

ĐỊNH HƯỚNG CÔNG TÁC KIỂM TRA VÀ GIÁM SÁT CHẤT LƯỢNG THUỐC NĂM 2017

PGS. TS. ĐOÀN CAO SON

Viện trưởng Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương

Năm qua hệ thống kiểm nghiệm trên cả nước đã phát huy truyền thống của ngành; cố gắng nỗ lực trên mọi mặt, hoàn thành xuất sắc nhiệm vụ được giao, tích cực hưởng ứng các phong trào thi đua, kết quả đã nhận được nhiều thành tích đáng khích lệ, cụ thể:

- Hội đồng thi đua của Hệ thống kiểm nghiệm đã đề nghị Bộ trưởng Bộ Y tế tặng bằng khen cho 19 tập thể và 39 cá nhân đã có thành tích xuất sắc trong công tác kiểm tra, giám sát và đảm bảo chất lượng thuốc năm 2016. Hai đơn vị là Trung tâm Kiểm nghiệm Gia Lai và Trung tâm Kiểm nghiệm Bắc Kạn đã được đề nghị tặng Cờ thi đua của Bộ Y tế.

- Về năng lực của hệ thống kiểm nghiệm: đến nay toàn hệ thống đã có 9 đơn vị đạt GLP và 39 đơn vị đạt tiêu chuẩn ISO/IEC-17025.

Hội thảo tổng kết công tác kiểm tra, giám sát chất lượng thuốc năm 2016 tại Thành phố Hạ Long vào ngày 31 tháng 3 năm 2017 đã nhất trí đề ra định hướng công tác và các nhiệm vụ trọng tâm cho hệ thống kiểm nghiệm năm 2017.

1. Định hướng công tác

- Tăng cường lấy mẫu để kiểm tra chất lượng có trọng tâm, trọng điểm và kiểm tra thuốc sử dụng trong các bệnh viện; dựa trên số liệu báo cáo của các đơn vị, Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương tổng hợp danh mục các hoạt chất thường có vi phạm chất lượng cung như danh sách các công ty trong/ngoài nước có vi phạm chất lượng trong năm 2016 để các đơn vị trong hệ thống kiểm nghiệm có định hướng xây dựng kế hoạch lấy mẫu trên thị trường và tại các cơ sở khám chữa bệnh.

- Nâng cao năng lực kiểm nghiệm dược liệu và thuốc từ dược liệu, cụ thể là tăng cường cơ sở vật chất, trang thiết bị, tăng quỹ chuẩn dược liệu và tập trung đào tạo về kỹ thuật kiểm nghiệm dược liệu và thuốc từ dược liệu.

- Hoàn thành tốt các chức năng nhiệm vụ và kế hoạch được giao, đồng thời mở rộng hoạt động chuyên môn kỹ thuật theo hướng sau:

+ Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương và Viện Kiểm nghiệm thuốc Tp. Hồ Chí Minh: cần tăng cường triển khai nghiên cứu đánh giá sinh khả dụng và tương

đương sinh học của thuốc. Tiếp tục nghiên cứu triển khai kiểm nghiệm các thuốc có nguồn gốc sinh học, enzym và dược liệu. Mở các lớp đào tạo cho các trung tâm kiểm nghiệm và các phòng kiểm nghiệm của các doanh nghiệp Dược về chuyên môn kỹ thuật, quản lý chất lượng; đánh giá liên phòng và thử nghiệm thành thạo; quản lý phòng thí nghiệm theo tiêu chuẩn GLP và ISO/IEC-17025.

+ Các Trung tâm kiểm nghiệm tỉnh, thành phố cần tiếp tục củng cố và tăng cường cơ sở vật chất kỹ thuật, đào tạo cán bộ để chuẩn bị tiền đề cho hoàn thiện theo nguyên tắc GLP, làm tốt công tác tham mưu cho Sở Y tế về công tác kiểm tra, giám sát chất lượng thuốc, mỹ phẩm và thực phẩm. Thực hiện kịp thời và đúng nguyên tắc công tác kiểm tra chất lượng thuốc nhập khẩu trước khi lưu hành theo kế hoạch của Bộ Y tế.

2. Nhiệm vụ trọng tâm

2.1. Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương và Viện Kiểm nghiệm thuốc Tp. Hồ Chí Minh

- Xây dựng kế hoạch lấy mẫu để làm căn cứ thực hiện, trong đó tập trung lấy mẫu từ đầu nguồn; tại các nhà phân phối, nhập khẩu.

