

ESTABLISHING THE PROCEDURE OF DETERMINATION OF 2 - PHENOXYETHANOL CONTENT IN VACCINES BY REVERSED-PHASE HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY

**Dam Thi Lieu*¹, Doan Huu Thien, Duong Thi Cam Le, Pham Quang Minh,
Canh Huyen Trang, Nguyen Quyet Thang**

** The National Institute for Control of Vaccines and Biologicals*

Received 3 November 2022

Accepted 4 January 2023

Abstract: Currently, 2 - phenoxyethanol (ethylene glycol monophenylete) with the chemical formula $C_8H_{10}O_2$ is commonly used as a preservative in cosmetic products, drugs and vaccines. Commercial products such as cosmetics, drugs and vaccines must be tested for 2 - phenoxyethanol content before use in accordance with the Pharmacopoeia and the National Regulatory Agency's regulations. This study was conducted to develop a procedure to determine 2 - phenoxyethanol content in vaccines based on ICH Guidelines and the actual conditions at the Physico-chemical Department, NICVB. In this study, we use the experimental describing method in the laboratory. A procedure for determination of 2 - phenoxyethanol content in Havax and Tetraxim vaccines on Thermo Scientific chromatography system, column C18 (150 x 4.6 mm) with mobile phase of acetonitrile/water solution at the ratio 50/50 (v/v), DAD detector, detection wavelength 270 nm has been established and validated. Results on the system compatibility using 2 - phenoxyethanol solution 6 mg/ml: %RSD of the peak area is 0,39%; %RSD of the retention time is 0,02%; tail drag coefficient is 1,22; number of theoretical plates is 13182. The repeatability on Tetraxim and Havax samples are 0,37% and 0,42% respectively. The reproducibility on Tetraxim and Havax samples are 0,71% and 0,48% respectively. The recovery (R%) of 2 - phenoxyethanol solution 5 µl/ml added to the Tetraxim test sample is from 96,99% to 100,04%; of 2 - phenoxyethanol solution 6 mg/ml added to the Havax sample is from 96,80% to 100,43%. Robustness was determined through a range of flow rate: 0,9; 1,0; 1,1 ml/min; a range of acetonitrile/water ratio (mobile phase): 52/48; 50/50; 48/52 (v/v); a range of column temperature: 20, 25, 30°C. %RSD of the 2 - phenoxyethanol content at the standard points are from 0,28 to 2,98%. The bias Δ_i of the standard points are from 0,01 to 5,31%. LOQ = 0,0026%. Linearity: %RSD at standard points from 1,15 to 3,19%; The bias of the standard points are from 0,16 to 6,68%. The specificity was studied on degradation and forced conditions which resulted in the secondary peak separating the main peak. The uncertainty of Tetraxim and Havax samples are 0,052 µl/dose and 0,070 mg/ml respectively. We have succeeded in this study, achieving the purposes of optimizing and validating the procedure of determination of 2 - phenoxyethanol content in vaccines in accordance with the practical conditions at the Department, with the vaccine samples containing 2 - phenoxyethanol with different matrices varying from simple to complex. The uncertainty of the two test samples is consistent with the results for 2 - phenoxyethanol content in the samples.

Keywords: 2 - phenoxyethanol, tetraxim, havax, chromatography, reverse phase chromatography.

* Corresponding author
E-mail address: damthilieunicvb@gmail.com
<https://doi.org/10.56086/jcvb.v3i1.80>

