Trung Quốc (lô SX: 20160511; hàm lượng: 100,5% khan; độ ẩm 2,63%); chuẩn benzalkonium clorid - Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương (lô SX: WS0116327.01; hàm lượng: 92,1% nguyên trạng; thành phần C12: 65,99%; C14: 34,01%); nguyên liệu benzalkonium clorid 50% - Nhật Bản (lô SX: 704B2277).

- Bơm tiêm tự tiêm atropin sulfat.

- Các hóa chất và dung môi là loại tinh khiết phân tích, đạt tiêu chuẩn Dược điển Việt Nam IV.

2.2. Dụng cụ và thiết bị:

- Máy sắc ký lỏng hiệu năng cao Shimadzu 10Avp với detector UV-VIS, Nhật Bản.

- Máy sắc ký lỏng hiệu năng cao HP 1100 với detector DAD, Hoa Kỳ.

- Cân phân tích XS 204, Mettler-Toledo, Thụy Sĩ.

- Máy đo pH Seven Compact S220, Mettler - Toledo, Thụy Sĩ.

- Bình định mức, pipet loại Glass A, Đức.

2.3. Phương pháp nghiên cứu:

- Khảo sát điều kiện sắc ký:

+ Dung dịch chuẩn: cân các chất chuẩn và pha loãng bằng pha động để được dung dịch chuẩn có nồng độ atropin sulfat khoảng 2 mg/ml, benzalkonium clorid khoảng 0,1 mg/ml.

+ Dung dịch thử: pha loãng gấp 2 lần dung dịch chế phẩm bằng pha động.

+ Mẫu trắng: là nước cất điều chỉnh đến pH 4,0 bằng acid sulfuric 0,1N (TT).

+ Tiến hành: quét phổ UV-VIS của dung dịch chuẩn atropin sulfat và benzalkonium clorid để lựa chọn bước sóng phát hiện, khoảng nồng độ định lượng. Tiến hành sắc ký dung dịch chuẩn, dung dịch thử và mẫu trắng theo các điều kiện sắc ký khác nhau để tìm điều kiện tách riêng phù hợp.

- Thẩm định phương pháp phân tích: tiến hành

thẩm định tính tương thích của hệ thống và độ đặc hiệu, độ tuyến tính và khoảng xác định, độ lặp lại, độ đúng của phương pháp theo hướng dẫn của USP 38 [6] và ICH [5].

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU.

3.1. Kết quả khảo sát điều kiện sắc ký:

- Pha động: dung dịch natri acetat 0,1M, pH 5,0

- acetonitril theo chương trình gradient:

Thời gian (phút)	Tỉ lệ acetonitril
0,01	32%
3,00	78%
12,00	78%
14,00	32%
20,00	32%

- Cột Phenomenex C18 (250 mm x 4,6 mm; 5 µm).

- Detector UV: 210 nm.

- Tốc độ dòng: 1,0 ml/ phút .

- Thể tích tiêm mẫu: 20 µl.

- Thời gian phân tích cho một mẫu: 20 phút.

Tiến hành sắc ký với điều kiện nêu trên, kết quả cho thấy, trên sắc ký đồ atropin sulfat có 1 pic, benzalkonium clorid có 2 pic C12 và C14. Tất cả các pic của atropin sulfat, benzalkonium clorid C12 và benzalkonium clorid C14 đều cân xứng, tách riêng biệt. Do vậy, chúng tôi lựa chọn điều kiện này để thẩm định phương pháp.