- Đối tượng lấy mẫu: chú ý nguyên liệu ban đầu, dược liệu, thuốc đông dược, dạng bào chế nhiều thành phần, các dược chất và dạng bào chế kém ổn định về chất lượng, mỹ phẩm. Xây dựng danh mục trọng tâm một số hoạt chất hóa dược cần lấy mẫu kiểm tra và xây dựng danh mục một số dược liệu cần tăng cường lấy mẫu điều tra khảo sát chất lượng, bên cạnh đó chú trọng việc thiết lập dược liệu chuẩn để phục vụ công tác kiểm nghiệm.

- Đầu mối thực hiện đề án nâng cao năng lực kiểm nghiệm dược liệu và thuốc từ dược liệu theo Kế hoạch triển khai thực hiện Quy hoạch tổng thể phát triển dược liệu đến năm 2020 và định hướng đến năm 2030 của ngành Y tế.

- Tăng cường kiểm tra chất lượng mỹ phẩm, chú trọng phát triển phương pháp kiểm tra các chất cấm, chất độc hại trong mỹ phẩm.

- Chú trọng thiết lập chất chuẩn nhằm tăng quỹ chất chuẩn, chất đối chiếu và dược liệu chuẩn để phục vụ

công tác kiểm nghiệm, nhằm tăng tỷ lệ kiểm tra chất lượng toàn bộ đối với các hoạt chất, chế phẩm lưu hành trên thị trường.

- Đầu tư các trang thiết bị và triển khai các phương pháp kiểm nghiệm chuyên sâu, mở rộng các phép thử để có thể tiến tới kiểm tra toàn bộ các thuốc chuyên khoa, các dạng bào chế đặc biệt và các chế phẩm sinh học trên thị trường.

- Củng cố và kiện toàn Trung tâm Đánh giá tương đương sinh học, tiếp tục đầu tư nguồn lực để nâng cao năng lực thử nghiệm đánh giá tương đương sinh học và sinh khả dụng của thuốc.

2.2. Các trung tâm kiểm nghiệm

- Xây dựng kế hoạch để nâng cao năng lực kiểm tra, giám sát chất lượng thuốc, mỹ phẩm và thực phẩm, có lộ trình thích hợp để tiến tới đạt tiêu chuẩn ISO/IEC-17025 và GLP. Tích cực tham gia chương trình thử nghiệm thành thạo năm 2017 và các lớp tập huấn kỹ thuật do hai Viện tổ chức.

- Xây dựng kế hoạch lấy mẫu theo định hướng và

chỉ đạo chuyên môn của Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương.

- Cần báo cáo kịp thời tình hình chất lượng thuốc, các mẫu không đạt chất lượng về hai Viện để có hướng giải quyết và xử lý tiếp theo, tránh để lọt lưới các thuốc kém chất lượng lưu hành trên thị trường.

2.3. Các phòng kiểm tra chất lượng của cơ sở sản xuất kinh doanh dược

- Xây dựng và thẩm định phương pháp kiểm nghiệm các sản phẩm theo hướng khả thi với trang thiết bị kỹ thuật hiện có, phù hợp với yêu cầu của Thông tư số 44/2014/TT-BYT ngày 25/11/2014 Quy định việc đăng ký thuốc.

- Nghiên cứu độ ổn định của thuốc do đơn vị sản xuất để đảm bảo thuốc có chất lượng trong suốt thời gian lưu hành nhất là đối với các chế phẩm đã từng vi phạm chất lượng.

- Tăng cường tự thanh kiểm tra chất lượng các sản phẩm của mình trước và trong quá trình lưu hành trên thị trường.

NGHIÊN CỨU KHOA HỌC

ĐỊNH LƯỢNG VINCAMIN TRONG VIÊN NÉN CHỨA HAI THÀNH PHẦN VINCAMIN VÀ RUTIN BẰNG PHƯƠNG PHÁP SẮC KÝ LỎNG HIỆU NĂNG CAO

NGUYỄN THỊ HỒNG HẠNH, TRẦN THỊ HỒNG ANH, LÊ THỊ QUỲNH ANH
Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương

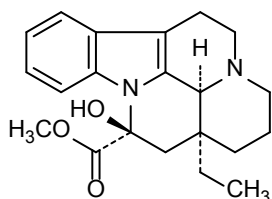
1. Đặt vấn đề

Vincamin có tên khoa học là (3 α ,14 β ,16 α)-14,15-dihydro-14-hydroxyburnamenin-14-carboxylic acid methyl ester.