XÂY DỰNG QUY TRÌNH XÁC ĐỊNH HÀM LƯỢNG 2 - PHENOXYETHANOL TRONG VẮC XIN BẰNG PHƯƠNG PHÁP SẮC KÝ PHA ĐẢO

**Đàm Thị Liễu*, Đoàn Hữu Thiển, Đường Thị Cẩm Lệ, Phạm Quang Minh,
Cảnh Huyền Trang, Nguyễn Quyết Thắng**

**Viện Kiểm định Quốc gia Vắc xin và Sinh phẩm y tế*

Nhận ngày 3 tháng 11 năm 2022

Chấp nhận đăng ngày 4 tháng 1 năm 2023

Tóm tắt: Hiện nay, 2 - phenoxyethanol (etylen glycol monophenylete) với công thức hóa học là $C_8H_{10}O_2$ được sử dụng làm chất bảo quản trong mỹ phẩm, thuốc và vắc xin. Các sản phẩm thương mại như mỹ phẩm, thuốc và vắc xin trước khi sử dụng phải được kiểm tra xác định hàm lượng 2 - phenoxyethanol theo qui định của Dược Điển và cơ quan quản lý Quốc gia. Nghiên cứu này được tiến hành nhằm xây dựng được quy trình xác định hàm lượng 2 - phenoxyethanol trong vắc xin theo hướng dẫn của ICH phù hợp với điều kiện thực tại của Khoa. Nghiên cứu sử dụng phương pháp mô tả thực nghiệm trong phòng thí nghiệm. Quy trình xác định hàm lượng 2- phenoxyethanol trong vắc xin havax và tetraxim trên hệ thống sắc ký Thermo Scientific, cột C18 (150 x 4,6 mm) với pha động là dung dịch acetonitrile/nước tỷ lệ 50/50 (v/v), detector DAD, bước sóng phát hiện 270 nm đã được xác nhận giá trị sử dụng với kết quả cụ thể: tính thích hợp của hệ thống trên dung dịch 2 - phenoxyethanol 6 mg/ml với %RSD của diện tích peak là 0,39%; %RSD của thời gian lưu là 0,02%; hệ số kéo đuôi là 1,22; số đĩa lý thuyết là 13182. Độ lặp lại trên mẫu tetraxim và havax lần lượt là: 0,37%; 0,42%. Độ tái lặp trên mẫu tetraxim và havax lần lượt là: 0,71%; 0,48%. Độ thu hồi (R%) của dung dịch 2 - phenoxyethanol 5 µl/ml được thêm vào mẫu thử tetraxim từ 96,99% đến 100,04%; dung dịch 2 - phenoxyethanol 6 mg/ml được thêm vào mẫu thử havax từ 96,80% đến 100,43%. Độ mạnh được xác định thông qua sự thay đổi nhỏ tốc độ dòng lần lượt 0,9; 1,0; 1,1 ml/phút, tỷ lệ pha động acetonitrile/nước (v/v) lần lượt là: 52/48; 50/50; 48/52; nhiệt độ cột lần lượt là 20, 25, 30°C; kết quả %RSD của hàm lượng 2 - phenoxyethanol tại các điểm chuẩn nằm trong khoảng từ 0,28 đến 2,98%; độ lệch Δi của các điểm chuẩn từ 0,01 đến 5,31%. LOQ = 0,0026%. Tính tuyến tính: %RSD tại các điểm chuẩn từ 1,15 - 3,19%; độ lệch Δi tại của các điểm chuẩn từ 0,16 đến 6,68%. Độ đặc hiệu nghiên cứu trên điều kiện suy thoái và cưỡng cho kết quả peak phụ tách rời peak chính. Độ không đảm bảo đo trên mẫu tetraxim và havax lần lượt là 0,052 µl/liều; 0,070 mg/ml. Chúng tôi đã thành công trong nghiên cứu, đạt mục tiêu nghiên cứu phù hợp với điều kiện thực tiễn tại Khoa, phù hợp với mẫu vắc xin chứa 2 - phenoxethanol có các nền mẫu khác nhau từ đơn giản đến phức tạp. Độ không đảm bảo đo của hai mẫu thử phù hợp với kết quả hàm lượng 2 - phenoxyethanol trong mẫu.

Từ khoá: 2 - phenoxyethanol, tetraxim, havax, sắc ký, sắc ký pha đảo.

1. Đặt vấn đề

Hiện nay, 2 - phenoxyethanol (etylen glycol monophenylete) với công thức hóa

học là $C_8H_{10}O_2$ được sử dụng làm chất bảo quản trong sản phẩm mỹ phẩm, thuốc và vắc xin [7]. Các sản phẩm thương mại

như mỹ phẩm, thuốc và vắc xin trước khi sử dụng phải được kiểm tra xác định hàm lượng 2 - phenoxyethanol theo qui định của Dược Điển và cơ quan quản lý Quốc gia.

Có nhiều phương pháp xác định hàm lượng 2 - phenoxyethanol [6], [8], tuy nhiên phương pháp sắc ký pha đảo sử dụng cột C₁₈ (150 x 4,6 mm, 3 µm) với pha động acetonitrile - nước tỷ lệ 50/50 (v/v); tốc độ dòng 1,0 ml/phút; nhiệt độ cột 25 °C có nhiều ưu điểm hơn như: đơn giản, nhanh chóng, sử dụng hóa chất ít độc hại và không đòi hỏi trang thiết bị phức tạp, đắt tiền. Tại Khoa Hoá lý, phương pháp này chưa được tối ưu hoá và xác nhận giá trị sử dụng. Để đảm bảo chất lượng thử nghiệm theo yêu cầu của ISO/IEC 17025:2005, NRA và GLP [1], chúng tôi tiến hành thực hiện nghiên cứu xây dựng quy trình xác định hàm lượng

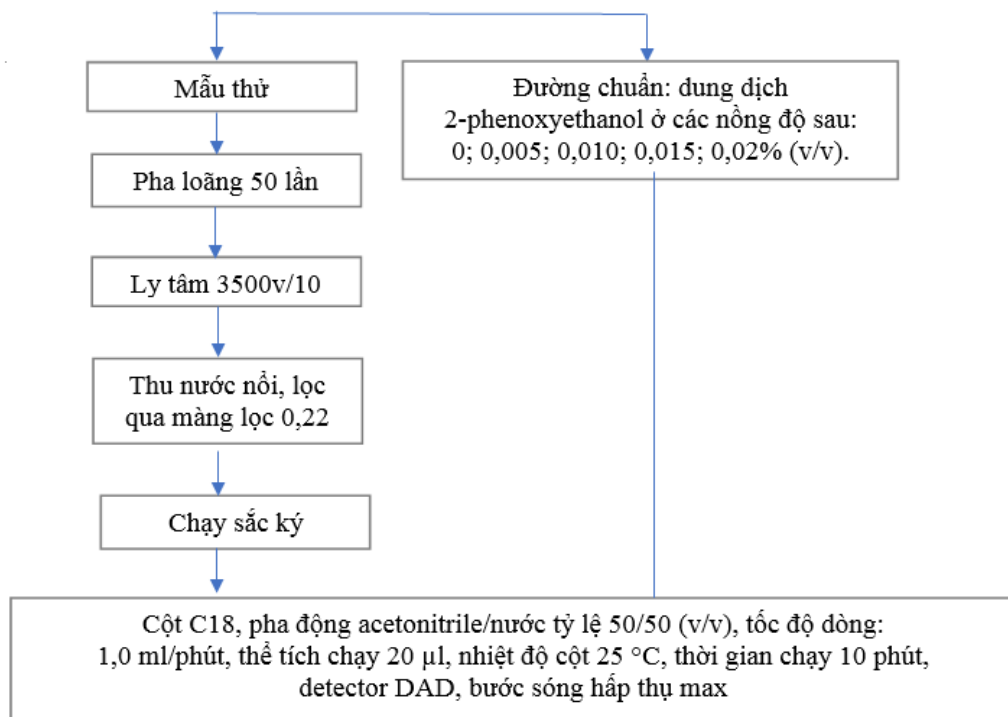
2 - phenoxyethanol trong vắc xin bằng sắc ký pha đảo với các mục tiêu sau:

