

F3 = 5 khi thời gian thử nghiệm chỉ có 13 tuần (> 3 tháng);

F4 = 1 khi không thấy độc tính nghiêm trọng nào;

F5 = 1 khi “mức không phát hiện gây độc hại” (NOEL) được xác định.

Phương trình dùng cho khí lý tưởng $PV = nRT$ được áp dụng để chuyển hàm lượng chất khí trong thử nghiệm dùng phương pháp xông (inhalation studies) từ đơn vị phần triệu thành đơn vị mg/l hay mg/m³.

Hãy xét thử nghiệm độc tính sinh sản trên chuột trắng bằng cách xông khí carbon tetrachlorid (khối lượng phân tử 153,84) đã được tóm tắt trong *Pharmaeuropa Vol 9. No1. Supplement April 1997, p.S9*:

$$\frac{n}{V} = \frac{P}{RT} = \frac{300 \times 10^{-6} \text{ atm} \times 153840 \text{ mg mol}^{-1}}{0,082 \text{ L atm K}^{-1} \text{ mol}^{-1} \times 298 \text{ K}} = \frac{46,15 \text{ mg}}{24,45 \text{ L}} = 1,89 \text{ mg/L}$$

Dùng công thức $1000 \text{ L} = 1 \text{ m}^3$ để suy ra hàm lượng mg/m³

Bảng 10.14.1-5 - Các giá trị dùng tính toán trong tài liệu này

| | |
|--|--------------|
| Trọng lượng chuột cống trắng (Rat) | 425 g |
| Trọng lượng chuột cống trắng có thai (Pregnant rat) | 330 g |
| Trọng lượng chuột nhắt (Mouse) | 28 g |
| Trọng lượng chuột nhắt có thai (Pregnant mouse) | 30 g |
| Trọng lượng chuột lang (Guinea – pig) | 500 g |
| Trọng lượng khỉ Ấn Độ (Rhesus monkey) | 25 kg |
| Trọng lượng thỏ (có thai hoặc không có thai) | 4 kg |
| Trọng lượng chó săn nhỏ (Beagle dog) | 11,5 kg |
| Dung lượng hô hấp của chuột trắng (Rat respiratory volume) | 290 L/ngày |
| Dung lượng hô hấp của chuột nhắt | 43 L/ngày |
| Dung lượng hô hấp của thỏ | 1440 L/ngày |
| Dung lượng hô hấp của chuột lang | 430 L/ngày |
| Dung lượng hô hấp của người | 28800 L/ngày |
| Dung lượng hô hấp của chó | 9000 L/ngày |
| Dung lượng hô hấp của khỉ | 1150 L/ngày |
| Lượng nước chuột nhắt dùng | 5 ml/ngày |
| Lượng nước chuột trắng dùng | 30 ml/ngày |
| Lượng thức ăn chuột trắng dùng | 30 g/ngày |

10.15 XÁC ĐỊNH ETHYLEN OXYD VÀ DIOXAN TỒN DƯ

Thử nghiệm này xác định ethylen oxyd và dioxan tồn dư trong các chất tan trong nước hay trong dimethylacetamid.

Đối với các chất không tan hoặc tan không hoàn toàn trong các dung môi trên, việc chuẩn bị dung dịch mẫu thử và các điều kiện sắc ký khí tiêm pha hơi được quy định trong chuyên luận riêng.

Xác định bằng phương pháp sắc ký khí (Phụ lục 5.2), kỹ thuật tiêm pha hơi (*head-space gas chromatography*).

Phương pháp 1: Dùng cho chất thử hòa tan hay trộn đều được trong nước.

Dung dịch thử: Cân 1,00 g (M_T) chất thử vào một lọ nhỏ 10 ml (hoặc có thể tích thích hợp) và thêm 1,0 ml nước. Đóng nắp lọ và trộn đều thu được dung dịch đồng nhất. Để yên ở 70 °C trong 45 min.

Dung dịch đối chiếu (a): Cân 1,00 g (M_C) chất thử vào một lọ nhỏ như trên, thêm 0,50 ml dung dịch ethylen oxyd (TT₃) và 0,50 ml dung dịch dioxan (TT₁). Đóng nắp lọ và trộn đều để thu được một dung dịch đồng nhất. Để yên ở 70 °C trong 45 min.

Dung dịch đối chiếu (b): Trong lọ nhỏ thể tích 10 ml, thêm vào 0,50 ml dung dịch ethylen oxyd (TT₃), 0,10 ml dung dịch acetaldehyd (TT) 0,001 % mới pha và 0,10 ml dung dịch dioxan (TT₁). Đóng nắp lọ và trộn đều để thu được dung dịch đồng nhất. Để yên ở 70 °C trong 45 min.

