

#### 4.4. ỨNG DỤNG SẮC KÝ KHÍ TRONG KIỂM NGHIỆM THUỐC

Sắc ký khí có thể phân tích được những chất bay hơi được ở điều kiện phân tích, không phân hủy. Có thể đặt nhiệt độ cột thấp hơn nhiệt độ sôi của chất phân tích nhưng nếu áp suất hơi đủ lớn vẫn phân tích được bằng GC. Đa số các chất khí có mùi mà mũi người phát hiện được có thể phân tích bằng GC. Những chất phân cực, ít bay hơi phản ứng với thuốc thử thích hợp thành các dẫn xuất ổn định, dễ bay hơi và ít phân cực và phân tích được bằng sắc ký khí.

##### 4.4.1. Định tính

Tương tự như đối với HPLC. Mẫu thử được thực hiện song song với mẫu chuẩn và so sánh thời gian lưu pic chất phân tích trên sắc ký đồ của mẫu thử và mẫu chuẩn, nếu trùng nhau thì được coi là dương tính.

Một cách định tính nữa cũng được sử dụng là dựa vào thời gian lưu tương đối. Trong sắc ký khí hay sử dụng tỷ số thời gian lưu của pic chất phân tích và thời gian lưu pic của một chất đã biết là chất chuẩn nội. Ví dụ, định tính một hóa chất bảo vệ thực vật nhóm phospho hữu cơ trong dược liệu theo Dược điển Việt Nam V, dựa vào thời gian lưu tương đối của chất phân tích với chất chuẩn nội carbophenothion. Điều kiện phân tích gồm cột tách poly(dimethyl)siloxan (30 m × 0,32 mm; 0,25 μm); khí mang: H<sub>2</sub>/He/N<sub>2</sub>; detector: NPD; chương trình nhiệt độ buồng cột: 80°C trong 1 phút, tăng 30°C/ phút tới 150°C, duy trì trong 3 phút, tăng 4°C/ phút tới 280°C và duy trì trong 1 phút; nhiệt độ bộ phận tiêm mẫu: 250°C; nhiệt độ detector: 275°C; thể tích tiêm mẫu: đảm bảo thời gian lưu tương đối tương đối đạt yêu cầu như Bảng 4.8.

**Bảng 4.8.** Thời gian lưu tương đối của một số hóa chất bảo vệ thực vật nhóm phospho hữu cơ so sánh với carbophenothion (Dược điển Việt Nam V)

TT	Hợp chất	Thời gian lưu tương đối	TT	Hợp chất	Thời gian lưu tương đối
1	Diclorvos	0,20	8	Parathion	0,69
2	Fonofos	0,50	9	Clorpyrifos	0,70
3	Diazinon	0,52	10	Methidathion	0,78
4	Parathion - methyl	0,59	11	Ethion	0,96
5	Clorpyrifos - methyl	0,60	12	Carbophenothion	1,00
6	Pirimiphos - methyl	0,66	13	Azinphos - methyl	1,17
7	Malathion	0,67	14	Phosalon	1,18

Đối với GC - MS, định tính còn dựa vào so sánh tỷ lệ m/z của các mảnh phổ (hoặc chồng phổ khối) của mẫu thử với chuẩn làm song song hoặc trong thư viện phổ. Khi định tính dựa vào thư viện phổ, thiết bị GC - MS có độ phân giải càng cao thì độ chính xác của phép thử càng được nâng lên, đặc biệt đối với chất chưa biết. Thông thường yêu cầu độ phân giải của thiết bị  $\geq 10^4$ .



#### 4.4.2. Định lượng

Nhiều dược chất, tá dược dạng nguyên liệu và chế phẩm được định lượng bằng GC. Detector sử dụng nhiều nhất là FID do chất phân tích chủ yếu là các hydrocarbon. Phương pháp chuẩn nội thường được sử dụng để đảm bảo chính xác lượng mẫu sắc ký vì thể tích mẫu phân tích trong GC rất nhỏ. Phương pháp chuẩn hóa diện tích cũng được sử dụng định lượng trong một số trường hợp. Cột sắc ký chủ yếu là cột mao quản loại WCOT. Bản chất pha tĩnh, cũng như yêu cầu kỹ thuật của cột tách (chiều dài, đường kính trong, bề dày lớp pha tĩnh) được lựa chọn tùy thuộc vào đặc tính chất phân tích. Khi định lượng mẫu đơn giản có thể thực hiện ở điều kiện đẳng nhiệt cột, còn nếu tách mẫu phức tạp chương trình hóa nhiệt độ cột được sử dụng. Chất phân tích có thể được phân tích trực tiếp hoặc dẫn xuất tùy theo đặc tính bay hơi của nó. Dung dịch mẫu thử và dung dịch mẫu chuẩn thường có nồng độ xấp xỉ bằng nhau, một số trường hợp thiết lập đường chuẩn thì nồng độ dung dịch thử phải nằm trong khoảng nồng độ tuyến tính của đường chuẩn. Phép định lượng yêu cầu làm lặp lại tối thiểu 2 lần với mẫu chuẩn và 3 lần với mẫu thử, từ đó xác định hàm lượng trung bình để báo cáo kết quả với RSD không được lớn hơn 2,0%.

Bảng 4.9 trình bày ví dụ định lượng một số nguyên liệu và chế phẩm thuốc bằng GC theo Dược điển Việt Nam V và Dược điển Mỹ.

**Bảng 4.9.** Một số nguyên liệu và chế phẩm được định lượng bằng GC

Chất phân tích (tiêu chuẩn)	Điều kiện sắc ký	Mẫu thử, phương pháp định lượng
Dầu gấc Hàm lượng acid linoleic $\geq 10\%$ , acid oleic $\geq 30\%$ (ĐBVN 5)	Cột mao quản HP1 - poly(dimethyl)siloxan (30 m $\times$ 0,32 mm; 0,25 $\mu$ m) Khí mang: N <sub>2</sub> , tốc độ 1 ml/min Detector: FID; 290°C Nhiệt độ cột: Ban đầu 100°C giữ trong 2 min, tăng đến 200°C với tốc độ 10°C/min, giữ trong 3 min; tăng đến 250°C với tốc độ 5°C/min, giữ trong 5 min. Nhiệt độ buồng tiêm: 250°C Thể tích tiêm: 1 $\mu$ l; tỷ lệ chia dòng: 5 : 1	Mẫu thử được xử phòng hóa bằng dung dịch NaOH trong MeOH, sau đó chuyển dạng ester với methanol, xúc tác là BF <sub>3</sub> . Chuẩn nội: acid pentadecanoic. Tính kết quả theo phương pháp chuẩn nội.
All - rac - alpha tocopherol (ĐBVN 5 và USP)	Cột: poly (dimethyl) siloxan (30 m $\times$ 0,25 mm; 0,25 $\mu$ m) Khí mang: Heli Detector: FID, 290°C Nhiệt độ cột: 280°C (đẳng nhiệt) Nhiệt độ buồng tiêm: 290°C Tốc độ dòng 1 ml/min. Thể tích tiêm: 1 $\mu$ l; tỷ lệ chia dòng: 1 : 100	Phân tích trực tiếp. Chuẩn nội squalan. Tính kết quả theo phương pháp chuẩn nội.
Menthol 98,0% - 102,0% (USP)	Detector: FID, 250°C Cột: Polyethylene glycol (M ~ 15000) (0,53 mm $\times$ 30 m; 1 $\mu$ m), đẳng nhiệt 130°C Cổng tiêm: 250°C Khí mang: He tốc độ 10 mL/min Tiêm mẫu: 1 $\mu$ L; tỷ lệ chia dòng 10:1	Phân tích trực tiếp. Chuẩn nội anethol. Tính kết quả theo phương pháp chuẩn nội.



Viên nén atropin dạng atropin sulfat (USP) 90,0% - 110,0% hàm lượng ghi trên nhãn	Detector: FID, 250°C Cột nhồi: 3% pha tĩnh 50% Phenyl 50% methylpolysiloxan với chất mang S1AB* (2 mm × 1,8 m), đẳng nhiệt 225°C Cổng tiêm: 250°C Khí mang: N <sub>2</sub> tốc độ 25 mL/min Tiêm mẫu: 1 µL	Atropin sulfat được chuyển về dạng base sau khi kiềm hóa và được chiết vào dung môi hữu cơ. Chuẩn nội homatropin hydrobromid. Tính kết quả theo phương pháp chuẩn nội.
Magnesi stearat (ĐBVN 5) Hàm lượng acid stearic ≥ 40%; tổng lượng acid stearic và acid palmitic ≥ 90%	Cột: Silica phủ pha tĩnh macrogol 20000 (30 m × 0,32 mm; 0,5 µm) Khí mang: Heli, tốc độ 2,4 ml/min. Detector: FID; 260°C Nhiệt độ cột: Ban đầu 70°C giữ trong 2 min, tăng đến 240°C với tốc độ 5°C/min, giữ trong 5 min. Thể tích tiêm: 1 µl Nhiệt độ buồng tiêm: 220°C	Mẫu thử được chuyển dạng ester với thuốc thử BF <sub>3</sub> trong methanol. Tính kết quả theo phương pháp chuẩn hóa diện tích. Xác định pic ứng với chất phân tích dựa vào so sánh thời gian lưu pic chất phân tích của dung dịch thử và dung dịch chuẩn làm song song.

*S1AB\*: Đất silic loại dùng cho sắc ký khí được nung bằng cách trộn diatomit với natri carbonat và nung ở nhiệt độ trên 900°C. Đất silic được rửa với acid và base, sau khi rửa với acid và base, đều rửa với nước đến trung tính.*

Trong bào chế thuốc tiêm, thuốc nhỏ mắt, nhỏ tai, một thành phần quan trọng trong đó là các chất làm giảm thiểu nguy cơ xâm nhập của vi khuẩn cho phần còn lại sau khi đã dùng một phần chế phẩm, đó là các chất bảo quản kháng khuẩn. Các ester của acid p - hydroxybenzoic, phenol, benzyl alcol và clorobutanol là các chất bảo quản kháng khuẩn hay được sử dụng trong thành phần của những dạng thuốc trên. Có thể xác định các chất này bằng phương pháp HPLC và GC, trong đó GC dùng cột nhồi được sử dụng nhiều với điều kiện sắc ký khá đơn giản. (Bảng 4.10).