1. Xây dựng và tối ưu hóa quy trình “xác định hàm lượng 2 - phenoxyethanol trong vắc xin bằng sắc ký pha đảo”.
2. Thẩm định quy trình “xác định hàm lượng 2 - phenoxyethanol trong vắc xin bằng sắc ký pha đảo”.
3. Tính độ không đảm bảo đo cho kết quả thử nghiệm “xác định hàm lượng 2 - phenoxyethanol trong vắc xin bằng sắc ký pha đảo” trên mẫu TetraXim và Havax.

2. Phương pháp nghiên cứu

2.1. Đối tượng nghiên cứu

- Đối tượng nghiên cứu: Quy trình xác định hàm lượng 2 - phenoxyethanol bằng phương pháp sắc ký pha đảo.



2.2. Địa điểm và thời gian nghiên cứu

- Địa điểm nghiên cứu: Khoa Hóa lý, Viện kiểm định Quốc gia Vắc xin và sinh phẩm Y tế.

- Thời gian nghiên cứu: Từ năm 2021 đến năm 2022.

2.3. Nguyên vật liệu, thiết bị sử dụng trong nghiên cứu

- Vắc xin tetraxim phối hợp 4 thành phần, nhà sản xuất Sanofi Pasteur: 65 ml (đại diện cho mẫu có nền mẫu phức tạp, có tiêu chuẩn hàm lượng 2 - phenoxyethanol nằm trong khoảng từ 2 - 3 µl/liều).

+ Loạt số: U3C411V; Hạn dùng: 07/2022, số lượng: 65 bơm tiêm.

+ Loạt số: T3C433V; Hạn dùng: 01/2022, số lượng: 65 bơm tiêm.

- Vắc xin havax phòng bệnh viêm gan A; nhà sản xuất Vabiotech: 65 ml (đại diện cho nhóm vắc xin có nền mẫu đơn giản, có tiêu chuẩn hàm lượng 2 - phenoxyethanol $\leq$ 6,0 mg/ml).

+ Loạt số: AC-010420; Hạn dùng: 03/2022, số lượng: 70 lọ.

+ Loạt số: AC-031220; Hạn dùng: 11/2022, số lượng: 60 lọ.

- Dung dịch 2 - phenoxyethanol chuẩn 6 mg/ml; pha tại Khoa Kiểm định Hóa lý: 40 ml.

- Dung dịch 2 - phenoxyethanol chuẩn 5 µl/ml; pha tại Khoa Kiểm định Hóa lý: 40 ml.

- Mẫu thêm chuẩn: thêm chuẩn tại nồng độ 2 - phenoxyethanol của mẫu thử theo tỷ lệ 1:1.

+ Havax/dd 2 - phenoxyethanol 6,0 mg/ml (tỷ lệ 1/1): 15 ml

+Tetraxim/dd 2 - phenoxyethanol 5,0 µl/ml (tỷ lệ 1/1): 15 ml

- Thiết bị: Hệ thống sắc ký Thermo Scientific bao gồm: Bộ bơm mẫu tự động (Model:WPS-3000TSL, seri: 8158528); Bơm phân phối dung môi (pump, model: LPG-3400SD, seri: 8158349); Buồng cột (model: TCC-3000SD, seri: 6022715), Đầu dò DAD (model: DAD-3000, seri: 8158306); Cột phân tích C18/tiền cột (code: 10772369/092418). Hệ thống đã được đánh giá IQ, OQ, PQ.

2.4. Phương pháp nghiên cứu

Phương pháp nghiên cứu mô tả thực nghiệm.