Phương pháp 2: Dùng cho các chất thử hòa tan hay trộn đều được trong dimethylacetamid.

Dung dịch thử: Cân 1,00 g (M_T) chất thử vào một lọ nhỏ 10 ml (hoặc có thể tích thích hợp) và thêm 1,0 ml dimethylacetamid (TT) và 0,2 ml nước. Đóng nắp lọ và trộn đều để thu được dung dịch đồng nhất. Để yên ở 90 °C trong 45 min.

Dung dịch đối chiếu (a): Cân 1,00 g (M_C) chất thử vào một lọ nhỏ như trên, thêm 1,0 ml dimethylacetamid (TT), thêm 0,10 ml dung dịch dioxan (TT) và 0,10 ml dung dịch ethylen oxyd (TT₂). Đóng nắp lọ và trộn đều để thu được một dung dịch đồng nhất. Để yên ở 90 °C trong 45 min.

Dung dịch đối chiếu (b): Trong lọ nhỏ thể tích 10 ml, thêm vào 0,10 ml dung dịch ethylen oxyd (TT₂), 0,10 ml dung dịch acetaldehyd (TT) 0,01 % mới pha và 0,10 ml dung dịch dioxan (TT). Đóng nắp lọ và trộn đều để thu được dung dịch đồng nhất. Để yên ở 70 °C trong 45 min.

Quá trình sắc ký

Điều kiện tiêm pha hơi

Nhiệt độ cân bằng: 70 °C (90 °C đối với dung dịch trong dimethylacetamid).

Thời gian cân bằng: 45 min.

Nhiệt độ dòng chảy: 75 °C (150 °C đối với dung dịch trong dimethylacetamid).

Thời gian điều áp: 1 min.

Khí mang: Heli dùng cho sắc ký khí.

Thời gian tiêm: 12 s.

Điều kiện sắc ký

Cột thủy tinh hoặc thạch anh kích thước (30 m × 0,32 mm), mặt trong được phủ lớp polydimethylsiloxan dày 1,0 μm.

Khí mang: Heli (hoặc nitrogen) dùng cho sắc ký khí, tốc độ dòng khoảng 20 cm/s, tỷ lệ chia dòng 1 : 20.

Detector: ion hóa ngọn lửa.

Duy trì nhiệt độ cột ở 50 °C trong 5 min, sau đó tăng đến 180 °C với tốc độ 5 °C/min, sau đó lại tăng đến 230 °C với tốc độ 30 °C/min và giữ ở 230 °C trong 5 min. Nhiệt độ detector là 250 °C, nhiệt độ buồng tiêm là 150 °C.

Tiêm một lượng thích hợp pha hơi của dung dịch đối chiếu (b), chẳng hạn 1 ml. Điều chỉnh độ nhạy của hệ thống sao cho chiều cao các pic cho bởi ethylen oxyd và acetaldehyd trong sắc ký đồ đạt ít nhất 15 % thang đo. Thử nghiệm không có hiệu lực nếu hệ số phân giải giữa pic cho bởi acetaldehyd và pic cho bởi ethylen oxyd nhỏ hơn 2,0 và pic của dioxan và ethylene oxyd được phát hiện với tỷ lệ tín hiệu/nhiều nhỏ hơn 5.

Tiêm lần lượt những lượng thích hợp pha hơi của dung dịch thử và dung dịch đối chiếu (a), chẳng hạn 1 ml (hoặc bằng lượng dung dịch đối chiếu (b) đã tiêm).

Tiêm lặp lại như trên thêm 2 lần nữa.

Diện tích trung bình của pic ethylen oxyd và dioxan trong sắc ký đồ cho bởi dung dịch thử không được lớn hơn một nửa (1/2) diện tích trung bình của pic tương ứng trong sắc ký đồ cho bởi dung dịch đối chiếu (a) (1 phần triệu ethylen oxyd và 50 phần triệu dioxan).

Kiểm tra độ tin cậy

Tính hiệu số của diện tích pic, theo từng cặp, cho bởi dung dịch thử và dung dịch đối chiếu (a), lần lượt ứng với ethylen oxyd và với dioxan. Thử nghiệm chỉ có hiệu lực nếu độ lệch chuẩn tương đối của ba giá trị khác biệt (3 hiệu số) ứng với ethylen oxyd không lớn hơn 15 % và độ lệch chuẩn tương đối của ba giá trị khác biệt (3 hiệu số) ứng với dioxan không lớn hơn 15 %.

Nếu lượng cân mẫu thử và chất đối chiếu nằm ngoài khoảng 0,995 g đến 1,005 g cần phải hiệu chỉnh kết quả cho thích hợp.