**Bảng 4.10.** Điều kiện GC thông dụng phân tích các chất bảo quản kháng khuẩn

Chất cần phân tích	Kích thước cột (chiều dài × đường kính trong)	Pha tĩnh và chất mang	Tốc độ dòng (ml/min)	Nhiệt độ cột/ buồng tiêm/ detector (°C)	Chuẩn nội
Benzyl alcol	1,8m× 3 mm	5% G16/ S1A	50	140/ 180/ 220	Phenol
Clorobutanol	1,8m× 2 mm	5% G16/ S1A	20	110/ 180/220	Benzaldehyd
Phenol	1,2m× 3 mm	5% G16/ S1A	50	145/ 180/ 220	Benzyl alcol
Các paraben*	1,8m× 2 mm	5% G2/ S1A	20	150/ - / -	Benzophenon

*Trong đó: G16: Polyethylen glycol có phân tử lượng khoảng 15000*

*G2: Nhựa dimethylpolysiloxan*

*S1A: Đất silic loại dùng cho sắc ký khí được nung bằng cách trộn diatomit với natri carbonat và nung ở nhiệt độ trên 900°C. Đất silic được rửa với acid sau đó với nước đến trung tính*

*Các paraben\*: gồm methylparaben và propylparaben, dẫn xuất hóa với thuốc thử trimethylsilyl trong quá trình chuẩn bị mẫu*



Các chất đều được phát hiện bằng detector FID với khí mang heli hoặc nitơ. Ngoài điều kiện sử dụng cột nhồi như trên, các chất benzyl alcol, clorobutanol, phenol có thể được tách bằng sắc ký khí sử dụng cột mao quản với các điều kiện cụ thể như sau: Cột DB1 (30 m × 0,25 mm ID × 0,25 μm), pha tĩnh 100% dimethylpolysiloxan, tốc độ dòng 1,2 mL/min, nhiệt độ cột là 320°C.

#### 4.4.3. Xác định tạp chất

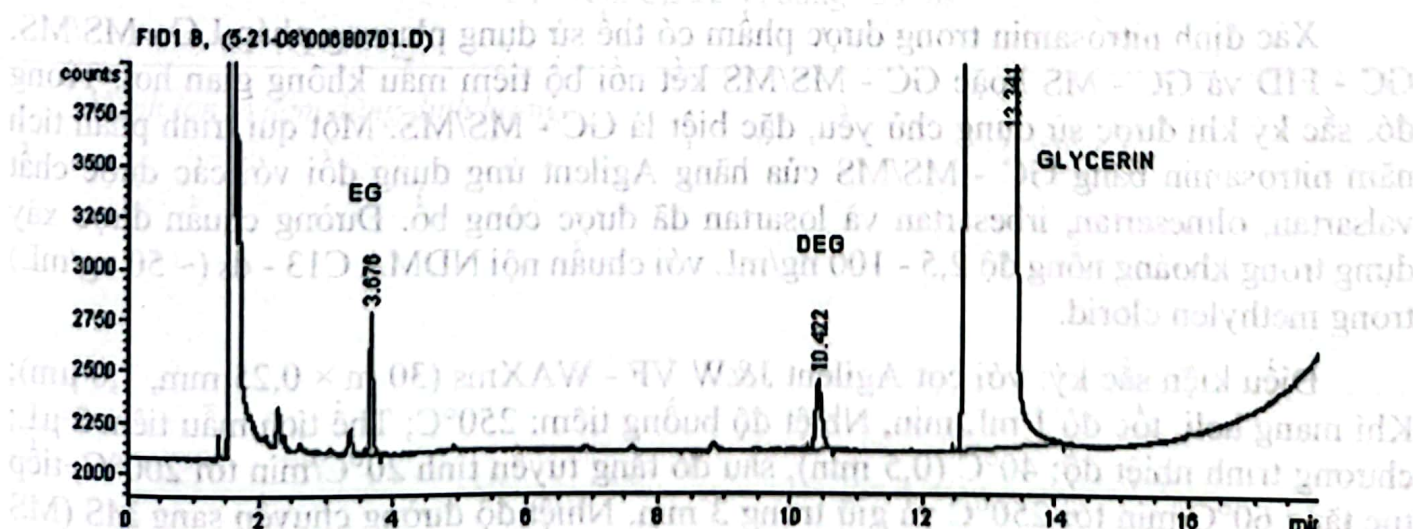
Tạp chất trong thuốc phân tích bằng GC gồm sản phẩm phân hủy, tạp chất liên quan, tạp chất bay hơi và dung môi tồn dư. Xác định tạp chất liên quan, tạp phân hủy có thể thực hiện theo 3 cách tương tự như đối với HPLC, bao gồm chuẩn hóa điện tích, sử dụng chất chuẩn và pha loãng. Còn xác định tạp chất bay hơi và dung môi tồn dư được thực hiện bằng phương pháp so sánh với chuẩn.

##### 4.4.3.1. Tạp chất liên quan, tạp chất định danh

Đa số qui trình xác định tạp chất trong thuốc bằng GC được thực hiện với detector FID, nhiệt độ cột tách được chương trình hóa để đạt được hiệu quả tách tốt.

Hình 4.9 trình bày sắc ký đồ của phép thử xác định tạp chất liên quan theo phương pháp chuẩn hóa điện tích của nguyên liệu glycerin theo tiêu chuẩn USP. Dung dịch thử là dung dịch chế phẩm trong nước nồng độ 50 mg/ml. Mẫu thử được tách bằng cột polycyanopropylphenyl siloxan 6% và polydimethylsiloxan 94% (30 m × 0,53 mm; 3,0 μm). Khí mang: Heli, tốc độ 38 cm/s. Thể tích tiêm mẫu: 0,5 μl, tỷ lệ chia dòng: 1 : 10. Nhiệt độ buồng tiêm: 220 °C. Detector: FID đặt ở 250 °C. Nhiệt độ cột: tăng tuyến tính từ 100 đến 220 °C, tốc độ 7,5°C/ min và giữ ở 220°C trong 4 phút.

Giới hạn cho phép:	0,1%	0,1%	0,1%	0,1%
Mỗi tạp kể cả ethylen glycol (EG) và diethylen glycol (DEG):	≤ 0,1%	≤ 0,1%	≤ 0,1%	≤ 0,1%
Tổng tạp:	≤ 1,0%	≤ 1,0%	≤ 1,0%	≤ 1,0%



Hình 4.9. Sắc ký đồ xác định tạp chất liên quan của glycerin



#### 4.4.3.2. Tạp chất nitrosamin

Bắt đầu từ tháng 7 năm 2018, FDA thông báo thu hồi valsartan do có tạp N - nitrosodimethylamin (NDMA). Điều tra thêm được chất làm thuốc và thuốc thành phẩm trong nhóm dược chất chẹn thụ thể angiotensin từ tất cả các nhà sản xuất dẫn đến quyết định thu hồi thêm irbesartan và losartan. Các sản phẩm này phát hiện có chứa NDMA và N - nitrosodiethylamine (NDEA), cả hai chất có khả năng gây ung thư ở người.

Sau đó, các tạp chất khác, N - nitrosoethylisopropylamin (NEIPA), N - nitrosodiisopropylamin (NDIPA), N - nitrosodibutylamin (NDBA) và acid N - nitrosomel - 4 - amino - butyric (NMBA) được cảnh báo. Trong khoảng 3 năm (2018 - 2020), hơn 1100 lô thuốc sartan (valsartan, losartan và irbesartan) đã được thu hồi do chúng chứa những tạp chất này vượt giới hạn. Giới hạn tạm thời được EMA và US FDA qui định cụ thể đối với các thuốc nhóm sartan được trình bày ở Bảng 4.11.

**Bảng 4.11.** Giới hạn tạm thời đối với các nitrosamin trong các thuốc nhóm sartan

Tên dược chất	Liều tối đa (mg/ ngày)	Lượng NDMA chấp nhận (ng/ ngày)	Giới hạn NDMA (ppm)	Lượng NDEA chấp nhận (ng/ ngày)	Giới hạn NDEA (ppm)	Lượng NMBA chấp nhận (ng/ ngày)	Giới hạn NMBA (ppm)
Valsartan	320	96	0,3	26,5	0,083	96	0,3
Losartan	100	96	0,96	26,5	0,27	96	0,96
Irbesartan	300	96	0,32	26,5	0,088	96	0,32
Azilsartan	80	96	1,2	26,5	0,33	96	1,2
Olmesartan	40	96	2,4	26,5	0,66	96	2,4
Eprosartan	800	96	0,12	26,5	0,033	96	0,12
Candesartan	32	96	3,0	26,5	0,83	96	3,0
Telmisartan	80	96	1,2	26,5	0,33	96	1,2

Xác định nitrosamin trong dược phẩm có thể sử dụng phương pháp LC - MS/MS, GC - FID và GC - MS hoặc GC - MS/MS kết nối bộ tiêm mẫu không gian hơi. Trong đó, sắc ký khí được sử dụng chủ yếu, đặc biệt là GC - MS/MS. Một qui trình phân tích năm nitrosamin bằng GC - MS/MS của hãng Agilent ứng dụng đối với các dược chất valsartan, olmesartan, irbesartan và losartan đã được công bố. Đường chuẩn được xây dựng trong khoảng nồng độ 2,5 - 100 ng/mL với chuẩn nội NDMA C13 - d<sub>6</sub> (~ 50 ng/mL) trong methylen clorid.

Điều kiện sắc ký: với cột Agilent J&W VF - WAXms (30 m × 0,25 mm, 1,0 µm); Khí mang heli, tốc độ 1 mL/min; Nhiệt độ buồng tiêm: 250°C; Thể tích mẫu tiêm 2 µL; chương trình nhiệt độ: 40°C (0,5 min), sau đó tăng tuyến tính 20°C/min tới 200°C, tiếp tục tăng 60°C/min tới 250°C và giữ trong 3 min. Nhiệt độ đường chuyển sang MS (MS Transfer Line Temperature): 250°C.