2.5. Thiết kế nghiên cứu

Bước 1: Tối ưu hoá quy trình theo sơ đồ mục 2.1

Bước 1: Tối ưu hoá quy trình theo sơ đồ mục 2.1									
Quyết phổ/2-phenoxyethanol chuẩn			Chọn tỷ lệ pha động acetonitrile/nước (v/v)						
Thực hiện 3 lần			30/70		40/60		50/50		
Chọn bước sóng tại đó 2 - phenoxyethanol hấp thụ cực đại			Thực hiện mỗi độ pha 3 lần, trong 3 ngày khác nhau. Tiêu chuẩn lựa chọn theo ICH.						
Bước 2: Thẩm định quy trình trên thông số đã tối ưu									
Tính thích hợp hệ thống	Độ lặp lại	Độ tái lập	Độ đúng	Độ đặc hiệu	Tính tuyến tính	LOQ	Độ mạnh		
5 lần lặp/2 -phenoxyethanol chuẩn, cùng ngày, cùng kiểm nghiệm viên, cùng lô hoá chất. Tiêu chuẩn: % RSD thời gian lưu, diện tích peak ≤ 1 %. T _f trung bình ≤ 2,0. Số đĩa lý thuyết N ≥ 2000 [9].	9 lần lặp/mẫu thử, cùng ngày, cùng kiểm nghiệm viên, cùng lô hoá chất. Tiêu chuẩn: 0,99 ≤ R ² ≤ 1 [2] - Hàm lượng 2 - phenoxyethanol của từng lần lặp trên từng mẫu nằm trong khoảng giá trị trung bình ± 2SD của mẫu đó [2]. - % RSD của từng mẫu ≤ 3,7 % [5].	3 nhóm, mỗi nhóm thực hiện trên mẫu thử 5 lần/5 ngày khác nhau. Tiêu chuẩn: 0,99 ≤ R ² ≤ 1 [2]. - Hàm lượng 2 - phenoxyethanol của từng mẫu nằm trong khoảng giá trị trung bình ± 2SD [10]. - % RSD của 1 nhóm, 3 nhóm ≤ 6,0 %	1 nhóm, thực hiện trên mẫu chuẩn, mẫu thêm chuẩn, mẫu 6 lần. Tiêu chuẩn: Độ thu hồi (%): 95 % R % ≤ 105 %	Thực hiện quy trình trên 2 - phenoxyethanol tiếp xúc với HCl 0,5M; NaOH 0,5M; UV/24h; 60°C/1h). Tiêu chuẩn: - Dung dịch HCl 0,5 M; NaOH 0,5 M, nước deion không cho peak tại thời gian lưu trùng với thời gian lưu của peak 2 - phenoxyethanol trong các mẫu có chứa 2 - phenoxyethanol. - Đối với các điều kiện cường độ bức không gây ảnh hưởng tới nồng	Sử dụng kết quả đo quang của đường chuẩn trong xác định độ đúng. Tiêu chuẩn: - 0,99 ≤ R ² ≤ 1,0 [2]. - Các giá trị đo được của từng điểm trên đường chuẩn phải nằm trong khoảng giá trị trung bình tại điểm đó ± 2SD [2]. - % RSD của hàm lượng 2 - phenoxyethanol tại các điểm chuẩn có nồng độ từ 0,005 - 0,01 ≤ 11 % [5]. - % RSD của	Sử dụng kết quả đo quang của đường chuẩn trong xác định độ đúng. Tiêu chuẩn: Độ đúng và độ chính xác theo	Thay đổi nhỏ của tốc độ dòng lần lượt 0,9; 1,0; 1,1 ml/phút, tỷ lệ pha động acetonitrile/nước (v/v) lần lượt là: 52/48; 50/50; 48/52; nhiệt độ cột lần lượt là 20, 25, 30°C; Tiêu chuẩn: - 0,99 ≤ R ² ≤ 1 [2] - Các giá trị đo được của từng điểm trên đường chuẩn phải nằm trong khoảng giá trị trung bình tại điểm đó ± 2SD [10].		

				độ 2 - phenoxyethanol thì phổ của mẫu chồng khít với phổ của mẫu chứng tương ứng. - Đối với các điều kiện cưỡng bức gây ảnh hưởng tới nồng độ 2 - phenoxyethanol thì phổ của mẫu không chồng khít với phổ của mẫu chứng tương ứng, xuất hiện các peak phụ, các peak phụ phải được tách rời đỉnh với peak chính [9].	hàm lượng 2 - phenoxyethanol tại các điểm chuẩn có nồng độ từ lớn hơn 0,01 - 0,02 ≤ 8 % [5]. - Độ chệch các điểm nồng độ trong đường chuẩn $\Delta i \leq 15 \%$ [2].	AOAC phụ lục F tại nồng độ LOQ.	- % RSD của hàm lượng 2 - phenoxyethanol tại các điểm chuẩn có nồng độ từ 0,005 - 0,01 ≤ 11 % [5]. - % RSD của hàm lượng 2 - phenoxyethanol tại các điểm chuẩn có nồng độ từ lớn hơn 0,01 - 0,02 ≤ 8 % [5].
Độ KĐB đo: Sử dụng kết quả hàm lượng 2 - phenoxyethanol trong mục độ chính xác trung gian.							

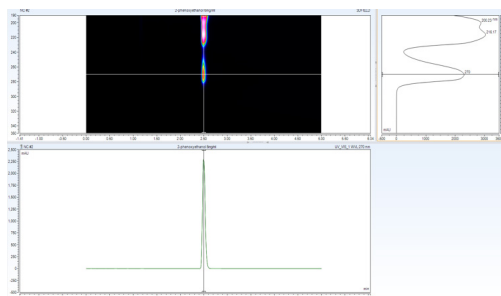
2.6. Phương pháp phân tích số liệu

Phân tích thống kê xử lý số liệu bằng phần mềm Microsoft Excel.