Công thức phân tử: C₂₁H₂₆N₂O₃

Khối lượng phân tử: 354,44

Công thức cấu tạo



Vincamin là một monoterpenoid indol alkaloid được tìm thấy trong lá của loài Dừa cạn nhỏ thuộc chi Dừa cạn châu Âu, họ *Apocynaceae*, chiếm khoảng 25% - 65% của các alkaloid nhân indol trong lá Dừa cạn (bằng phương pháp cân). Ngoài ra nó có thể được tổng hợp từ các alkaloid liên quan [4].

Vincamin là thuốc cải thiện chú ý, tăng cường trí nhớ và chức năng thần kinh giác quan. Thực tế trên thị trường xuất hiện rất nhiều sản phẩm chứa Vincamin. Trong khi đó các Dược điển Mỹ, Anh, Việt Nam chưa có chuyên luận nguyên liệu cũng như thành phẩm. Để đáp ứng nhu cầu kiểm tra chất lượng và góp phần nâng cao khả năng kiểm tra chất lượng thuốc, trong phạm vi bài viết này chúng tôi xin giới thiệu phương pháp định lượng Vincamin trong viên nén hai thành phần Vincamin và Rutin bằng phương pháp HPLC.

2. Thử nghiệm

2.1. Thiết bị, dụng cụ, hóa chất, chất chuẩn

2.1.1. Thiết bị, dụng cụ

Đã được hiệu chuẩn theo ISO/IEC 17025.

- Máy sắc ký lỏng hiệu năng cao Shimadzu LC 20A với detector diod array;

- Cột phân tích: Lichrocart C18 (250 x 4 mm; 5 μ m);

- Cân phân tích: Mettler Toledo AG245 độ chính xác 0,01 mg;

- Máy lắc siêu âm;

- Bộ lọc dùng cho sắc ký;
- Các dụng cụ thủy tinh: Bình định mức, pipet chính xác, ống đong...

2.1.2. Hóa chất, chất chuẩn

- Amoni carbonat (Scharlau, loại PA);
- Acetonitril loại dùng cho HPLC (Merck);
- Chất chuẩn Vincamin: Nguồn gốc: Công ty Cổ phần Dược phẩm Trung ương 1; Lô SX: 0206768; Hàm lượng: 98,0% (nguyên trạng).
- Chất chuẩn Rutin: Nguồn gốc: Công ty Cổ phần Dược phẩm Trung ương 1; Lô SX: 0410526; Hàm lượng: 99,89% (nguyên trạng).
- Nước cất dùng cho HPLC.

2.2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Đối tượng nghiên cứu

Viên nén phân tán: Suspedin do Công ty Cổ phần Dược phẩm Trung ương 1 sản xuất, số kiểm soát 0112NC. Công thức bào chế cho 1 viên nén như sau:

Vincamin	Hai mươi miligam	20 mg
Rutin	Bốn mươi miligam	40 mg
Tá dược	Vừa đủ	1 viên (khoảng 238 mg)

Mẫu placebo: Là mẫu giả dược Vincamin được chuẩn bị như một mẫu thử nhưng không có thành phần Vincamin.

2.2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.2.1. Điều kiện sắc ký [3]

- Cột LichroCart C18 (250 x 4,0 mm; 5 μ m).
- Detector diod array: 280 nm
- Thẻ tích tiêm mẫu: 20 μ l
- Tốc độ dòng: 1,0 ml/phút
- Pha động: Acetonitril - Amoni carbonat 0,01M (75 : 25).

2.2.2.2. Phương pháp chuẩn bị mẫu [3]

- *Dung dịch chuẩn*: Cân chính xác khoảng 50 mg Vincamin vào bình định mức 50 ml, thêm 40 ml pha động, lắc siêu âm 10 phút để hòa tan, thêm pha động vừa đủ đến vạch. Hút chính xác 2,0 ml dung dịch trên vào bình định mức 50 ml, thêm pha động vừa đủ đến vạch, trộn đều. Lọc qua màng lọc 0,45 μ m.