Điều kiện MS: Ion hóa kiểu va chạm ion mức năng lượng 40 eV, nhiệt độ nguồn ion 250°C; nhiệt độ Q1 và Q2 là 150°C; tốc độ khí va chạm (nitơ): 1,5 mL/min; tốc độ khí làm nguội (He): 4 mL/min. Thông số MS như sau:

---

**NDMA**

Thời gian bắt đầu: 6,5 min

74 → 44, CE 15, dừng 150 ms

74 → 42, CE 20, dừng 50 ms

NDMA:C13 - d6

82 → 48, CE 20, dừng 100 ms

---

Thời gian bắt đầu: 7,60 min

**NDEA**

102 → 85, CE 10 V, dừng 150 ms

102 → 56, CE 18 V, dừng 150 ms

---

Thời gian bắt đầu: 8,03 min

**NEIPA**

116 → 99, CE 10 V, dừng 150 ms

71 → 56, CE 10 V, dừng 150 ms

---

Thời gian bắt đầu: 8,25 min

**NDIPA**

130 → 88, CE 10 V, dừng 150 ms

130 → 42, CE 10 V, dừng 150 ms

---

Thời gian bắt đầu: 8,70 min

**NDBA**

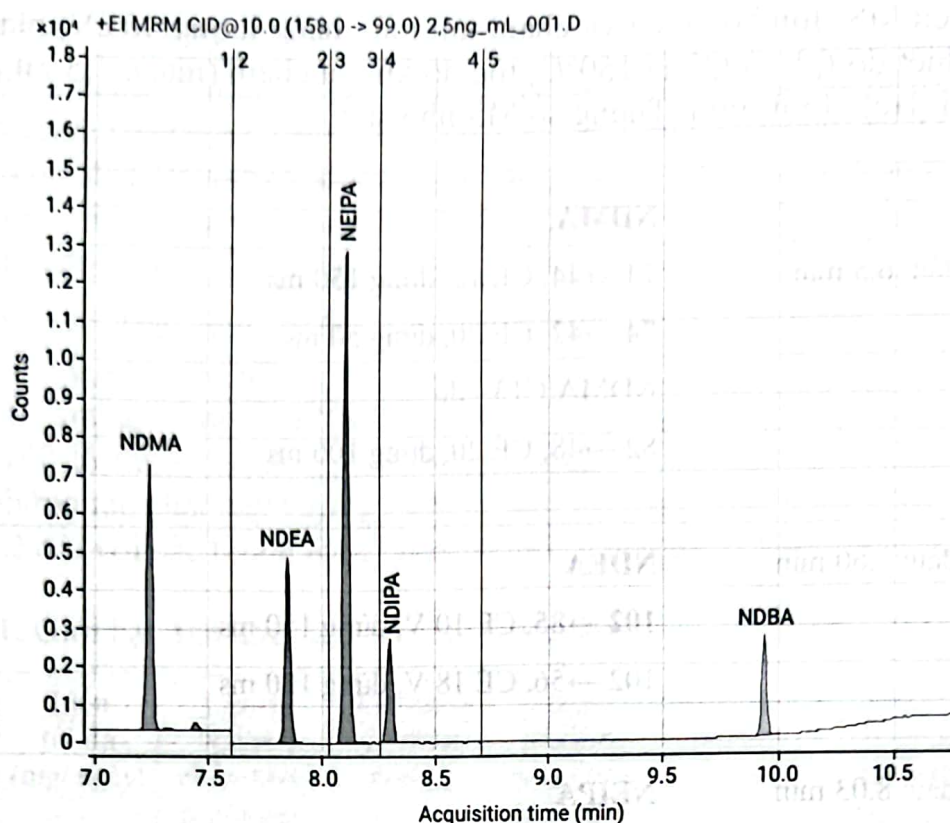
158 → 99, CE 10 V, dừng 150 ms

84 → 56, CE 22 V, dừng 150 ms

---

**Màn hình in đậm dùng định lượng**





**Hình 4.10.** Sắc ký đồ MRM (Extracted MRM chromatogram) của hỗn hợp chuẩn 5 nitrosamin ở nồng độ 2,5 ng/ mL

LOQ của các chất rất thấp từ 0,0025 ppm (NDBA); đến 0,005 ppm (NDEA, NEIPA, NDIPA) và cao nhất là 0,008 ppm (NDMA) đáp ứng tốt yêu cầu phương pháp phân tích để xác định dư lượng 5 nitrosamin này trong dược phẩm.

#### 4.4.3.3. Xác định dung môi tồn dư

Dung môi tồn dư trong dược phẩm là các chất hữu cơ bay hơi, được sử dụng hoặc sinh ra trong quá trình sản xuất các dược chất, tá dược hoặc quá trình bào chế các dược phẩm. Các dung môi này không loại bỏ được hoàn toàn trong quá trình sản xuất. Sử dụng dung môi thích hợp có thể nâng cao sản lượng hoặc quyết định các đặc tính như dạng tinh thể, độ tinh khiết, tính hoà tan của sản phẩm. Vì vậy, đôi khi dung môi là yếu tố quyết định trong qui trình tổng hợp. Về chất lượng, chỉ yêu cầu kiểm tra đối với các dung môi đã được sử dụng hay được sinh ra trong quá trình sản xuất hoặc tinh chế các dược chất, tá dược hoặc thuốc thành phẩm.

Trong hướng dẫn của ICH, các dung môi tồn dư được phân nhóm theo độc tính của chúng. Các dung môi nhóm 1 là chất gây ung thư có nguy cơ gây hại cho cả người dùng và môi trường. Cần tránh sử dụng những dung môi này nhưng nếu chúng được sử dụng thì cần phải kiểm soát chặt chẽ để đảm bảo chỉ có tạp chất ở mức độ vi lượng trong sản phẩm cuối cùng. Các dung môi nhóm 2 là chất không gây ung thư cho động vật và nồng độ của chúng cần được giới hạn trong các chế phẩm và nguyên liệu làm thuốc. Các dung môi nhóm 3 có tiềm năng độc hại thấp và nồng độ có thể cho phép lên đến 0,5%. Do đó, các dung môi nhóm 3 có thể được thử nghiệm bằng các kỹ thuật không đặc hiệu, chẳng hạn như mất khối lượng khi làm khô.



Vì các dung môi tồn dư không có tác dụng điều trị, các dung môi này phải được loại bỏ đến mức tối đa để đạt được các yêu cầu kỹ thuật của sản phẩm, việc thực hành tốt sản xuất (GMP) hoặc các yêu cầu chất lượng khác. Dược phẩm phải chứa một mức dung môi tồn dư không được cao hơn các dữ liệu an toàn. Phải tránh dùng một số dung môi có độc tính không thể chấp nhận được (dung môi Nhóm 1), trừ khi lợi ích của việc sử dụng chúng được xác định chắc chắn. Một số dung môi có độc tính ít nguy hiểm hơn (dung môi Nhóm 2) cũng cần phải dùng hạn chế, để bảo vệ người bệnh khỏi tác dụng độc hại. Tốt nhất là dùng các dung môi ít độc (dung môi Nhóm 3).

Trong Dược điển Việt Nam và các Dược điển tham chiếu như USP, BP, EP đều có hướng dẫn điều kiện phân tích đối với 3 nhóm dung môi. Tuy nhiên, phương pháp phân tích phải được thẩm định để chứng minh điều kiện phân tích là phù hợp các yêu cầu về độ chọn lọc, độ tuyến tính, độ đúng, độ chính xác, đặc biệt là giới hạn phát hiện và giới hạn định lượng phù hợp để phát hiện và định lượng dung môi cần phân tích.

Trong một qui trình phân tích của hãng Agilent, sử dụng thiết bị GC nhanh (Fast GC) của hãng với kỹ thuật tiêm mẫu không gian hơi, phân tích trên hai cột có độ chọn lọc khác nhau với hai chương trình nhiệt độ đã tách và xác định được 23 dung môi nhóm 2 có lượng chất phân tích từ 0,10 - 6,00 µg trong thời gian khoảng 10 phút. (Hình 4.11). Các dung môi được phân tích với điều kiện cụ thể như sau:

- Điều kiện sắc ký: Cột G43 (Rtx - 1301 hoặc Rtx - 624) và cột G16 (Rtx - Wax hoặc Stabilwax) theo USP. Khí mang He, tốc độ 0,85 mL/min (cột G43) và 0,99 mL/min (cột G16). Detector: FID 250°C. Khí phụ trợ: tốc độ 45 mL/min. Chương trình nhiệt độ:

Cột 1: 50°C (2 min), sau đó tăng tới 80°C tốc độ 20°C/min, giữ 1 min, tăng tới 200°C tốc độ 40°C/min, giữ trong 2 min; cột 2: 35°C (2 min), sau đó tăng tới 60°C tốc độ 100°C/min, giữ 1 min, tăng tới 200°C tốc độ 40°C/min, giữ trong 2 min. Tiêm mẫu: chia dòng 20:1.

- Điều kiện tiêm mẫu không gian hơi với bộ tiêm mẫu không gian hơi bẫy (Headspace - Trap):

Nhiệt độ buồng tiêm (Inj, Temp.): 220°C

Chuyển

Nhiệt độ đường chuyển: 220°C

Nhiệt độ lò van (Valve Oven Temp.): 220°C

Tốc độ nghỉ (Standby flow rate): 50 mL/min

Bẫy

Nhiệt độ nghỉ (Standby Temp): 40°C

Nhiệt độ quét của bẫy (Trap Sweep Temp): 40°C

Preheat Mixer: On

Làm nóng trước (Preheat)

Thời gian trộn: 2,0 min

Bộ phận trộn làm nóng (Preheat Mixer)