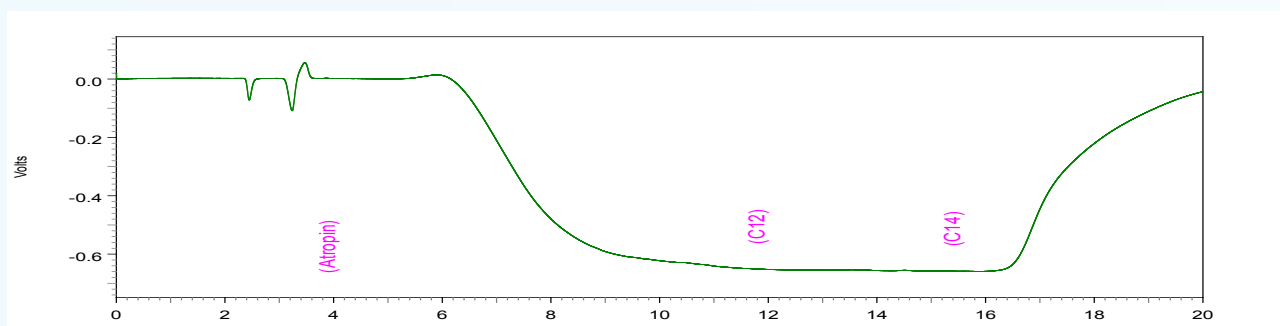
3.2. Kết quả thẩm định phương pháp:

3.2.1. Tính tương thích của hệ thống và độ đặc hiệu của phương pháp:

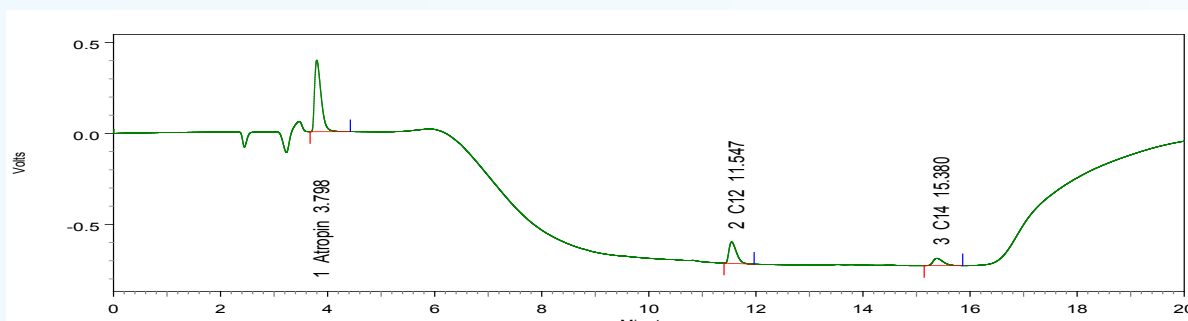
Tiêm lặp lại 6 lần mẫu trắng, dung dịch chuẩn, dung dịch thử để xác định thời gian lưu, diện tích pic và hệ số bất đối xứng của atropin sulfat, benzalkonium clorid C12 và C14. Đồng thời, so sánh phổ DAD của các pic chuẩn và pic thử tương ứng để định tính và xác định tính đặc hiệu của phương pháp.

Bảng 1. Tính tương thích của hệ thống (n = 6, thời gian lưu: phút; đơn vị diện tích pic: µAU.s).

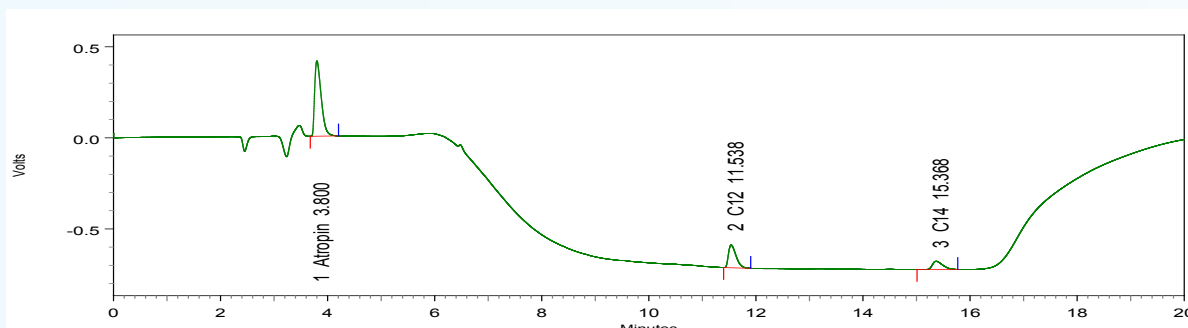
Số thứ tự	Atropin sulfat			Benzalkonium clorid C12			Benzalkonium clorid C14		
	Thời gian lưu	Diện tích pic	Hệ số bất đối xứng	Thời gian lưu	Diện tích pic	Hệ số bất đối xứng	Thời gian lưu	Diện tích pic	Hệ số bất đối xứng
1	3,798	3.222.847	1,80	11,572	1.143.378	1,79	15,432	527.904	1,56
2	3,800	3.272.269	1,80	11,562	1.149.496	1,77	15,417	545.059	1,59
3	3,802	3.293.613	1,78	11,563	1.144.075	1,74	15,407	531.200	1,55
4	3,802	3.278.802	1,80	11,555	1.141.477	1,76	15,395	534.184	1,60
5	3,798	3.305.925	1,80	11,547	1.144.747	1,77	15,380	525.226	1,52
6	3,797	3.310.443	1,69	11,528	1.165.256	1,75	15,353	530.252	1,62
Tr.bình	3,800	3.280.650	1,78	11,555	1.148.072	1,76	15,397	532.304	1,57
RSD%	0,06	0,97		0,13%	0,77		0,18	1,30	