- *Dung dịch thử*: Cân khối lượng của 20 viên nén, xác định khối lượng trung bình, nghiền thành bột mịn. Cân chính xác khoảng 0,12 g bột viên vào bình định mức 200 ml, thêm 150 ml pha động, lắc siêu âm 10 phút để hòa tan, thêm pha động vừa đủ đến vạch, trộn đều, lọc qua giấy lọc (bỏ khoảng 20 ml dịch lọc đầu), sau đó lọc qua màng lọc 0,45 μ m.

- *Dung dịch placebo*: Cân chính xác khoảng 0,12 g bột placebo vào bình định mức 200 ml, thêm 150 ml pha động, lắc siêu âm 10 phút để hòa tan, thêm pha động vừa đủ đến vạch, trộn đều, lọc qua giấy lọc (bỏ khoảng 20 ml dịch lọc đầu), sau đó lọc qua màng lọc 0,45 μ m. Tiêm riêng rẽ 20 μ l dung dịch chuẩn, dung dịch thử, dung dịch placebo vào hệ thống sắc ký. Ghi lại sắc ký đồ và đáp ứng của pic chính trong dung dịch chuẩn và dung dịch thử.

2.2.2.3. Thẩm định phương pháp [1],[2]

Thẩm định phương pháp phân tích với các chỉ tiêu: tính đặc hiệu, tính thích hợp của hệ thống, khoảng nồng độ tuyến tính, khoảng xác định, độ đúng, độ chính xác.

2.2.2.4. Đánh giá kết quả

- Định tính: Dựa vào hai tiêu chí:
 - + Thời gian lưu: So sánh thời gian lưu của pic thu được từ dung dịch thử và pic thu được từ dung dịch chuẩn Vincamin.

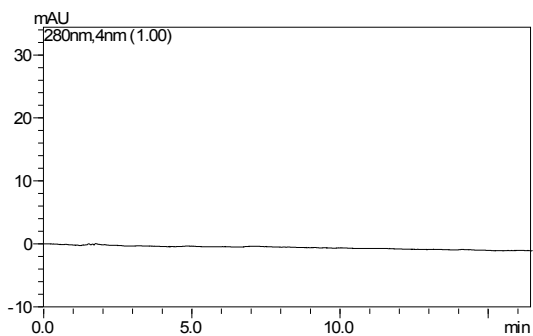
+ Phổ UV-Vis: Trùng phổ UV-Vis của pic trên sắc ký đồ thu được từ dung dịch thử và dung dịch chuẩn: 2 phổ phải tương ứng với nhau (đánh giá bằng hệ số trùng phổ match).

- Định lượng: So sánh diện tích pic thu được từ dung dịch thử với diện tích pic thu được từ dung dịch chuẩn và hàm lượng của chất chuẩn.

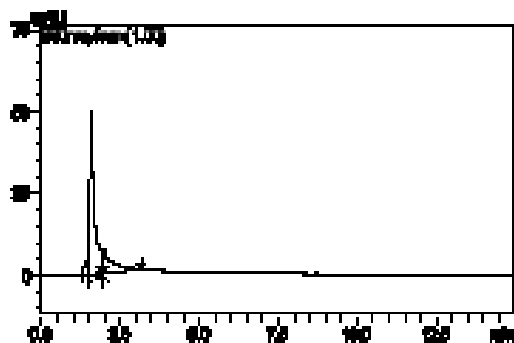
3. Kết quả và bàn luận

3.2.1. Khảo sát tính đặc hiệu

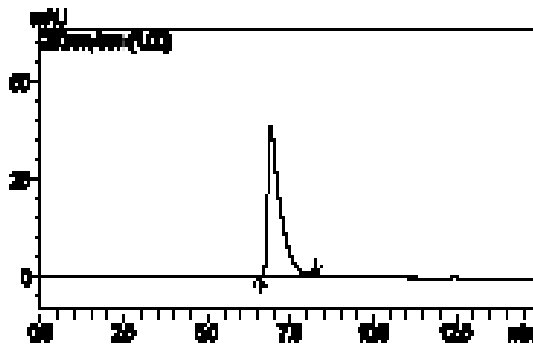
Tiêm lần lượt các mẫu: Dung môi pha mẫu, dung dịch placebo, dung dịch chuẩn, dung dịch thử vào hệ thống sắc ký. Trên sắc ký đồ thu được, dung môi pha mẫu không có pic đáp ứng, dung dịch placebo không có pic ở thời gian lưu tương ứng với pic Vincamin (khoảng 6,8 phút) (Hình 1, Hình 2, Hình 3 và Hình 4). Độ tinh khiết pic Vincamin của dung dịch chuẩn và dung dịch thử đều xấp xỉ 1,0000 (Hình 5 và Hình 6). Phổ hấp thụ tử ngoại khả kiến của pic thu được từ dung dịch thử giống phổ hấp thụ tử ngoại khả kiến của pic thu được từ dung dịch chuẩn với hệ số trùng phổ của Vincamin bằng 0,9969 (Hình 7).