3. Kết quả

3.1. Kết quả tối ưu hóa qui trình

3.1.1. Khảo sát bước sóng hấp thụ cực đại



Hình 1: ảnh quét phổ tìm bước sóng hấp thụ cực đại của 2 - phenoxyethanol

Hình ảnh quét phổ cho thấy bước sóng hấp thụ cực đại của 2 - phenoxyethanol là 270 nm

3.1.2. Kết quả lựa chọn tỷ lệ thành phần pha động

Bảng 1: Kết quả chọn tỷ lệ thành phần pha động

Acetonitrile/nước (v/v)	Thời gian lưu (t_r)	Thừa số lưu giữ (k')	Hệ số kéo đuôi (T_f)	Số đĩa lý thuyết (N)
30/70	3,994	3,84	1,28	11533
40/60	3,081	3,67	1,25	12386
50/50	2,537	3,57	1,23	13171

Kết quả cho thấy: Cả 3 điều kiện các chỉ số: hệ số lưu giữ (k'), hệ số kéo đuôi (T_f), số đĩa lý thuyết (N) đều thỏa mãn điều kiện đặt ra theo tiêu chuẩn ICH: k' trung bình nằm trong khoảng 2 - 5, hệ số kéo đuôi T_f , T_f trung bình $\leq 2,0$, số đĩa lý thuyết N,

N trung bình ≥ 2000 . Tại điều kiện III cho thời gian lưu (t_r) là nhỏ nhất, peak đối xứng nhất vì vậy ta lựa chọn tỷ lệ thành phần pha động acetonitrile/nước là 50/50 (v/v).

3.2. Kết quả thẩm định qui trình

3.2.1. Tính thích hợp của hệ thống

Bảng 2: Tính thích hợp của hệ thống trên dung dịch 2 - phenoxyethanol 6 mg/ml

Giá trị	Diện tích peak	Thời gian lưu (phút)	Hệ số kéo đuôi (T_f)	Số đĩa lý thuyết (N)
TB	22,58	2,56	1,22	13182
SD	0,0879	0,0004	0,0117	111,2694
RSD (%)	0,39	0,02	0,96	0,84

Kết quả cho thấy % RSD của thời gian lưu và diện tích peak dung dịch 2 - phenoxyethanol 6 mg/ml nhỏ hơn 1%. Hệ

số kéo đuôi nhỏ hơn 2,0. Số đĩa lý thuyết > 2000 . Thử nghiệm đạt về tính thích hợp của hệ thống theo tiêu chuẩn ICH.

3.2.2. Độ lặp lại

Bảng 3: Độ lặp lại trên mẫu thử

Giá trị	Hàm lượng 2 - phenoxyethanol	
	Tetraxim (µl/liều)	Havax (mg/ml)
TB	2,48	5,40
SD	0,0127	0,0228
RSD (%)	0,37	0,42

Kết quả cho thấy %RSD của tetraxim và havax lần lượt là 0,37; 0,42 ≤ 3,7%.

Quy trình đạt về độ lặp lại theo tiêu chuẩn

AOAC phụ lục f [5].

3.2.3. Độ chính xác trung gian

Bảng 4: Kết quả độ chính xác trung gian của 3 nhóm trên mẫu tetraxim

Giá trị	Hàm lượng 2 – phenoxyethanol (µl/liều)		
	Nhóm 1	Nhóm 2	Nhóm 3
TB	2,47	2,49	2,47
SD	0,0130	0,0182	0,0130
RSD (%)	0,53	0,73	0,53

Bảng 5: Kết quả độ chính xác trung gian của 3 nhóm trên mẫu havax

Giá trị	Hàm lượng 2 – phenoxyethanol (mg/ml)		
	Nhóm 1	Nhóm 2	Nhóm 3
TB	5,49	5,54	5,53
SD	0,0114	0,0122	0,0268
RSD (%)	0,21	0,22	0,49

Kết quả cho thấy %RSD đối với mẫu tetraxim của nhóm 1: 0,53%; nhóm 2: 0,73%; nhóm 3: 0, 53%. %RSD đối với mẫu havax của nhóm 1: 0,21%, nhóm 2: 0,22%, nhóm 3: 0,49%. %RSD của từng

nhóm, của 3 nhóm trong các ngày khác < 6,0%. Quy trình đạt về độ chính xác trung gian theo tiêu chuẩn AOAC phụ lục f [5].

3.2.4. Độ đúng

**Bảng 6: Kết quả độ đúng trên mẫu tetraxim
Độ thu hồi của dung dịch 2-phenoxyethanol 6 mg/ml và 5 µl/ml**

Lần TN	Độ thu hồi (R%)	
	Dd 2-phenoxyethanol 6 mg/ml	Dd 2-phenoxyethanol 5 µl/ml
1	100,43	99,30
2	99,59	100,04
3	96,80	98,11
4	97,53	97,51
5	98,77	100,04
6	98,58	96,99

Độ thu hồi của dung dịch 2 - độ đúng theo tiêu chuẩn AOAC phụ lục f [5].
 phenoxyethanol 6mg/ml và 5µl/ml của các ngày
 $R(\%) = 96,80\% - 100,43\%$ nằm trong khoảng
 $95\% \leq R\% \leq 105\%$. Quy trình đạt yêu cầu về

3.2.5. Độ mạnh

Bảng 7: %RSD của diện tích peak, % Δ_i của các điểm chuẩn ở các điều kiện khác nhau