Hình 3.1. Sắc ký đồ của mẫu trắng.



Hình 3.2. Sắc ký đồ của dung dịch chuẩn atropin sulfat 2 mg/ml và benzalkonium clorid 0,1 mg/ml.



Hình 3.3. Sắc ký đồ của dung dịch thử.

Trên sắc ký đồ của mẫu thử các pic tách nhau hoàn toàn, cùng thời gian lưu với các pic của atropin sulfat, benzalkonium clorid C12 và C14 trên sắc ký đồ của dung dịch chuẩn (tương ứng là 3,8 phút, 11,5 phút và 15,4 phút). Trên sắc ký đồ của mẫu trắng không xuất hiện pic tại thời gian lưu của các pic chính. Khi so sánh phổ DAD của các pic tương ứng với atropin sulfat, benzalkonium clorid C12 và C14 cho thấy, phổ của chuẩn và thử gần như chồng khít lên nhau với hệ số match tương ứng là 999,96; 999,97 và 999,74. Các pic được tách riêng cân xứng, thời gian lưu và diện tích pic ổn định (RSD < 2%). Như vậy, phương pháp có độ đặc hiệu cao, phù hợp để định tính, định lượng đồng thời atropin sulfat và benzalkonium clorid trong chế phẩm.

3.2.2. Độ tuyến tính và khoảng xác định:

Pha dãy dung dịch chuẩn có nồng độ atropin sulfat từ 0,5-3,0 mg/ml; benzalkonium clorid từ 0,025-0,15 mg/ml. Tiến hành sắc ký theo điều kiện đã khảo sát, lập phương trình đường chuẩn để xác định mối tương quan giữa nồng độ và diện tích pic. Tiến hành 5 đường chuẩn riêng biệt, tính đường chuẩn trung bình. Kết quả thu được như trong bảng 3.2 và 3.3:

Bảng 2. Kết quả khảo sát khoảng tuyến tính của atropin sulfat.

Nồng độ (mg/ml)		0,5	1	1,5	2	2,5	3
Diện tích pic (μAU.s)	Trung bình	997.006	1.705.640	2.362.068	2.934.286	3.523.005	4.150.780
	SD	4.669,6	17.122,7	16.542,8	28.299,4	37.832,1	35.542,6
Phương trình hồi quy		$y = 1.245.324,72x + 432.812,64$					
Hệ số tương quan r		0,9993					

Bảng 3. Kết quả khảo sát khoảng tuyến tính của benzalkonium clorid.

Nồng độ (mg/ml)		0,025	0,05	0,075	0,1	0,125	0,15
Diện tích pic (tổng diện tích pic của C ₁₂ và C ₁₄)(μ AU.s)	Trung bình	389.047	786.861	1.227.816	1.597.739	1.956.073	2.311.530
	SD	6.145,2	14.744,3	18.812,6	17.165,4	20.100,1	28.784,4
Phương trình hồi quy		$y = 15.417.109,15x + 29.180,75$					
Hệ số tương quan r		0,9992					

Kết quả cho thấy, có sự tương quan tuyến tính chặt chẽ giữa nồng độ và diện tích pic của atropin sulfat trong khoảng nồng độ từ 0,5-3,0 mg/ml và của benzalkonium clorid trong khoảng nồng độ từ 0,025-0,15 mg/ml, với hệ số tương quan tương ứng là $r = 0,9993$ và $0,9992$.