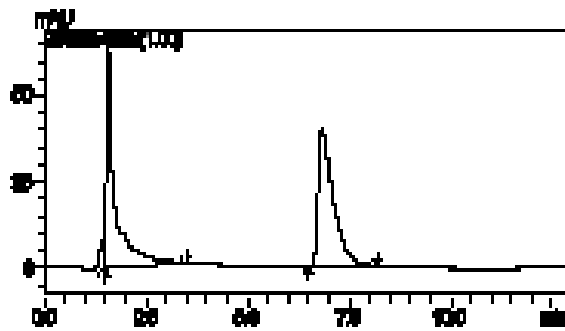
Hình 1. Sắc ký đồ của dung môi pha mẫu



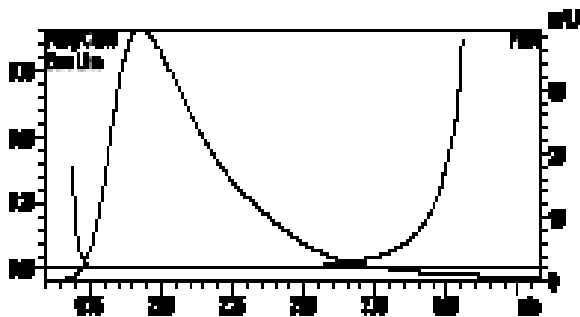
Hình 2. Sắc ký đồ của dung dịch placebo



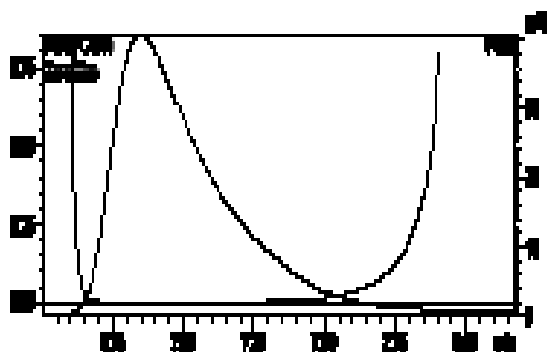
Hình 3. Sắc ký đồ của dung dịch chuẩn



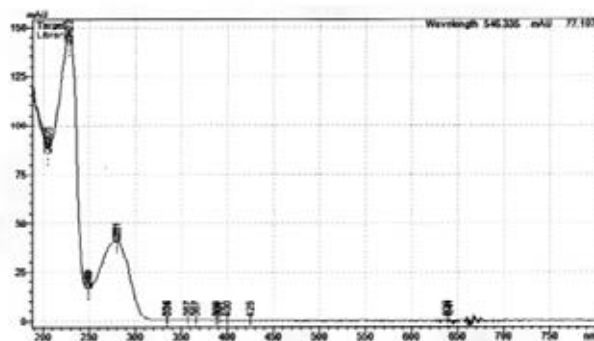
Hình 4. Sắc ký đồ của dung dịch thử



Hình 5. Độ tinh khiết pic Vincamin của dung dịch chuẩn



Hình 6. Độ tinh khiết pic Vincamin của dung dịch thử



Hình 7. Hình ảnh trùng phổ UV-VIS của pic Vincamin trên SKĐ của dung dịch thử và dung dịch chuẩn

Nhận xét: Với các điều kiện sắc ký như trên và từ các kết quả thu được đã chứng tỏ phương pháp là đặc hiệu để phân tích định tính và định lượng hoạt chất Vincamin trong chế phẩm chứa hai thành phần Vincamin và Rutin.

3.2.2. Tính thích hợp của hệ thống sắc ký

Tính thích hợp của hệ thống sắc ký được xác định bằng cách tiến hành tiêm lặp lại 6 lần dung dịch chuẩn Vincamin có nồng độ khoảng 40 µg/ml. Ghi lại các giá trị về thời gian lưu, diện tích pic.