Đ/c	%RSD của diện tích peak								
	Nhiệt độ cột			Tỷ lệ acetonitrile/nước			Tốc độ dòng		
	20 °C	25 °C	30 °C	52/48	50/50	48/52	0,9 ml/ phút	1,0 ml/ phút	1,1 ml/ phút
0,005	0,68	0,53	1,57	1,34	0,53	2,38	2,10	0,53	2,06
0,010	2,97	2,42	1,34	2,98	2,42	1,32	0,28	2,42	0,98
0,015	0,73	2,92	0,65	1,63	2,92	0,98	1,31	2,92	2,13
0,020	1,17	1,34	0,34	1,46	1,34	1,82	1,46	1,34	2,45
Đ/c	% Δ_i của các điểm chuẩn								
	20°C	25°C	30°C	52/48	50/50	48/52	0,9 ml/ phút	1,0 ml/ phút	1,1 ml/ phút
	20 °C	25 °C	30 °C	52/48	50/50	48/52	0,9 ml/ phút	1,0 ml/ phút	1,1 ml/ phút
0,005	3,94	4,40	2,68	1,07	4,40	1,52	2,04	4,40	2,97
0,010	2,76	2,21	1,45	3,08	2,21	1,28	1,12	2,21	4,18
0,015	0,52	2,05	0,45	1,30	2,05	0,85	0,97	2,05	2,21
0,020	1,42	1,20	0,88	1,07	1,20	1,44	1,78	1,20	1,69

% RSD của hàm lượng 2 - phenoxyethanol tại các điểm chuẩn có nồng độ từ 0,005 - 0,02 nằm trong khoảng từ 0,28 đến $2,98 < 8\%$. Độ chênh Δ_i của các điểm chuẩn có nồng độ từ 0,005 - 0,020 nằm trong khoảng từ 0,01 - $5,31\% < 15\%$. Như vậy ở các điều kiện khác biệt nhỏ về nhiệt độ cột, tốc độ dòng, thành phần tỷ lệ pha động không tác động ảnh hưởng tới quy trình. Quy trình đạt về độ mạnh.

3.2.6. Giới hạn định lượng

$$LOQ = 10 S/a = 10 * 0,5464 / 2086,4 =$$

0,0026% (s: sai số chuẩn của phương trình đường chuẩn $y = ax + b$, a: độ dốc của đường chuẩn).

Xác nhận lại LOQ trên mẫu tetraxim, havax pha loãng tại nồng độ LOQ thu được %RSD của hàm lượng 2 - phenoxyethanol từ $1,63 - 3,68\% < 11\%$; độ thu hồi từ $93,46 - 102,31\%$ nằm trong khoảng từ 80 - 110%. Quy trình đạt yêu cầu về độ đúng và độ chính xác tại $LOQ = 0,0026\%$.

3.2.7. Tính tuyến tính của đường chuẩn

Bảng 8: Diện tích peak, hệ số tương quan tuyến tính (R^2), %RSD diện tích peak, Δ_i (%) hàm lượng 2-phenoxyethanol của 6 lần lặp đường chuẩn

Lần TN	Đường chuẩn ^x								(R ²)
	0,005%		0,010%		0,015%		0,020%		
	S _{peak}	Δ _i (%)	S _{peak}	Δ _i (%)	S _{peak}	Δ _i (%)	S _{peak}	Δ _i (%)	
1	10,2156	3,20	21,2687	2,62	30,8796	0,16	40,9599	0,39	0,9998
2	10,1986	3,37	20,9687	1,15	31,0678	0,46	41,0269	0,23	0,9999
3	10,3009	2,37	22,0036	6,22	32,6128	5,51	41,9654	2,07	0,9994

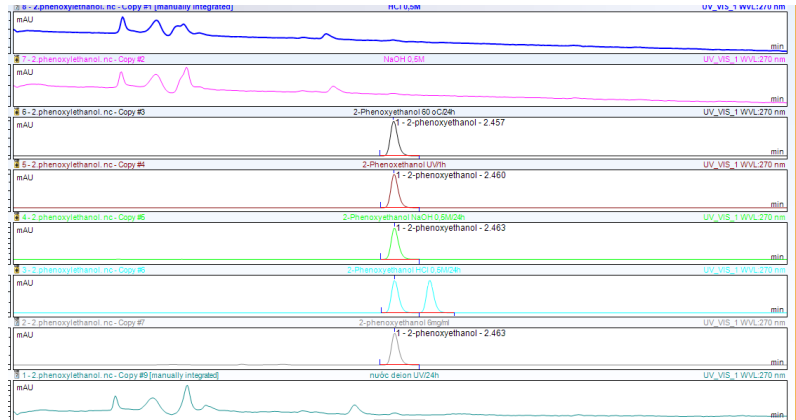
4	10,2069	3,29	21,6859	4,67	32,9688	6,68	42,0268	2,22	0,9993
5	10,3568	1,82	21,7256	4,86	30,8786	0,16	41,8869	1,88	0,9996
6	10,9080	3,59	21,8026	5,24	30,6576	0,88	41,6524	1,31	0,9994
TB	10,3645	2,94	21,5759	4,14	31,5109	2,31	41,5864	1,35	
%RSD	2,64		1,77		3,19		1,15		

Kết quả trên cho thấy hệ số hồi quy tuyến tính (R^2) trong từng lần thử nghiệm đều nằm trong khoảng 0,99 - 1,0. % RSD tại mỗi điểm chuẩn từ 0,005 - 0,01% nằm trong khoảng từ 1,77 - 2,64 < 11%. % RSD tại mỗi điểm chuẩn từ 0,015 - 0,020% nằm trong khoảng từ 1,15 - 3,19 < 8% [5]. Độ chệch Δ tại các điểm chuẩn nằm trong khoảng từ 0,16 - 6,68% < 15% [2]. Quy trình đạt yêu cầu về tính tuyến tính với khoảng làm việc 0,005 - 0,020% của 2 - phenoxyethanol.