Thời gian ổn định: 0,5 min

Nhiệt độ mẫu thử: 80°C

Tốc độ quét (Sweep Flow Rate): 75 mL/min

Thời gian quét (Sweep Flow Time): 5,0 min

Làm khô (Dry Purge): 10,0 min, tốc độ 100 mL/min ở 25°C

Phản hấp phụ

Nhiệt độ làm nóng trước: 245°C

Phản hấp phụ: 1,0 min ở 250°C

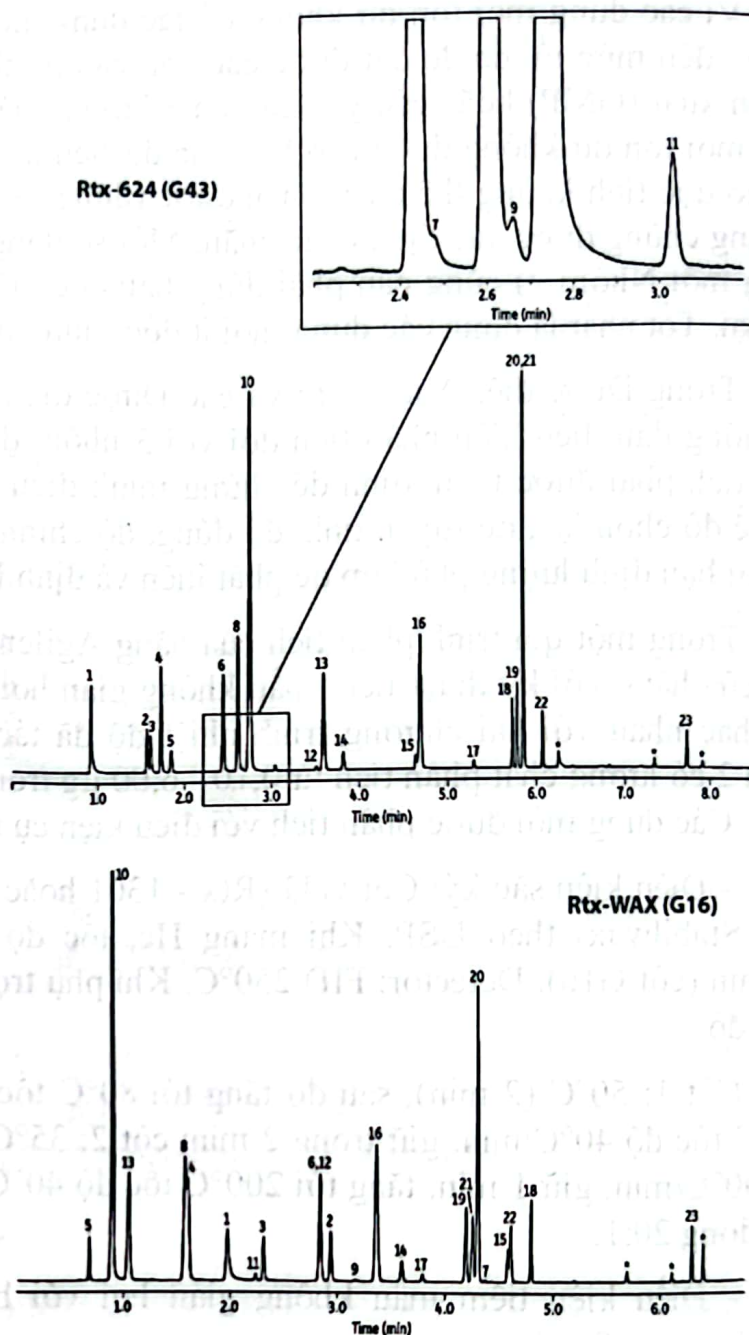
Nhiệt độ bẫy (Trap Bake Temp): 260°C

Thời gian bẫy: 6,0 min

Tốc độ bẫy: 450 mL/min



1. Methanol
  2. Acetonitril
  3. Dicloromethan
  4. trans - 1,2 - Dichloroethylen
  5. Hexan
  6. cis - 1,2 - Dichloroethylen
  7. Nitromethan
  8. Tetrahydrofuran
  9. Cloroform
  10. Cyclohexan
  11. 1,2 - Dimethoxyethan
  12. Trichloroethylen
  13. Methylcyclohexan
  14. 1,4 - Dioxan
  15. Pyridin
  16. Toluen
  17. 2 - Hexanon
  18. Clorobenzen
  19. Ethyl benzen
  20. *m* - Xylen
  21. *p* - Xylen
  22. *o* - Xylen
  23. Tetralin
- \* Thành phần trong Septum



**Hình 4.11. Sắc ký đồ phân tích dung môi tồn dư nhóm 2 bằng GC - FID**

Kiểm soát dung môi tồn dư không những yêu cầu trong kiểm nghiệm nguyên liệu mà còn phải thực hiện đối với thuốc thành phẩm. Công nghệ bào chế hiện nay với mục tiêu sử dụng phương pháp bào chế hiện đại, kết hợp tối ưu hóa công thức để tăng cường sinh khả dụng cũng như tăng độ ổn định của dược chất trong chế phẩm được ứng dụng rộng rãi. Một trong số đó là thành phần dung môi hữu cơ được cho vào trong quá trình bào chế. Ví dụ chế phẩm viên nén Clopidogrel 75 mg thành phần bào chế viên nhân ngoài dược chất Clopidogrel bisulfat, các tá dược trong đó isopropanol được sử dụng với vai trò tá dược dính chiếm tỷ lệ khoảng 18%. Thành phần màng bao có isopropanol và dicloromethan chiếm tỷ lệ khoảng 90%. Trong quá trình bào chế, phần lớn dung môi bay hơi, nhưng có thể vẫn còn tồn dư dung môi trong chế phẩm ảnh hưởng tới sức khỏe người dùng. Isopropanol là dung môi nhóm 3, còn dicloromethan theo phân loại là dung môi nhóm 2. Theo qui định, yêu cầu chất lượng của sản phẩm đối với dung môi isopropanol và dicloromethan phải không lớn hơn 5000 ppm và 600 ppm. Tồn dư các



dung môi này trong chế phẩm được xác định bằng GC - FID với chế độ tiêm mẫu không gian hơi. Mẫu thử và chuẩn được chuẩn bị trong dung môi N,N - dimethylformamid (DMF), cụ thể như sau:

- Dung dịch chuẩn: Cân chính xác khoảng 500 mg isopropanol và 60 mg dicloromethan vào bình định mức 100 ml, thêm 30 ml DMF, trộn đều và thêm DMF đến vạch, lắc đều. Pha loãng chính xác 10 ml dung dịch này thành 100 ml bằng DMF. Lắc kỹ. Chuyển 10 ml dung dịch này vào lọ headspace 20 ml và đậy chặt nắp ngay.

- Dung dịch thử: Nghiền 20 viên và cân chính xác một lượng tương đương khoảng 1 viên vào lọ headspace 20 ml, thêm 10 ml DMF và đậy chặt nắp ngay.

Tiến hành phân tích ở điều kiện qui định.

Đánh giá độ phù hợp của hệ thống: Dựa vào kết quả tiêm lặp lại 6 lần dung dịch chuẩn. Phép thử có giá trị khi diện tích pic 6 lần tiêm lặp của isopropanol và dicloromethan có  $RSD \leq 15,0\%$ .

Lượng isopropanol/ dicloromethan trong mẫu thử tính theo ppm:

$$\frac{A_T}{A_S} \times \frac{W_S}{100} \times \frac{10}{100} \times \frac{P}{100} \times \frac{10}{W_T} \times 1000000$$

*Trong đó:*

$A_T$  và  $A_S$  là diện tích pic isopropanol/ dicloromethan thu được của dung dịch thử và dung dịch chuẩn

$W_T$  và  $W_S$  là khối lượng mẫu thử và isopropanol/ dicloromethan chuẩn

$P$  là độ tinh khiết của isopropanol/ dicloromethan chuẩn.

Cũng có thể lấy chính xác thể tích dung môi chuẩn thay cho thao tác cân khi chuẩn bị dung dịch chuẩn. Khi đó, khối lượng chuẩn sẽ tính dựa vào thể tích và tỷ trọng của dung môi chuẩn sử dụng, tuy nhiên phải chú ý nhiệt độ khi thực hiện.

Dung môi tồn dư còn được qui định phải kiểm soát trong đồ bao gói và dụng cụ y tế. Trong Dược điển Việt Nam 5, phụ lục 17.4 hướng dẫn cách xác định tồn dư ethylen dioxyd trong bộ dây truyền dịch tiệt khuẩn bằng ethylen dioxyd, phụ lục 17.6 cũng trình bày phương pháp xác định tồn dư ethylen oxyd trong bơm tiêm vô khuẩn bằng chất dẻo sử dụng một lần tiệt khuẩn bằng ethylen dioxyd bằng GC - FID. Giới hạn cho phép tồn dư ethylen dioxyd trong bộ dây truyền dịch và bơm tiêm đều không lớn hơn 10 ppm.

#### 4.5. ỨNG DỤNG SẮC KÝ KHÍ TRONG PHÂN TÍCH HÓA CHẤT BẢO VỆ THỰC VẬT

Có nhiều loại detector của GC có thể ứng dụng để phân tích hóa chất bảo vệ thực vật (HCBVTV), bao gồm NPD, ECD, FPD, MS,... tùy thuộc vào cấu trúc và nồng độ của chất cần phân tích.



#### 4.5.1. Phân tích hóa chất bảo vệ thực vật bằng các detector thông thường

ECD là detector được ứng dụng để phân tích HCBVTV nhóm clo hữu cơ và các HCBVTV nhóm lân hữu cơ hay các tổng hợp mà trong phân tử có chứa clo. Nhiều qui trình đã được đánh giá và ban hành thành các qui trình chuẩn, như AOAC 985.22 ứng dụng phân tích HCBVTV nhóm lân và clo hữu cơ; AOAC 998.01 ứng dụng để phân tích HCBVTV nhóm các tổng hợp, EPA Method 8081B ứng dụng để phân tích HCBVTV nhóm clo hữu cơ. Ngoài ra, rất nhiều phương pháp GC - ECD đã được công bố để xác định HCBVTV trong nhiều đối tượng khác nhau. Ở Việt Nam, tác giả Trần Việt Hùng (Luận án tiến sĩ dược học, Trường Đại học Dược Hà Nội năm 2005) đã xác định đồng thời 18 hoạt chất thuốc trừ sâu nhóm clo hữu cơ, phospho hữu cơ và pyrethroid trong 66 mẫu dược liệu bằng phương pháp sắc ký khí sử dụng chiết lạnh hoặc chiết Soxhlet kết hợp phân tích bằng detector ECD, MS và NPD. Phương pháp có giới hạn phát hiện thấp ở mức nanogram hoặc dưới nanogram. Dược điển Việt Nam 5 trình bày phương pháp phân tích 23 HCBVTV nhóm này bằng GC - ECD với cột tách silica nung chảy (30 m × 0,32 mm) phủ poly(dimethyl)(diphenyl) siloxan dày 0,25 µm, sử dụng chuẩn nội carbophenothion.

NPD cũng là một detector được sử dụng do có nhiều loại HCBVTV có N và P trong phân tử, tiêu biểu là HCBVTV nhóm lân hữu cơ. Trong Dược điển Việt Nam 5 có trình bày điều kiện phân tích 13 HCBVTV nhóm này với cột tách silica nung chảy (30 m × 0,32 mm) phủ poly(dimethyl)siloxan dày 0,25 µm, sử dụng chuẩn nội carbophenothion.

FPD cũng được sử dụng để phân tích HCBVTV nhóm lân hữu cơ có chứa P và S. Các tác giả sử dụng GC - FPD cùng kỹ thuật tiêm mẫu PTV để phân tích 5 HCBVTV nhóm lân hữu cơ trong dầu ô liu. Giới hạn phát hiện thấp nhất đạt được là 3 µg/kg (Giacomo Dugo, Giuseppa Di Bella, Giovanna Loredana La Torre, Marcello Saitta. *Food Control*, June 2005, 16(5), 435 - 438).

Tiêu chuẩn Việt Nam TCVN 8319: 2010, trình bày phương pháp xác định 21 HCBVTV nhóm lân hữu cơ, clo hữu cơ và các tổng hợp trong rau quả bằng GC với detector ECD và detector quang kế ngọn lửa, kính lọc phospho (FPD/P), sử dụng cột mao quản DB - 5 (30 m × 0,32 mm; 0,25 µm).

Việc sử dụng các detector như ECD, NPD, FPD chỉ ứng dụng để phân tích một nhóm HCBVTV có tính chất hóa học tương tự. Khi phân tích các HCBVTV khác thường không đáp ứng được độ nhạy.

#### 4.5.2. Phân tích hóa chất bảo vệ thực vật bằng detector khối phổ

Trong phân tích HCBVTV, GC - MS đóng vai trò rất quan trọng, đặc biệt GC - MS/MS đã đáp ứng được các yêu cầu về phân tích hàm lượng rất nhỏ với độ chính xác cao. Khi phân tích HCBVTV bằng GC - MS thường sử dụng nguồn ion hóa EI. Các kỹ thuật GC - MS có thể xác định đến hàng trăm HCBVTV trong cùng một lần phân tích. Bảng 4.12 tóm tắt một số nghiên cứu phân tích HCBVTV bằng GC - MS.