Hàm lượng ethylen oxyd tính theo phần triệu được tính bằng biểu thức:

$$A_T \times C / [(A_C \times M_T) - (A_T \times M_C)]$$

Trong đó:

A_T là diện tích pic tương ứng với ethylen oxyd trong sắc ký đồ cho bởi dung dịch thử;

A_C là diện tích pic tương ứng với ethylen oxyd trong sắc ký đồ cho bởi dung dịch đối chiếu (a);

M_T là khối lượng chất thử trong dung dịch thử tính theo gam;

M_C là khối lượng chất thử trong dung dịch đối chiếu (a) tính theo gam;

C là khối lượng ethylen oxyd cho vào dung dịch đối chiếu (a) tính theo microgram.

Và hàm lượng dioxan tính theo phần triệu được tính bằng biểu thức:

$$D_T \times C / [(D_C \times M_T) - (D_T \times M_C)]$$

Trong đó:

D_T là diện tích pic tương ứng với dioxan trong sắc ký đồ cho bởi dung dịch thử;

D_C là diện tích pic tương ứng với dioxan trong sắc ký đồ cho bởi dung dịch đối chiếu (a);

M_T là khối lượng chất thử trong dung dịch thử tính theo gam;
 M_C là khối lượng chất thử trong dung dịch đối chiếu (a) tính theo gam;

C là khối lượng dioxan cho vào dung dịch đối chiếu (a) tính theo microgram.

10.16 ĐỊNH LƯỢNG *N,N*-DIMETHYLANILIN

Xác định bằng phương pháp sắc ký khí (Phụ lục 5.2).

Phương pháp 1

Dung dịch chuẩn nội: Hòa tan 50 mg *N,N*-diethylanilin (TT) trong 4 ml dung dịch acid hydrochloric 0,1 M (TT), pha loãng bằng nước tới 50 ml. Pha loãng 1 ml dung dịch thu được tới 100 ml bằng nước.

Dung dịch thử: Hòa tan 0,50 g chế phẩm trong 30,0 ml nước, thêm 1,0 ml dung dịch chuẩn nội. Điều chỉnh nhiệt độ của dung dịch tới 26 °C đến 28 °C. Thêm 1,0 ml dung dịch natri hydroxyd 40 % (TT). Lắc cho tan hoàn toàn. Thêm 2,0 ml trimethylpentan (TT). Lắc 2 min, để yên cho tách lớp, dùng lớp trên.

Dung dịch đối chiếu: Hòa tan 50,0 mg *N,N*-dimethylanilin (TT) trong 4,0 ml dung dịch acid hydrochloric 0,1 M (TT), pha loãng bằng nước tới 50,0 ml. Pha loãng 1 ml dung dịch thu được tới 100,0 ml bằng nước. Tiếp tục pha loãng 1,0 ml dung dịch thu được tới 30,0 ml bằng nước, thêm 1,0 ml dung dịch chuẩn nội, 1,0 ml dung dịch natri hydroxyd 40 % (TT), 2,0 ml trimethylpentan (TT). Lắc 2 min, để yên cho tách lớp, dùng lớp trên.

Điều kiện sắc ký

Cột mao quản bằng silica nung chảy, dài 25 m, đường kính trong 0,32 mm, phủ lớp polymer liên kết mạng polymethylphenylsiloxan dày 0,52 µm.

Khí mang: Heli dùng cho sắc ký khí, tỷ lệ chia dòng 1 : 20, áp suất đầu cột 5 kPa, lưu lượng 20 ml/min.

Detector ion hóa ngọn lửa.

Bộ chia dòng (*split-liner*) là một cột dài khoảng 1 cm, nhồi diatomit dùng cho sắc ký khí tẩm 10 % (kl/kl) polydimethylsiloxan.

Nhiệt độ: Duy trì nhiệt độ cột 150 °C trong 5 min, sau đó tăng đến 275 °C với tốc độ 20 °C/min, rồi giữ ở 275 °C trong 3 min. Nhiệt độ detector 300 °C, nhiệt độ buồng tiêm 220 °C.

Thể tích tiêm: 1 µl.

Thời gian lưu của *N,N*-dimethylanilin khoảng 3,6 min; của *N,N*-diethylanilin khoảng 5,0 min.

Phương pháp 2

Dung dịch chuẩn nội: Dung dịch naphtalen (TT) 0,005 % trong cyclohexan (TT).

Dung dịch thử: Hòa tan 1,00 g chế phẩm với 5 ml dung dịch natri hydroxyd 1 M (TT) trong ống thủy tinh có nút mài, thêm 1,0 ml dung dịch chuẩn nội. Đậy kín, lắc mạnh trong 1 min. Ly tâm nếu cần, dùng lớp trên.

Dung dịch đối chiếu: Thêm 2 ml acid hydrochloric (TT) và 20 ml nước vào 50,0 mg *N,N*-dimethylanilin (TT), lắc