Kết quả khảo sát tính thích hợp của hệ thống sắc ký được trình bày ở Bảng 1.

Bảng 1. Khảo sát tính thích hợp của hệ thống sắc ký

<i>STT</i>	<i>Thời gian lưu (phút)</i>	<i>Diện tích pic (mAU.s)</i>
1	6,912	1014422
2	6,922	1018208
3	6,919	1016714
4	6,917	1018772
5	6,913	1018064
6	6,916	1011468
Trung bình	6,917	1016275
RSD (%)	0,05	0,28

Nhận xét: Phương pháp HPLC đã sử dụng có độ lặp lại cao, RSD của thời gian lưu $t_R = 0,05\%$ và RSD của diện tích pic = 0,28%. Như vậy phương pháp HPLC trên phù hợp cho việc phân tích định tính, định lượng Vincamin trong chế phẩm.

3.2.3. Khảo sát khoảng tuyến tính

Pha một dãy dung dịch chuẩn Vincamin có nồng độ từ 20 - 60 µg/ml (lần lượt tương ứng với 50%, 75%, 100%, 125% và 150% so với nồng độ định lượng). Kết quả được thể hiện trong Bảng 2 và Hình 8.

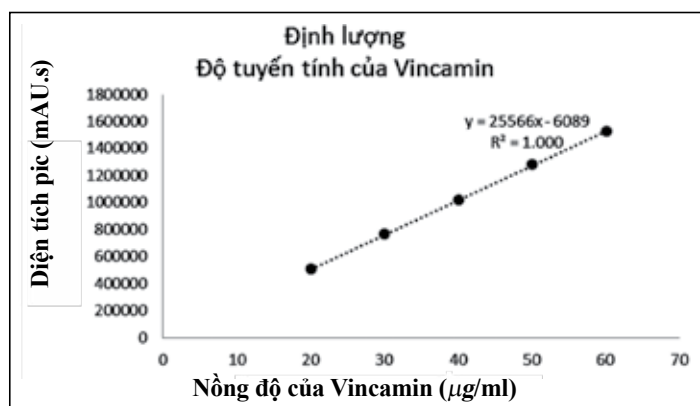
Bảng 2. Kết quả khảo sát tính tuyến tính

<i>Stt</i>	<i>% so với nồng độ định lượng</i>	<i>Nồng độ Vincamin (µg/ml)</i>	<i>Diện tích pic (mAU.s)</i>
1	50	20,04	505220
2	75	30,06	764059
3	100	40,08	1016301
4	125	50,10	1278479
5	150	60,12	1528848

Phương trình hồi quy: $y = 25566x - 6089$

Hệ số tương quan: $r = 1,000$

%Y = 0,6%



Hình 8. Đồ thị khảo sát tính tuyến tính

Nhận xét: Trong khoảng nồng độ đã khảo sát có sự tương quan tuyến tính chặt chẽ giữa nồng độ và diện tích pic đáp ứng với hệ số tương quan $r = 1,000$.

3.2.4. Khảo sát độ đúng của phương pháp

Độ đúng của phương pháp được tiến hành theo phương pháp thêm chuẩn vào mẫu placebo.

Dung dịch chuẩn: Sử dụng dung dịch chuẩn ở mục 3.2.2.

Dung dịch mẫu tự tạo: Thêm một lượng chính xác chất chuẩn Vincamin (khoảng 37,5 mg; 50,0 mg và 62,5 mg tương ứng với 3 mức nồng độ 75%, 100% và 125% so với nồng độ định lượng) và khoảng 740 mg mẫu placebo vào bình định mức 50 ml, thêm 30 ml pha động, lắc siêu âm 10 phút để hòa tan, thêm pha động vừa đủ đến vạch, trộn đều, lọc qua giấy lọc (bỏ khoảng 20 ml dịch lọc đầu), sau đó lọc qua màng lọc 0,45 μm .

Tiến hành sắc ký theo điều kiện đã ghi ở mục 2.2.2.1. Kết quả đánh giá độ đúng của phương pháp được thể hiện ở Bảng 3.