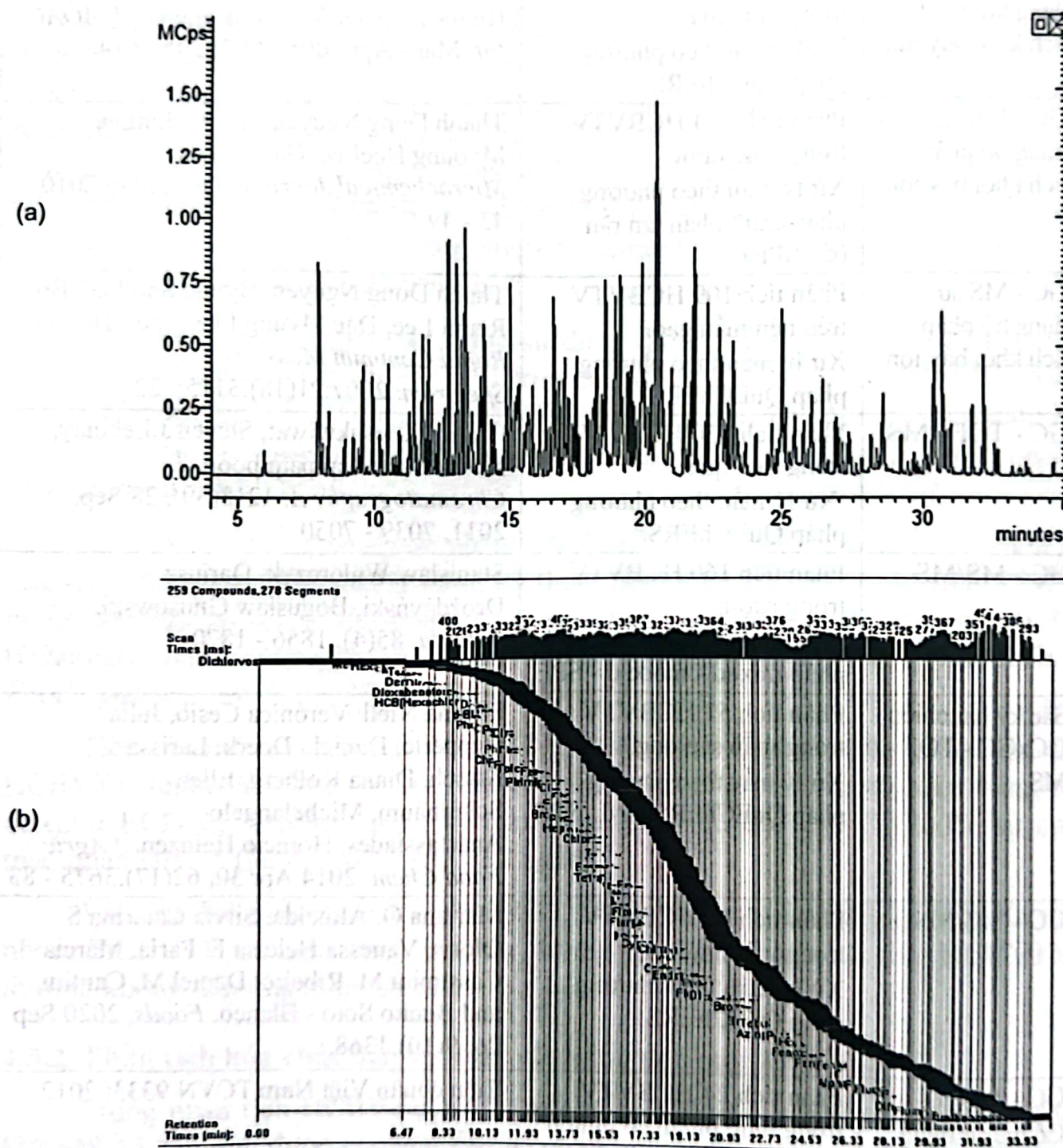


**Bảng 4.12. Tóm tắt một số nghiên cứu phân tích HCBVTV bằng GC - MS**

TT	Điều kiện phân tích	Đặc điểm	Nguồn/ Tài liệu
1	GC - MS sử dụng bộ phân tích khối tử cực	Phân tích 90 HCBVTV trong rau quả tươi. Xử lý mẫu theo phương pháp QuEChERS	Darinka Stajnbaher Lucija Zupancic - Kralj. <i>J. Chromatogr A</i> . 2003 Oct 10;1015(1 - 2):185 - 98.
2	GC - MS sử dụng bộ phân tích khối bẫy ion	Phân tích 144 HCBVTV trong rau, quả. Xử lý mẫu theo phương pháp QuEChERS	Steven J Lehotay, André de Kok, Maurice Hiemstra, Peter Van Bodegraven. <i>J. AOAC Int.</i> Mar - Apr 2005; 88(2):595 - 614.
3	GC - MS sử dụng bộ phân tích khối bẫy ion	Phân tích 234 HCBVTV trong thảo dược. Xử lý mẫu theo phương pháp chiết phân tán rắn (d - SPE)	Thanh Dong Nguyen, Kyung JunLee, Myoung HeeLee, Gae HoLee. <i>Microchemical Journal</i> , 95(1), May 2010, 43 - 49.
4	GC - MS sử dụng bộ phân tích khối bẫy ion	Phân tích 109 HCBVTV trên nền mẫu gạo. Xử lý mẫu theo phương pháp QuEChERS	Thanh Dong Nguyen, Byung Soo Lee, Bo Reum Lee, Dae Myung Lee, Gae - Ho Lee. <i>Rapid Commun Mass Spectrom.</i> 2007;21(18):3115 - 22.
5	GC - TOF - MS	Phân tích 150 HCBVTV trong rau, quả. Xử lý mẫu theo phương pháp QuEChERS	Urairat Koesukwiwat, Steven J. Lehotay, Natchanun Leepipatpiboon. <i>J. Chromatography A</i> , 1218(39), 28 Sep. 2011, 7039 - 7050
6	GC - MS/MS	Phân tích 160 HCBVTV trong rượu. Xử lý mẫu theo phương pháp mixed - mode d - SPE	Stanisław Walorczyk, Dariusz Drożdżyński, Bogusław Gnusowski. <i>Talanta</i> , 85(4), 1856 - 1870
7	Sắc ký hai chiều GCxGC - TOF - MS	Phân tích 51 HCBVTV trong mẫu sáp ong. Xử lý mẫu theo phương pháp QuEChERS và d - SPE	Silvina Niell Verónica Cesio, Julia Hepperle, Daniela Doerk, Larissa Kirsch, Diana Kolberg, Ellen Scherbaum, Michelangelo Anastassiades, Horacio Heinzen. <i>J Agric Food Chem.</i> 2014 Apr 30; 62(17):3675 - 83
8	GC - MS/MS	Phân tích 41 HCBVTV trong mật ong. Xử lý mẫu theo phương pháp QuEChERS	Mariana O. Almeida, Silvia Catarina S. Oloris, Vanessa Heloisa F. Faria, Márcia Cassimira M. Ribeiro, Daniel M. Cantini and Benito Soto - Blanco. <i>Foods</i> , 2020 Sep 26; 9(10):1368.
9	GC - MS Có thể sử dụng thiết bị khối phổ loại bẫy ion, tứ cực, thời gian bay	Phân tích 24 HCBVTV trong thực phẩm có nguồn gốc thực vật. Xử lý mẫu theo phương pháp QuEChERS và d - SPE	Tiêu chuẩn Việt Nam TCVN 9333: 2012



Phát huy tính năng “tuyệt vời” trong phát hiện bằng thiết bị khối phổ tứ cực chập ba, bẫy ion, thời gian bay, các nhà sản xuất không ngừng cải tiến nâng cao độ phân giải cũng như độ nhạy của thiết bị, đồng thời cột tách chuyên dùng phân tích thuốc trừ sâu cũng được phát triển để tăng cường số lượng HCBVTV có thể phân tích được đồng thời trong một lần phân tích. Hơn nữa, thư viện phổ với hàng trăm nghìn HCBVTV cho phép phân tích sàng lọc ban đầu mà có thể không cần chất chuẩn. Hình 4.12. trình bày sắc ký đồ và cửa sổ thời gian lưu phân tích 258 HCBVTV (và chuẩn nội) bằng thiết bị GC - MS/MS Bruker Scion TQ sử dụng cột tách Bruker BR - 5ms (30 m × 0,25 mm i.d.; 0,25 μm).



**Hình 4.12.** Sắc ký đồ (a) và cửa sổ thời gian (b) phân tích 258 loại thuốc trừ sâu

GC đã được ứng dụng rộng rãi để xác định đồng thời nhiều HCBVTV, tuy nhiên có một số loại HCBVTV không thể phân tích được bằng GC do GC chỉ phù hợp để phân tích các HCBVTV không phân cực đến phân cực trung bình, các chất bay hơi mà



không thể phân tích các hợp chất phân cực, chất không bay hơi hay chất bị phân hủy bởi nhiệt do đó, một tỷ lệ các HCBVTV vẫn phải thực hiện phân tích bằng HPLC.

#### 4.6. ỨNG DỤNG SẮC KÝ KHÍ TRONG PHÂN TÍCH CÁC CHẤT GÂY NGHIỆN

Phân tích chất gây nghiện có thể ở trong nguyên liệu, chế phẩm hoặc mẫu thử sinh học. Chất gây nghiện được phân loại thành các nhóm sau:

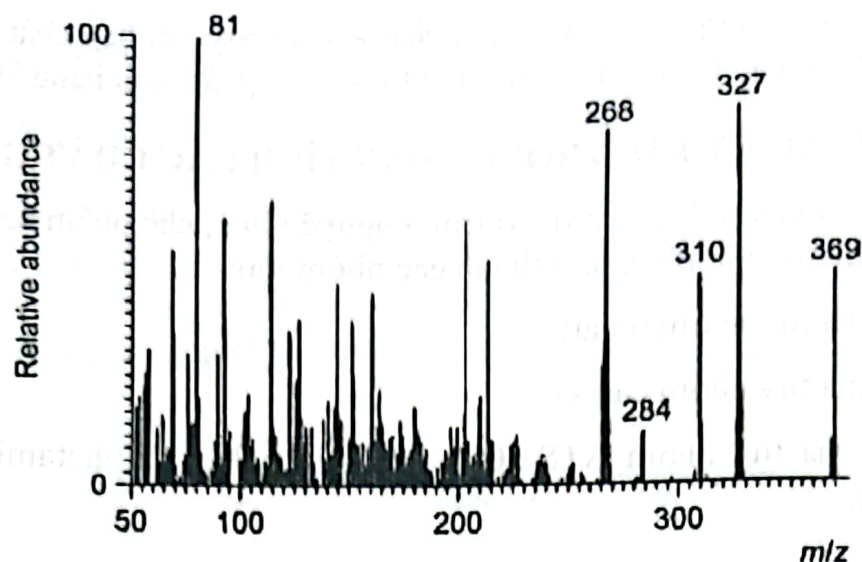
- Các chất ma túy nhóm opiat;
- Các chất ma túy nhóm cần sa;
- Các chất ma túy nhóm ATS (Chất kích thích loại amphetamin: Amphetamin Type Stimulants);
- Cocain;
- LSD (Lysergic acid diethylamid);
- Acid  $\gamma$  - Hydroxybutyric (GHB) và các analog;
- Dẫn chất benzodiazepin;
- Khat;
- Nấm thuộc chi *Psilocybe*.