3.2.3. Độ lặp lại:

Độ lặp lại được tiến hành dựa trên việc định lượng 6 lần riêng biệt mẫu thử có nồng độ atropin sulfat khoảng 2 mg/ml, benzalkonium clorid khoảng 0,1 mg/ml. Tính nồng độ của các chất trong mẫu thử dựa trên phương trình đường chuẩn, từ đó tính độ lệch chuẩn tương đối (RSD%). Kết quả được trình bày trong bảng 4.

Bảng 4. Kết quả đánh giá độ lặp lại của phương pháp ($n = 6$).

Số thứ tự	Atropin sulfat		Benzalkonium clorid	
	Diện tích pic (μ AU.s)	Nồng độ (mg/ml)	Tổng diện tích pic của C12 và C14 (μ AU.s)	Nồng độ (mg/ml)
1	3.181.789	2,2074	1.811.197	0,0984
2	3.245.475	2,2586	1.817.527	0,0988
3	3.231.514	2,2474	1.812.707	0,0985
4	3.228.004	2,2445	1.820.583	0,0990
5	3.205.885	2,2268	1.821.535	0,0991
6	3.208.144	2,2286	1.769.930	0,0957
Trung bình		2,236		0,098
SD		0,018		0,001
RSD%		0,82		1,29

Phương pháp có độ lặp lại tốt với cả atropin sulfat (RSD = 0,82%) và benzalkonium clorid (RSD = 1,29%).

3.2.4. Độ đúng:

Kết quả đánh giá độ đúng của phương pháp khi tiến hành lặp lại 3 lần thêm chuẩn với nồng độ atropin sulfat khoảng 1,0; 1,5 và 2,0 mg/ml; benzalkonium clorid khoảng 0,025; 0,050 và 0,075 mg/ml vào mẫu thử (đã pha loãng 4 lần). Kết quả thu được:

Bảng 5. Kết quả đánh giá độ đúng của atropin sulfat.

Số thứ tự	Diện tích pic (μ AU.s)	Lượng cân mẫu chuẩn (mg)	Lượng có sẵn (mg)	Lượng thêm vào (mg)	Lượng tìm lại (mg)	% tìm lại	Trung bình % tìm lại	RSD%
1	3.014.217	253,1	21,37	19,81	20,09	101,38	100,28	0,96
2	2.987.402	252,1	21,37	19,74	19,66	99,60		
3	2.977.903	249,5	21,37	19,53	19,50	99,86		
4	3.594.855	253,1	21,37	29,72	29,41	98,96	99,11	0,28
5	3.596.210	252,1	21,37	29,60	29,43	99,43		
6	3.568.325	249,5	21,37	29,30	28,99	98,93		
7	4.219.585	253,1	21,37	39,63	39,45	99,54	99,50	0,99
8	4.184.260	252,1	21,37	39,47	38,88	98,50		
9	4.207.017	249,5	21,37	39,07	39,24	100,46		

Bảng 6. Kết quả đánh giá độ đúng của benzalkonium clorid.

Số thứ tự	Tổng diện tích pic của C12 và C14 (μ AU.s)	Lượng cân mẫu chuẩn (mg)	Lượng có sẵn (mg)	Lượng thêm vào (mg)	Lượng tìm lại (mg)	% tìm lại	Trung bình % tìm lại	RSD%
1	1.361.038	62,7	1,148	0,577	0,579	100,34	100,23	0,54
2	1.353.033	62,0	1,148	0,571	0,569	99,65		
3	1.379.184	65,0	1,148	0,599	0,603	100,72		
4	1.814.927	62,7	1,148	1,155	1,168	101,15	101,18	1,14
5	1.815.495	62,0	1,148	1,142	1,169	102,36		
6	1.837.781	65,0	1,148	1,197	1,198	100,05		
7	2.263.414	62,7	1,148	1,732	1,750	101,02	100,64	0,97
8	2.252.937	62,0	1,148	1,713	1,736	101,36		
9	2.292.310	65,0	1,148	1,796	1,788	99,53		

Kết quả cho thấy độ đúng của atropin sulfat từ 98,50-101,38%; của benzalkonium clorid từ 99,53-102,36% với độ lệch chuẩn tương đối đều < 2%. Như vậy, phương pháp có độ đúng cao, đáp ứng được yêu cầu về độ đúng của một phương pháp phân tích.