Bảng 3. Kết quả khảo sát độ đúng của phương pháp

Stt	% so với nồng độ định lượng	Lượng cân mẫu placebo (mg)	Lượng chuẩn Vincamin thêm vào mẫu (mg)	Diện tích pic Vincamin (mAU.s)	Lượng Vincamin tìm lại (mg)	% Thu hồi
1	75%	740,1	37,53	761546	37,54	100,03
2	75%	746,7	37,45	757132	37,32	99,67
3	75%	738,2	37,72	768848	37,90	100,48
4	100%	739,9	50,3	1026243	50,59	100,58
5	100%	740,7	50,1	1012202	49,90	99,60
6	100%	742,5	50,2	1016976	50,13	99,87
7	125%	745,3	64,0	1295983	63,89	99,83
8	125%	739,6	62,9	1277669	62,99	100,14
9	125%	736,8	63,7	1296922	63,94	100,37
% Thu hồi trung bình = 100,06%; n = 9; RSD = 0,36%						

Nhận xét: Kết quả khảo sát cho thấy phương pháp phân tích có độ đúng cao với tỷ lệ thu hồi từ 99,60% đến 100,58%.

3.2.5. Khoảng xác định

Trong phần đánh giá độ đúng, độ tuyến tính suy ra khoảng xác định của Vincamin là 30 $\mu\text{g/ml}$ đến 50 $\mu\text{g/ml}$.

3.2.6. Khảo sát độ chính xác của phương pháp

3.2.6.1. Độ lặp lại

Độ lặp lại của phương pháp được đánh giá dựa trên độ lệch chuẩn tương đối của 6 mẫu thử được phân tích riêng biệt theo quy trình phân tích ở mục 2.2.2.1 và 2.2.2.2. Kết quả thể hiện ở Bảng 4.

3.2.6.2. Khảo sát độ chính xác trung gian

Độ chính xác trung gian được đánh giá dựa trên độ lệch chuẩn tương đối của 12 mẫu thử được phân tích riêng biệt ở 2 ngày khác nhau và hai KNV khác nhau. Kết quả thể hiện ở Bảng 4.

Bảng 4. Kết quả khảo sát độ chính xác của phương pháp.

STT	Ngày 1, KNV 1			Ngày 2, KNV 2		
	Lượng cân (g)	Diện tích pic (mAU.s)	Hàm lượng (%)	Lượng cân (g)	Diện tích pic (mAU.s)	Hàm lượng (%)
1	0,1201	1028659	98,91	0,1206	1029660	99,03
2	0,1186	1024133	99,72	0,1189	1027002	100,19
3	0,1203	1032824	99,15	0,1183	1015812	99,60
4	0,1194	1023193	98,96	0,1194	1025963	99,67

5	0,1183	1018237	99,40	0,1193	1032267	100,36
6	0,1198	1025112	98,82	0,1188	1014051	99,01
HLTB = 99,16%; n = 6; RSD = 0,35%				HLTB = 99,64%; n = 6; RSD = 0,57%		
Hàm lượng trung bình = 99,40%; n = 12; RSD = 0,51%						

Nhận xét: Kết quả cho thấy phương pháp có độ chính xác cao, độ lặp lại trong ngày là 0,35% và 0,57% (n = 6), khác ngày là 0,51% (n = 12).

4. Kết luận

Qua khảo sát thực nghiệm, chúng tôi đã xây dựng được phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao để định lượng Vincamin trong viên nén chứa hai thành phần Vincamin và Rutin. Phương pháp xây dựng có sự tương quan tuyến tính chặt chẽ giữa diện tích pic đáp ứng và nồng độ hoạt chất, độ lặp lại, độ chính xác trung gian và độ đúng cao với các điều kiện trang thiết bị, hóa chất thuốc thử phù hợp với đa số các phòng thí nghiệm. Với các kết quả thu được, chúng tôi đề nghị có thể áp dụng phương pháp định lượng đã nghiên cứu để định lượng Vincamin trong các chế phẩm viên nén chứa hai thành phần Vincamin và Rutin.

Tài liệu tham khảo

1. Bộ Y tế - Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương (2010), *Đảm bảo chất lượng thuốc và một số phương pháp kiểm nghiệm thuốc* (Tài liệu đào tạo nâng cao về kiểm nghiệm thuốc).
2. Tạ Mạnh Hùng, Đoàn Cao Sơn (2012), “Hướng dẫn chung thẩm định quy trình phân tích bằng phương pháp HPLC”, *Tạp chí kiểm nghiệm thuốc*, 10 (38), trang 1-8.
3. Tiêu chuẩn Vincamine của nhà sản xuất Fisiopharma SRL, số đăng ký: VN-6291-02.
4. Gerhartz (1985), “Indole Alkaloids”, *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*, (Fifth ed.), FL, VCH publishers, p.393.