Các chất có đặc tính gây nghiện, có nguy cơ bị lạm dụng nghiêm trọng, bị cấm và yêu cầu quản lý rất chặt chẽ như cần sa và các dẫn xuất của nó, cocain, heroin, methadon, morphin, thuốc phiện. Một số chất thường được sử dụng điều trị, có nguy cơ lạm dụng thấp hơn như codein, dihydrocodein, ephedrin được sản xuất thành thuốc thành phẩm và chịu sự quản lý theo qui định đặc biệt của Bộ Y tế.

##### 4.6.1. Phân tích các chất gây nghiện trong mẫu nguyên liệu, chế phẩm

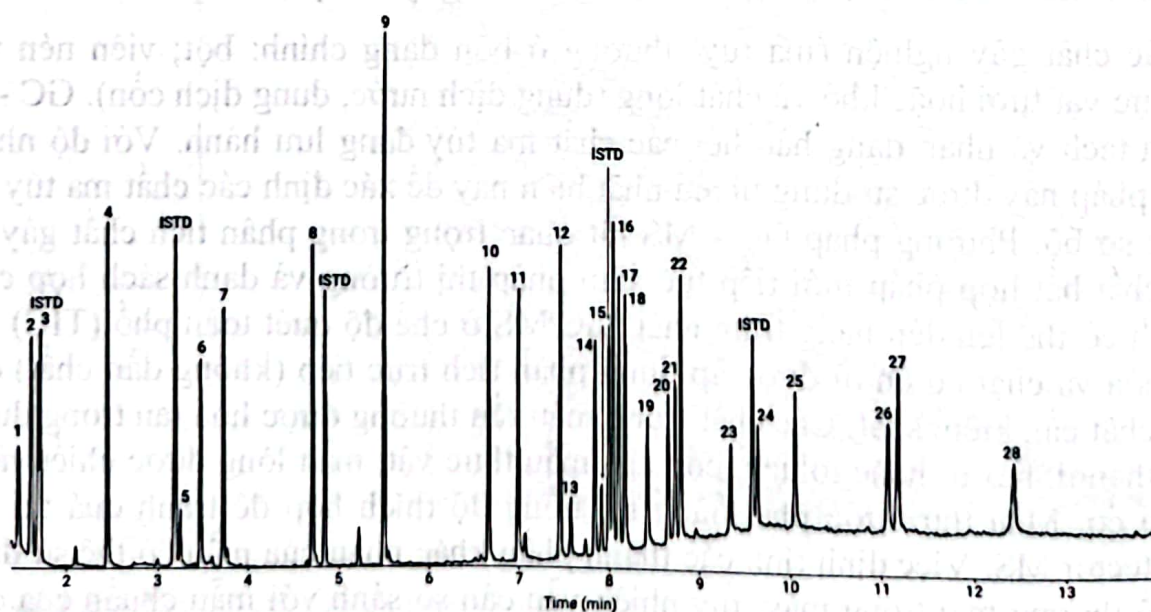
Các chất gây nghiện (ma túy) thường ở bốn dạng chính: bột; viên nén và viên nang; thực vật tươi hoặc khô và chất lỏng (dung dịch nước, dung dịch cồn). GC - MS có thể phân tách và nhận dạng hầu hết các chất ma túy đang lưu hành. Với độ nhạy cao, phương pháp này được sử dụng nhiều nhất hiện nay để xác định các chất ma túy sau khi sàng lọc sơ bộ. Phương pháp GC - MS rất quan trọng trong phân tích chất gây nghiện do các chất bất hợp pháp mới tiếp tục xâm nhập thị trường và danh sách hợp chất cần phân tích có thể lên đến hàng trăm chất. GC/MS ở chế độ quét toàn phổ (TIC) với chế độ ion hóa va chạm điện tử được áp dụng phân tích trực tiếp (không dẫn chất) để sàng lọc các chất cần kiểm soát. Các chất trong mẫu rắn thường được hòa tan trong dung môi như methanol, hexan hoặc toluen, còn các mẫu thực vật, mẫu lỏng được chiết vào dung môi hữu cơ. Mẫu thử được pha loãng tới nồng độ thích hợp để tránh quá tải cột GC hoặc detector MS. Việc định tính các thành phần khác nhau của mẫu có thể sử dụng thư viện phổ thương mại trong máy, tuy nhiên vẫn cần so sánh với mẫu chuẩn của chất ma túy cần phân tích. Hình 4.13 trình bày phổ GC - MS của heroin phân tích với chế độ ion hóa va chạm ion.





**Hình 4.13.** Phổ GC - MS của heroin với chế độ ion hóa va chạm ion

Nhiều qui trình phân tích bằng GC - MS sàng lọc các chất gây nghiện được phát triển và công bố, có thể là qui trình phân tích đồng thời từng nhóm chất hoặc một số nhóm chất. Hãng Agilent đã phát triển thành công qui trình phát hiện 28 hợp chất của các nhóm chất gây nghiện khác nhau như amphetamin, opiat, benzodiazepin, cần sa trên thiết bị GC Agilent 7890 GC kết nối MS Agilent 5977B Inert Plus GC/MSD with inert EI source. Hỗn hợp 28 chất (Bảng 4.13) có nồng độ mỗi chất 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  và 6 chất chuẩn nội đồng vị nồng độ mỗi chất 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  được tách bằng cột Agilent DB - 5ms Ultra Inert (20 m  $\times$  0,18 mm  $\times$  0,18  $\mu\text{m}$ ). Thể tích mẫu tiêm: 1  $\mu\text{L}$ , chế độ tiêm chia dòng 20 : 1. Nhiệt độ buồng tiêm 250°C. Chương trình nhiệt độ cột: ban đầu 110°C, tăng tuyến tính 20°C/ phút tới 300°C, giữ 4,5 phút. Khí mang: Heli, tốc độ 1,5 mL/phút. Nhiệt độ đường chuyển 280°C. Nhiệt độ nguồn ion: 250°C. Nhiệt độ tứ cực: 150°C. Chế độ phổ quét với khoảng quét m/z 40 - 500. (Hình 4.14).



**Hình 4.14.** Sắc ký đồ ion tổng (TIC) của hỗn hợp 28 chất gây nghiện và chuẩn nội (chuẩn nội 1,4 - Diclorobenzen -  $d_4$  rửa giải cùng dung môi pha mẫu nên không xuất hiện)



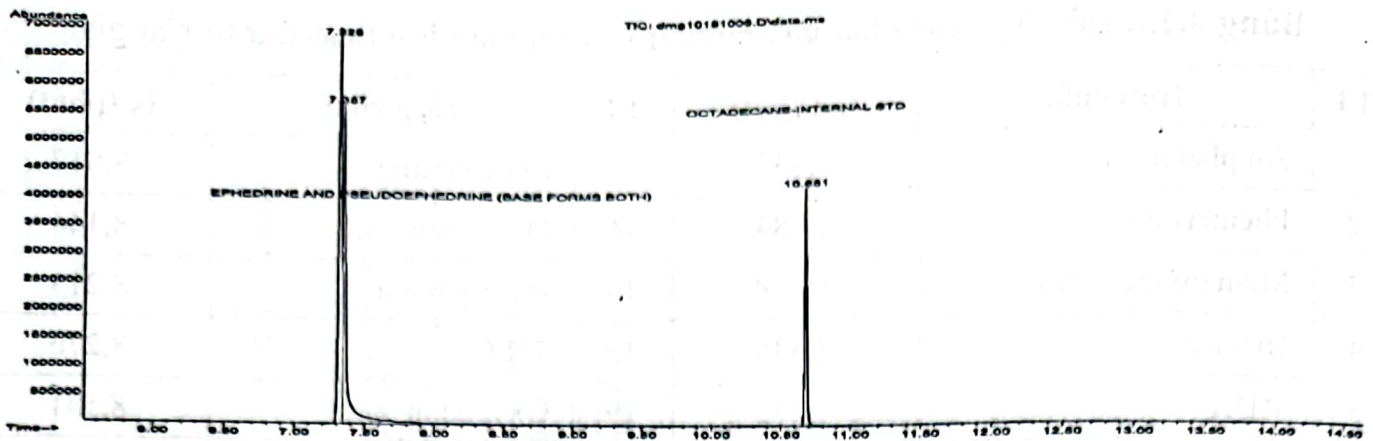
**Bảng 4.13.** Hỗn hợp các chất gây nghiện và thời gian lưu theo thứ tự rửa giải

TT	Hợp chất	t <sub>R</sub> (phút)	TT	Hợp chất	t <sub>R</sub> (phút)
1	Amphetamin	1,535	15	Lorazepam	8,017
2	Phentermin	1,684	16	Diazepam	8,144
3	Methamphetamin	1,758	17	Hydrocodon	8,213
4	Nicotin	2,536	18	TH C	8,276
5	MDA	3,272	19	Oxycodon	8,531
6	MDMA	3,563	20	Temazepam	8,758
7	MDEA	3,818	21	Flunitrazepam	8,832
8	Meperidin	4,803	22	Heroin	8,896
9	Phencyclidin	5,602	23	Nitrazepam	9,441
10	Methadon	6,762	24	Clonazepam	9,748
11	Cocaine	7,09	25	Alprazolam	10,177
12	Proadifen	7,556	26	Verapamil	11,231
13	Oxazepam	7,678	27	Strychnin	11,358
14	Codein	7,948	28	Trazadon	12,666