4. KẾT LUẬN.

Nghiên cứu xây dựng và thẩm định phương pháp định tính, định lượng đồng thời atropin sulfat cùng benzalkonium clorid trong bơm tiêm tự tiêm atropin sulfat bằng kỹ thuật sắc ký lỏng hiệu năng cao, kiểm soát chất lượng và xây dựng tiêu chuẩn cơ sở cho bơm tiêm tự tiêm đang được nghiên cứu, cho kết quả:

- Điều kiện sắc ký gồm: pha động là acetonitril và dung dịch natri acetat 0,1M, pH 5,0, theo chương trình gradient, cột phenomenex C18 (250 mm x 4,6 mm; 5 μ m), detector UV ở bước sóng 210 nm, tốc độ dòng 1,0 ml/phút, thể tích tiêm mẫu 20 μ l, thời gian phân tích mẫu 20 phút.

- Phương pháp đáp ứng đầy đủ các yêu cầu của một phương pháp phân tích với độ đặc hiệu cao, khoảng tuyến tính của atropin sulfat từ 0,5-3,0 mg/ml, benzalkonium clorid từ 0,025-0,15 mg/ml; độ lặp lại tốt với cả atropin sulfat (RSD = 0,82%) và benzalkonium clorid (RSD = 1,29%); độ đúng của atropin sulfat từ 98,50-101,38%, benzalkonium clorid từ 99,53-102,36%.

TÀI LIỆU THAM KHẢO:

1. Bộ Y tế - Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương (2007), *Đảm bảo chất lượng thuốc và một số phương pháp kiểm nghiệm thuốc*, Tài liệu đào tạo (lưu hành nội bộ), Hà Nội.

2. Học viện Quân y - Bộ môn Độc học và phóng xạ quân sự (2002), *Độc học và phóng xạ quân sự*, Nhà xuất bản Quân đội nhân dân, Hà Nội.

3. Phạm Thị Hà, Phạm Hồng Minh, Trần Thúy Hạnh (2016), "Định lượng Benzalkonium clorid trong dung dịch dùng ngoài Medigyno có chứa tá dược natri lauryl sulfat bằng phương pháp HPLC", *Tạp chí Kiểm nghiệm thuốc*, số 3, tập 14 (53), trang 13-16.

4. British Pharmacopoeia (2010), Vol I, Vol III, pp. 193-195; 231-235. pp. 2.385-2.386.

5. International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human (2005), *Validation of Anatical Procedures: Text and Methodology Q2 (R1)*, ICH Harmonised Tripartite Guideline.

6. The United States Pharmacopoeia 38 (2015).

7. Vaghasiya Vivek, Kashyap Raval (2016), "HPLC method development and validation for simultaneous estimation of atropine sulfate and dexamethasone", *Journal of Advance Research in Biology & Pharmacy Research*, Vol 2, Issue 3, pp. 14.□

TIẾP TỤC THỰC HIỆN HIỆU QUẢ CÔNG TÁC PHÒNG, CHỐNG...

(Tiếp theo trang 8)

Chế độ báo cáo. Đến nay, tình hình SR trên cả nước và trong toàn quân đã giảm mạnh. Nhiều đơn vị trong thời gian dài không có ca bệnh SR. Do đó, chế độ báo cáo về công tác PCSR thực hiện như sau:

- Các đơn vị nằm trong vùng SR lưu hành vừa và nặng (các tỉnh khu vực miền Trung - Tây Nguyên; miền Đông Nam Bộ): thực hiện báo cáo theo tháng như quy định.

- Các đơn vị khác: thực hiện báo cáo 6 tháng, 12 tháng và báo cáo khi có ca bệnh SR.

- Đơn vị có bệnh nhân SR: phải có phiếu báo cáo ca bệnh từng trường hợp kèm theo.□