3.2.8. Độ đặc hiệu

Dung dịch HCl 0,5M; NaOH 0,5M;

nước deion không cho peak tại thời gian lưu trùng với thời gian lưu của peak 2 - phenoxyethanol trong các mẫu có chứa 2 - phenoxyethanol. Đối với các điều kiện cưỡng bức: tiếp xúc 60°C trong 1h; chiếu tia UV trong 24h; tiếp xúc NaOH 0,5M trong 24h không gây ảnh hưởng tới 2 - phenoxyethanol, phổ của mẫu chồng khít với phổ của mẫu chứng tương ứng. Tiếp xúc với HCl 0,5M gây ảnh hưởng tới 2 - phenoxyethanol và phổ sắc ký xuất hiện peak phụ ngoài peak của 2 - phenoxyethanol, peak phụ được tách rời đỉnh với peak chính. Quy trình đạt về độ đặc hiệu [8].



Hình 2: Hình ảnh peak của các mẫu nghiên cứu cưỡng bức suy thoái

3.3. Kết quả xác định độ không đảm bảo đo của phương pháp

Bảng 9: Ước lượng độ không đảm bảo (KĐB) đo trên mẫu thử

	Tetraxim (μl/liều)	Havax (mg/ml)
TB chung	2,48	5,52
S^2_{H} phương sai lặp lại	0,00022	0,00033
S^2_{Rj} phương sai tái lập	0,000467	0,00091
u_{H} độ không đảm bảo đo của phép thử	0,026	0,035
U (độ không đảm bảo đo mở rộng)	0,052	0,070

4. Bàn luận

Việc lựa chọn quyết phổ hấp phụ của 2 - phenoxyethanol trong khoảng từ 200 - 300 nm là do có sự khác nhau về bước sóng hấp phụ cực đại của 2 - phenoxyethanol giữa hai nghiên cứu của Borremans và G. A. Shabir. Nghiên cứu của Borremans và các cộng sự (năm 2004) công bố bước sóng hấp thụ cực đại của 2 - phenoxyethanol là 270 nm, trong khi G. A. Shabir và các cộng sự (năm 2010) công bố bước sóng hấp thụ cực đại của 2 - phenoxyethanol là 258 nm. Sau khi quyết phổ trên hệ thống HPLC và đầu dò DAD tại Khoa Hoá lý bước sóng hấp thụ cực đại của 2 - phenoxyethanol thu được là 270 nm phù hợp với nghiên cứu của Borremans và các cộng sự (năm 2004) [6] [8].

Kết quả khảo sát tỷ lệ thành phần pha động, khi chế độ rửa giải thay đổi từ I đến III (ứng với tỷ lệ acetonitrile tăng dần) thì 2 - phenoxyethanol được rửa giải nhanh hơn tức thừa số lưu giữ k' của 2 - phenoxyethanol giảm xuống. Nguyên nhân là do acetonitrile có khả năng hòa tan tốt 2 - phenoxyethanol, do đó tỷ lệ acetonitrile càng cao thì thuận lợi cho sự rửa giải. Tại điều kiện III cho thời gian lưu (tr) là nhỏ nhất, hệ số lưu giữ k' nằm trong khoảng 2 - 5, hệ số kéo đuôi T_f thấp nhất thỏa mãn điều kiện $\leq 2,0$. Hệ số kéo đuôi càng tiến gần về giá trị 1 chứng tỏ peak càng đối xứng tốt. Số đĩa lý thuyết là lớn nhất chứng tỏ hiệu suất sử dụng của cột là lớn nhất.

Nồng độ dung dịch 2 - phenoxyethanol 5 $\mu\text{l/ml}$ quy đổi sang đơn vị mg/ml là 5,53 mg/ml . Nhóm nghiên cứu đã sử dụng dung dịch 2 - phenoxyethanol 6 mg/ml dùng

cho đánh giá tính thích hợp của hệ thống bởi theo quy định của ICH tính thích hợp của hệ thống phải đánh giá trên dung dịch chuẩn. Mặt khác, hai nồng độ 5,53 mg/ml và 6 mg/ml không có sự chênh lệch lớn về mặt nồng độ nên có thể dùng một trong hai dung dịch này và ở đây chúng tôi chọn nồng độ 6 mg/ml . Lý do sử dụng 2 dung dịch 2 - phenoxyethanol 6 mg/ml và 5 $\mu\text{l/ml}$ để thêm vào hai mẫu Havax và Tetraxim là bởi thử nghiệm yêu cầu thêm chuẩn tại nồng độ tương đương với nồng độ mẫu thử. Vì vậy trong phần đánh giá độ đúng ta cần tính độ thu hồi của hai dung dịch 2 - phenoxyethanol 6 mg/ml và 5 $\mu\text{l/ml}$.