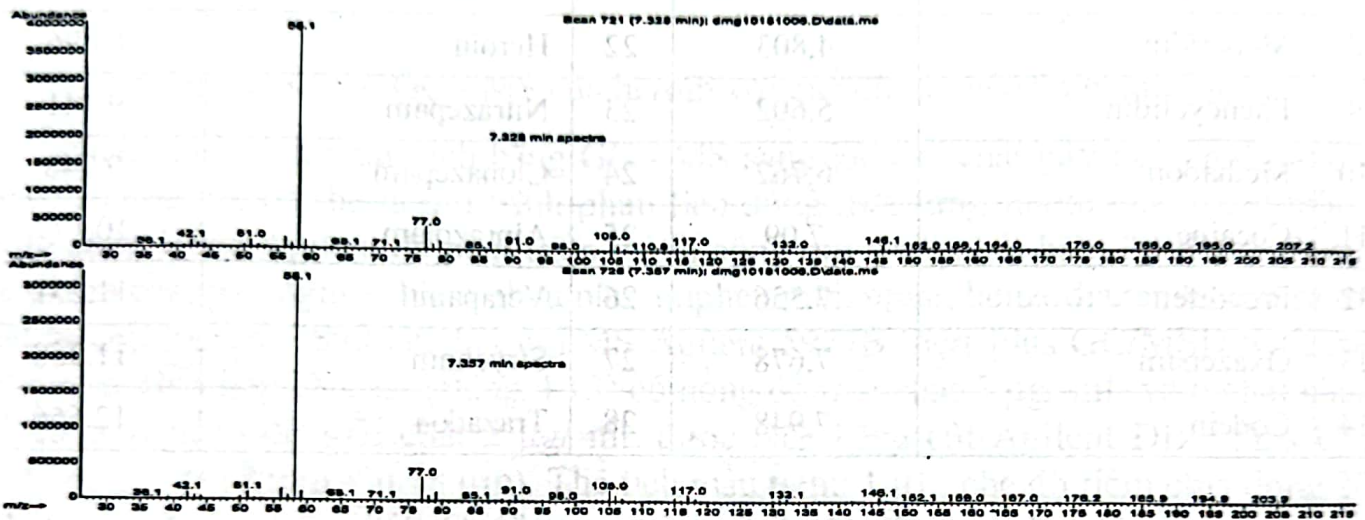
Tuy nhiên, GC/MS có những hạn chế trong định tính các chất gây nghiện do số lượng mảnh khối thu được khi ion hóa bằng chế độ va chạm điện tử hạn chế. Mặt khác, khó có thể tách được một số đồng phân (diastereomers and positional isomers) và dạng muối của các chất bằng GC - MS. Như vậy, sẽ không đáp ứng yêu cầu phải xác định rõ ràng chất cần kiểm soát có trong tang vật ma túy. Trong trường hợp này, GC - FTIR là một kỹ thuật thay thế được lựa chọn cho GC - MS để xác định các hợp chất hữu cơ. Tế bào đo mẫu trong GC - FTIR được bổ sung thêm bộ phận làm mát bằng nitơ lỏng cho phép phân tích trực tiếp chất phân tích kết tinh dưới dạng rắn rửa giải từ GC. Kỹ thuật này vượt trội hơn tế bào đo ống ánh sáng IR (IR light pipe) của GC - FTIR thông thường về độ nhạy, cũng như chất lượng phổ IR và cho phép so sánh trực tiếp phổ thu thập được với cơ sở dữ liệu IR hiện có.

Một nghiên cứu được tài trợ bởi Quỹ của Bộ Tư pháp Mỹ tiến hành so sánh khả năng xác định ephedrin và pseudoephedrin bằng GC - MS với GC - FTIR và đã chứng minh khả năng vượt trội của GC - FTIR. Hình 4.15 và 4.16 là sắc ký đồ và phổ đồ phân tích hai chất bằng GC - MS. Kết quả cho thấy hai chất chưa tách được và cũng không xác định được từng chất dựa vào các mảnh phổ (m/z). Hình 4.17 là phổ đồ phân tích hai chất nghiên cứu bằng GC - FTIR, phổ của hai hợp chất này có sự khác biệt trong vùng vân tay hồng ngoại cho phép xác định các đồng phân không đối quang này.

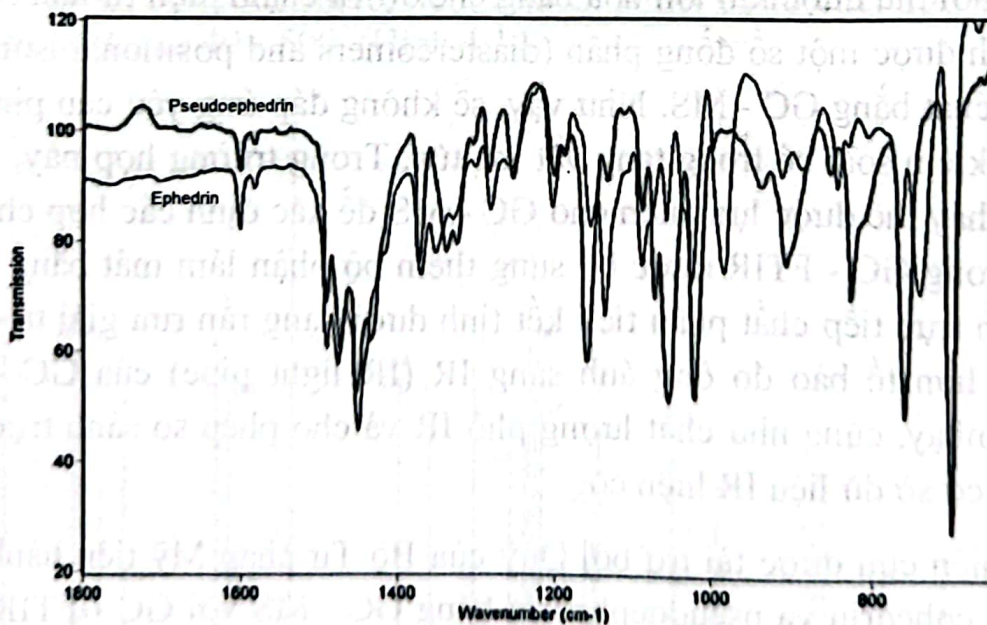




**Hình 4.15.** Sắc ký đồ ion tổng của hỗn hợp ephedrin và pseudoephedrin bằng GC - MS



**Hình 4.16.** Phổ khối của ephedrin (trên) và pseudoephedrin (dưới)



**Hình 4.17.** Phổ GC - FTIR của ephedrin và pseudoephedrin (chồng phổ vùng vân tay)

Thiết bị GC: Varian 3900 với cột VF – 5 ms (30 m × 0,25 mm, 0,25  $\mu$ m); khí mang Heli, tốc độ 1,1 mL/phút; chương trình nhiệt độ cột: 60°C trong 1 phút, tăng 15°C/phút tới 300°C, giữ trong 3 phút; Tiêm mẫu 2  $\mu$ l, nhiệt độ buồng tiêm 250°C.

Thiết bị IR: Spectra Analysis DiscovIR - GC, FTIR unit. Độ phân giải 4  $\text{cm}^{-1}$ .



Sau khi đã định danh được chất phân tích (chất gây nghiện) bằng phân tích sàng lọc, thực hiện định lượng bằng GC - FID hoặc GC - MS. Khi tiến hành định lượng cần thực hiện theo phương pháp chuẩn nội để tăng độ chính xác của phép thử. Kết quả được tính dựa vào đường chuẩn thực hiện song song.

#### 4.6.2. Phân tích các chất gây nghiện trong mẫu thử sinh học

Việc sử dụng chất gây nghiện, đặc biệt là ma túy gây ra hệ quả nghiêm trọng về kinh tế và xã hội trên toàn thế giới. Song song với phân tích xác định tang vật thu được ở dạng nguyên liệu và thành phẩm thì công tác phân tích độc chất với nền mẫu sinh học cũng được phát triển mạnh mẽ nhằm cung cấp bằng chứng pháp lý và phục vụ lâm sàng (cấp cứu ngộ độc) trong bệnh viện.

Các qui trình dựa trên sự phân tách sắc ký là công cụ phân tích mạnh mẽ nhất để xác định và định lượng các chất hữu cơ trong phân tích độc chất thông thường. Cùng với HPLC, LC - MS, LC - MS/MS thì GC với các detector thông thường, GC - MS, GC - MS/MS là các kỹ thuật được lựa chọn để xác định chất gây nghiện trong mẫu thử sinh học. Khi sử dụng phương pháp GC với detector thông thường hoặc GC - MS, mẫu thử thường phải được dẫn xuất hóa hoặc làm giàu mẫu với lượng lớn mẫu (> 5 mL) để đảm bảo độ nhạy. Còn với bộ phân tích tứ cực chấp ba có thể phân tích mẫu trực tiếp (không qua dẫn xuất) vẫn phát hiện được các chất ở dạng vết, cho kết quả chính xác và đáng tin cậy. Hiện nay, phương pháp sắc ký khí khối phổ được dùng rất phổ biến để phân tích ma túy trong mẫu thử sinh học. Trong cùng một lần phân tích có thể xác định được rất nhiều chất ma túy trong thời gian chỉ 10 - 30 phút. Ưu điểm của GC - MS là quá trình tách sắc ký không quá quan trọng. Mỗi chất phân tích đặc trưng bởi các giá trị m/z nhất định, do đó nếu GC không tách được các chất hoàn toàn vẫn có thể định lượng được nhờ vai trò của MS. Một số nghiên cứu được tóm tắt ở Bảng 4.14 cho thấy phương pháp GC - MS có thể phân tích được nhiều chất ma túy cùng lúc trên nền mẫu thử sinh học.

**Bảng 4.14.** Một số nghiên cứu phân tích chất gây nghiện tổng hợp bằng GC - MS

TT	Điều kiện phân tích	Đặc điểm	Nguồn/ Tài liệu
1	GC - MS sử dụng bộ phân tích khối bẫy ion	MA, pethidin, ketamin và tramadol. Mẫu thử: nước tiểu Phân tích trực tiếp	Fangmin Xu, Lingyun Liu. <i>J. Forensic Sciences Research</i> . Vol. 4, 2019 (2). 188 - 194.
2	GC - MS sử dụng bộ phân tích tứ cực chấp ba	AM, MA, phentermin, MDA, MDMA và MDEA Mẫu thử: nước tiểu, máu Dẫn xuất hóa	Mateusz Kacper Wozniak, Marek Wiergowski, Justyna Aszyk, Pawel Kubica, Jacek Namiesnik, Marek Biziuk. <i>J. Pharmaceutical and Biomedical analysis</i> . Vol. 148, (2018), s. 58 - 64.
3	GC - MS sử dụng bộ phân tích khối tứ cực	Các chất kích thích nhóm amphetamin, các cathinon, các phenethylamin và các analog của ketamin Mẫu thử: nước tiểu, máu Dẫn xuất hóa	Gilbert Mercieca, Sara Odoardi, Marisa Cassar, Sabina Strano Rossi. <i>J Pharm Biomed Anal</i> . 2018;149:494 - 501



4	GC - MS sử dụng bộ phân tích khối tử cực chấp ba	Ketamin và các chất chuyển hóa Mẫu thử: nước tiểu, máu Phân tích trực tiếp	Ivo Moreno, Mário Barroso, Ana Martinho, Angelines Cruz, Eugenia Gallardo. <i>J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.</i> 2015;1004:67 - 78.
5	GC - MS sử dụng bộ phân tích khối tử cực	AM, MA, MDA, MDMA, MDEA Mẫu thử: nước tiểu Dẫn xuất hóa	Adrienn Dobos, Hidvégi Előd, Somogyi and Gábor Pál. <i>J. Analytical Toxicology</i> , 2012, 36, 340 - 344.
6	GC - MS sử dụng bộ phân tích khối tử cực	10 chất gây ảo giác phenethylamin (gồm dẫn chất của AM) Mẫu thử: nước tiểu Phân tích trực tiếp	Kerrigan Sarah, Stephanie Banuelos Laura Perrella, and Brittany Hardy. <i>J. Analytical Toxicology</i> , 2011, 35, 459 - 469.
7	GC - MS sử dụng bộ phân tích khối tử cực	AM, MA, MDMA, MDA, ketamin và norketamin Mẫu thử: móng tay, chân Dẫn xuất hóa	Kim Jin Young, Shin Soon Ho, In Moon Kyo, J. <i>Forensic Science International</i> , 2010, 194, 108 - 114.
8	GC - MS sử dụng bộ phân tích khối tử cực	MDMA và MDA Mẫu thử: tóc, nước tiểu Dẫn xuất hóa	Han Eunyoung, Wonkyung Yang Jaesin Lee, Yonghoon Park, Eunmi Kim, Míae Lim, Heesun Chung. <i>J. Forensic Science International</i> , 2005, 152, 33 - 37.

AM: Amphetamin

MA: Methamphetamin

MDA: 3,4 - methylenedioxyamphetamin

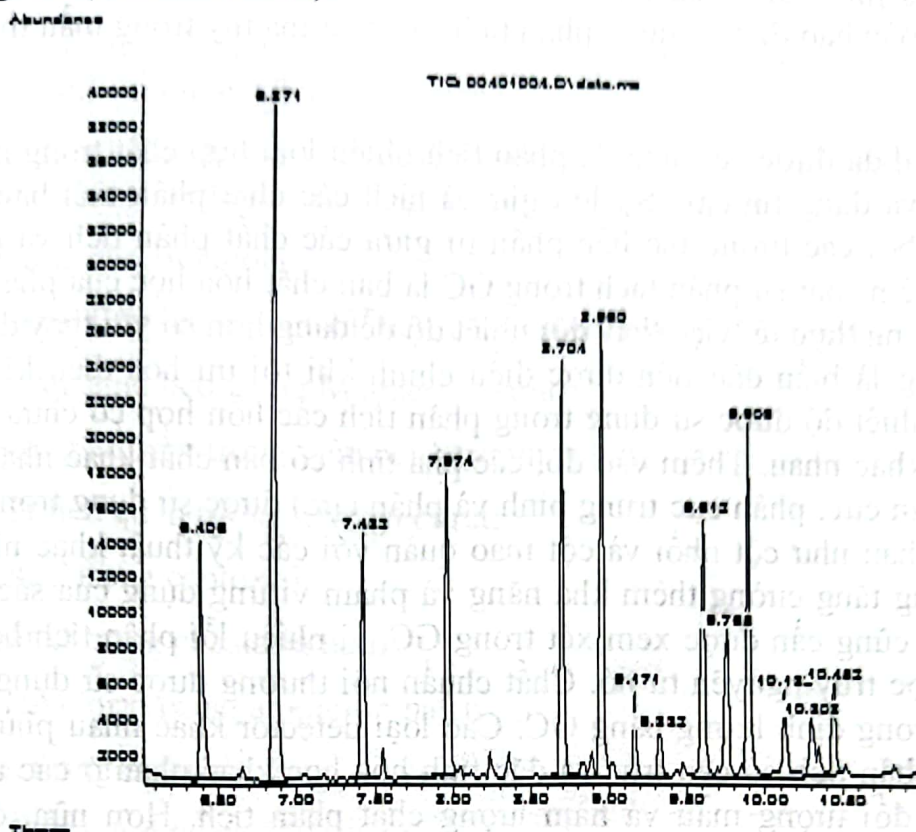
MDMA: 3,4 - methylenedioxy - N - methylamphetamin

MDEA: 3,4 - methylenedioxy - N - ethylamphetamin

Việt Nam là một điểm nóng về ma túy do đó phương pháp phân tích ma túy cũng được phát triển mạnh. Các nhà khoa học ở Viện Khoa học hình sự - Bộ Công an, Viện Pháp y trung ương, Viện Pháp y quân đội đã có nhiều nghiên cứu về lĩnh vực này. Phương pháp phân tích sử dụng là GC - FID, LC - MS/MS, điện di mao quản, nhưng chủ yếu là GC - MS với đối tượng phân tích là máu, nước tiểu, móng tay, móng chân, tóc. Chất phân tích được chiết vào dung môi hữu cơ sau đó dẫn xuất hóa với thuốc thử thích hợp để tăng cường độ nhạy của phép phân tích. Trong một nghiên cứu gần đây, nhóm tác giả ở Viện Pháp y trung ương đã xây dựng thành công phương pháp GC - MS phân tích đồng thời 9 chất kích thích nhóm amphetamin và ketamin cùng 2 chất chuẩn nội đồng vị trong tóc và nước tiểu. Các chất được chiết bằng dung môi hữu cơ ở pH thích hợp, sau đó dẫn xuất hóa với thuốc thử heptafluorobutyric anhydrid. Các chất được tách bằng cột HP5 - MS (30 m x 250  $\mu$ m; 0,25  $\mu$ m); khí mang heli, tốc độ dòng 1 ml/phút; chương trình nhiệt độ cột: Ban đầu 80°C giữ trong 3 phút, tăng lên 40°C/min đến 200°C và giữ trong 1 phút, tiếp tục tăng 10°C/min đến 290°C và giữ trong 6 phút; thể tích tiêm mẫu 1  $\mu$ l, chế độ không chia dòng; nhiệt độ buồng tiêm mẫu: 250°C. Chế độ phát hiện bằng detector khối phổ sử dụng bộ phân tích khối tử cực với điều kiện: Chế độ ion hóa dương với nguồn ion hóa va chạm điện tử, năng lượng ion hóa 70 eV; nhiệt độ nguồn ion hóa: 230°C; chế độ chọn lọc ion (SIM). Hình 4.18 là sắc ký đồ và Bảng 4.15 trình bày các mảnh ion dùng trong định tính và định lượng các chất nghiên



cứu. Phương pháp có LOD nằm trong khoảng 0,02 - 0,10 ng/mg (mẫu tóc) và 0,77 - 4,29 ng/ ml (mẫu nước tiểu).



**Hình 4.18.** Sắc ký đồ GC - MS của các chất gây nghiện và chuẩn nội trên nền mẫu tóc (dẫn chất hóa với thuốc thử heptafluorobutyric anhydrid)

**Bảng 4.15.** Mảnh ion mẹ và ion sản phẩm của các chất nghiên cứu

Chất phân tích dẫn xuất với HFBA	t <sub>R</sub> (phút)	Ion mẹ (m/z)	Ion sản phẩm (m/z)
Amphetamin	6,42	331	240, 118, 91,...
Methamphetamin	6,90	345	254, 118, 91,...
Para - Methoxy amphetamin	7,46	316	148, 168, 240,...
3,4 - methylenedioxyamphetamin	8,01	375	135, 162, 77,...
3,4 - methylenedioxy - N - methylamphetamin	8,74	389	254, 162, 210,...
3,4 - methylenedioxy - N - ethylamphetamin	8,99	403	268, 176, 135,...
4 - Bromo - 2,5 - dimethoxy amphetamin	9,95	470	231, 258, 260,...
Ketamin	10,37	434	370, 362, 236,...
Norketamin	9,21	420	384, 340, 314,...
Methamphetamin - d5	6,88	350	258, 213, 92,...
Ketamin - d4	10,36	438	374, 366, 183,...

Mảnh phổ ion sản phẩm in đậm được dùng để định lượng.



Như vậy, GC - MS là một kỹ thuật đóng vai trò rất quan trọng trong phân tích các chất ma túy. Sự phối hợp giữa dẫn xuất hóa và phân tích bằng GC - MS đem lại một phương pháp hoàn hảo để ứng dụng phân tích các chất ma túy trong mẫu thử sinh học.

### Kết luận

Sắc ký khí đã được sử dụng để phân tích nhiều loại hợp chất trong nhiều thập kỷ vì nó ổn định và đáng tin cậy. Sự lưu giữ và tách các chất phân tích bằng sắc ký khí được chi phối bởi các tương tác liên phân tử giữa các chất phân tích và pha tĩnh. Hai yếu tố chính kiểm soát sự phân tách trong GC là bản chất hóa học của pha tĩnh và nhiệt độ cột tách. Trong thực tế, việc thay đổi nhiệt độ dễ dàng hơn so với thay đổi cột, vì vậy nhiệt độ thường là biến đầu tiên được điều chỉnh khi tối ưu hóa điều kiện phân tích. Chương trình nhiệt độ được sử dụng trong phân tích các hỗn hợp có chứa các hợp chất có độ bay hơi khác nhau. Thêm vào đó, các pha tĩnh có bản chất khác nhau về mặt hóa học (không phân cực, phân cực trung bình và phân cực) được sử dụng trong chế tạo các loại cột khác nhau như cột nhồi và cột mao quản với các kỹ thuật khác nhau như bao, WCOT, ... càng tăng cường thêm khả năng và phạm vi ứng dụng của sắc ký khí. Quá trình tiêm mẫu cũng cần được xem xét trong GC, vì nhiều lỗi phân tích hoặc hiệu suất kém có thể được truy nguyên từ nó. Chất chuẩn nội thường được sử dụng để cải thiện độ chính xác trong định lượng bằng GC. Các loại detector khác nhau phù hợp để phát hiện các chất phân tích có cấu trúc và đặc tính hóa học khác nhau ở các mức nồng độ khác nhau tùy đối tượng mẫu và hàm lượng chất phân tích. Hơn nữa, dẫn xuất hóa những chất không bay hơi tạo sản phẩm bay hơi có thể phân tích được bằng GC đã mở rộng hơn nữa phạm vi ứng dụng của phương pháp. Một điểm cộng cho sắc ký khí đó là “phương pháp xanh” thân thiện môi trường do giảm thiểu việc sử dụng các dung môi hữu cơ trong quy trình phân tích. Trong khi các phương pháp sắc ký và phân tách mới tiếp tục được phát triển, gần như chắc chắn rằng sắc ký khí sẽ vẫn là một trong những phương pháp chính trong phân tách hóa học.

### CÂU HỎI TỰ LƯỢNG GIÁ

1. Phân tích được đặc điểm, vai trò của pha tĩnh, pha động, detector trong phân tích bằng GC.
2. Trình bày được sự cần thiết và vai trò của chương trình hóa nhiệt độ trong tách các chất có nhiệt độ bay hơi khác nhau bằng GC.
3. Trình bày các cách tiêm mẫu trong sắc ký khí.
4. Những trường hợp nào phải dẫn xuất hóa khi phân tích bằng GC? Cho ví dụ cụ thể.
5. Trình bày được ứng dụng của GC trong định tính, định lượng, xác định tạp chất trong kiểm nghiệm thuốc. Cho ví dụ cụ thể.
6. Trình bày được ứng dụng của GC trong xác định các nitrosamin trong kiểm nghiệm thuốc nhóm sartan. Cho ví dụ cụ thể.
7. Trình bày được ứng dụng của GC trong xác định dung môi tồn dư trong thuốc nguyên liệu và thuốc thành phẩm. Cho ví dụ cụ thể.
8. Trình bày được ứng dụng của GC trong phân tích hóa chất bảo vệ thực vật bằng các loại detector. Cho ví dụ cụ thể.