Việc thay đổi các thông số thử nghiệm (tốc độ dòng, thành phần tỷ lệ pha động, nhiệt độ cột) trong phần thiết kế độ mạnh của thử nghiệm theo hướng dẫn của ICH: nhiệt độ cột thay đổi $\pm 5^\circ\text{C}$, tỷ lệ thành phần pha động thay đổi $\pm 5\%$, tốc độ dòng thay đổi $\pm 10\%$ so với thông số ban đầu. Do đó chúng tôi đưa ra các thông số cụ thể đánh giá ở 3 mức: nhiệt độ cột: 20°C ; 25°C ; 30°C ; tỷ lệ pha động acetonitrile/nước (v/v): 48/52; 50/50; 52/48; tốc độ dòng: 0,9; 1,0; 1,1 ml/phút [9].

Nồng độ đường chuẩn trong phương pháp nằm trong khoảng từ 0,005 - 0,020%, có giới hạn định lượng là 0,0026% do đó phù hợp các mẫu có hàm lượng 2 - phenoxyethanol từ 0,0026% trở lên.

Phương pháp xác định hàm lượng 2 - phenoxyethanol được nghiên cứu phù hợp sử dụng để định lượng hàm lượng 2 - phenoxyethanol có trong các mẫu vắc xin với độ pha loãng kiến nghị sau:

Bảng 9: Danh mục vắc xin và độ pha loãng mẫu kiểm nghị

Stt	Tên vắc xin	Nhà sản xuất	Độ pha loãng
1	Avaxim 160 U	Sanofi Pasteur	50 lần
2	Avaxim 80 U	Sanofi Pasteur	50 lần
3	Havax	Vabiotech	50 lần
4	Easy six	Panacea Biotec	50 lần
5	Imovax Polio	Sanofi Pasteur	50 lần
6	Tetraxim	Sanofi Pasteur	50 lần

Độ KĐB đo của mẫu tetraxim, havax lần lượt là 0,052 $\mu\text{l/liều}$, 0,070 mg/ml chiếm 2,1%; 1,30% so với kết quả hàm lượng 2 - phenoxyethanol trung bình trong mẫu thử tương ứng. Phương pháp có độ KĐB đo thấp và có độ tin cậy cao. Với kết quả độ KĐB như trên hàm lượng 2 - phenoxyethanol trong mẫu tetraxim, havax sẽ được biểu diễn lần lượt là: $2,48 \pm 0,052 \mu\text{l/liều}$, $5,52 \pm 0,070 \text{ mg/ml}$. Điều này có nghĩa là 95% kết quả hàm lượng 2 - phenoxyethanol trong mẫu tetraxim nằm trong khoảng từ 2,428 đến 2,532 $\mu\text{l/liều}$, 95% kết quả hàm lượng 2 - phenoxyethanol trong mẫu havax nằm trong khoảng từ 5,45-5,59 mg/ml [3].

5. Kết luận và Kiến nghị

Đề tài đã thực hiện đầy đủ 3 mục tiêu đã đề ra: Xác định được bước sóng hấp thụ cực đại của 2 - phenoxyethanol tại điều kiện thực tế của Khoa là 270 nm; xác định tỷ lệ thành phần pha động tối ưu nhất acetonitrile/nước (v/v) là 50/50. Hoàn thành thẩm định quy trình với các tiêu chí (tính thích hợp của hệ thống, độ chính xác, độ đúng, độ đặc hiệu, độ mạnh, tính tuyến tính, giới hạn định lượng của phương pháp) đạt theo tiêu chuẩn tham chiếu. Xác định được độ KĐB đo mở rộng cho phương pháp trên mẫu thử tetraxim: $U = 0,052 \mu\text{l/liều}$; havax: $U = 0,070 \text{ mg/ml}$ với độ tin cậy 95%.

Áp dụng quy trình vào kiểm định mẫu thường quy tại khoa Hóa lý, Viện Kiểm

định Quốc gia Vắc xin và Sinh phẩm y tế với tất cả các vắc xin có hàm lượng 2 - phenoxyethanol từ 0,0026% trở lên. Công bố độ không đảm bảo cho của phép thử đối với mẫu tetraxim và havax khi trả lời kết quả phân tích. Xác định và công bố độ không đảm bảo đo của phép thử cho các mẫu khác theo yêu cầu bắt buộc của ISO/IEC 17025:2017.

Tài liệu tham khảo

- [1] ISO/IEC 17025:2005: Yêu cầu chung về năng lực của phòng thử nghiệm và hiệu chuẩn.
- [2] Trần Cao Sơn. Thẩm định phương pháp trong phân tích hóa học và vi sinh”. Nhà xuất bản Khoa học kỹ thuật Hà Nội.
- [3] TCVN 9595-3:2013: Độ không đảm bảo đo - Phần 3: Hướng dẫn trình bày độ không đảm bảo đo.
- [4] SOP KĐQG 34: Hướng dẫn thẩm định quy trình.
- [5] AOAC Official Methods of Analysis (2016), Guidelines for Standard Method Performance Requirements Appendix F, p. 9.
- [6] Borremans, M., Van Loco, J., Roos, P. et al. Validation of HPLC Analysis of 2-Phenoxyethanol, 1-Phenoxypropan-2-ol, Methyl, Ethyl, Propyl, Butyl and Benzyl 4-Hydroxybenzoate (Parabens) in Cosmetic Products, with Emphasis on Decision Limit and Detection Capability. Chromatographia 59.