SUMMARY

An HPLC method for determination of Vincamine in dispersible tablet Suspedin is introduced:

The mobile phase is programmed as follows:

Acetonitrile - Ammonium carbonate 0.01M (75:25)

- Detector UV: 280 nm

- Column: LichroCart Rp18 (250 x 4.0 mm; 5 μ m)

- Flow rate: 1.0 ml/min

- Injection volume: 20 μ l

The experimental results proved that the proposed HPLC method is rapid, precise and accurate.

NGHIÊN CỨU ỨNG DỤNG QUANG PHỔ CẬN HỒNG NGOẠI ĐỂ ĐỊNH LƯỢNG CEFUROXIM AXETIL TRONG MỘT SỐ CHẾ PHẨM THUỐC VIÊN

TRỊNH THỊ HỒNG THẢO, NGUYỄN THỊ HOA, PHẠM THỊ KIỀU DUNG,
VŨ THỊ NGUYỆT MINH, TRẦN THỊ BÍCH VÂN

Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương

1. Đặt vấn đề

Thuốc giả, thuốc kém chất lượng đang là một vấn đề không chỉ làm đau đầu các cơ quan chức năng mà còn là mối hiểm họa với nhiều người bệnh. Nguy hiểm hơn, những năm qua thuốc giả đã được bày bán cả ở hiệu thuốc, đi vào cả bệnh viện thông qua đầu thầu. Châu Á đang được xem là khu vực bị ảnh hưởng nhiều nhất bởi nạn thuốc giả, đặc biệt vùng Đông Nam Á. Kháng sinh Cefuroxim axetil (CEFUX) là một trong số nhiều thuốc giả ở khu vực Đông Nam Á [4]. Xây

dựng được một phương pháp phát hiện nhanh thuốc giả là một vấn đề cấp thiết. Phương pháp ứng dụng phổ cận hồng ngoại (NIRS) là một phương pháp phát hiện nhanh thuốc giả với ưu điểm ít hoặc không phải chuẩn bị mẫu, có thể phân tích nhiều mẫu trong một thời gian ngắn [1],[2],[3].

Trong phạm vi bài viết này, chúng tôi giới thiệu kết quả định tính và bán định lượng nhanh Cefuroxim axetil trong một số chế phẩm có chứa hoạt chất này bằng phương pháp NIRS.

2. Thực nghiệm

2.1. Thiết bị, dụng cụ, chất chuẩn

2.1.1. Thiết bị và dụng cụ

Đã được hiệu chuẩn theo ISO/IEC 17025 và GLP.

- Máy quang phổ cận hồng ngoại Thermo Scientific Instrument gồm phần mềm đo phổ OMNIC version 9.2 và phần mềm xử lý số liệu và phổ TQ Analyst version 9.2 dùng cho định lượng.

- Cân phân tích Mettler độ chính xác 0,1 mg.

2.1.2. Chất chuẩn

- Chất chuẩn: Cefuroxim axetil của Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương; SKS: 0210167.02; Hàm lượng: 814,5 $\mu\text{g C}_{16}\text{H}_{16}\text{N}_4\text{O}_8\text{S}$ (nguyên trạng).

STT	Tên mẫu	Nhà sản xuất	Số lô	Số đăng ký	Đóng gói
1	HAGINAT 500 (Cefuroxim 500 mg)	Công ty CP DP Hậu Giang	11064	VD-17849-12	Hộp 2 vỉ x 5 viên nén bao phim
2	ZINNAT TABLETS 250 (Cefuroxim 250 mg)	Glaxo Operations UK Ltd	080714	VN-5372-10	Hộp 1 vỉ x 10 viên nén bao phim

2.2.2. Phương pháp nghiên cứu

Tất cả các mẫu đều đo ở chế độ phản xạ khuếch tán. Mỗi phổ quét ở chế độ scan 100, độ phân giải (resolution) 8 cm^{-1} trên giải phổ 400 - 10000 cm^{-1} .

2.2.2.1. Xây dựng các đường chuẩn

- Thêm chất chuẩn CEFU vào 5 mẫu viên nén placebo và 5 mẫu viên nang placebo để thu được các hỗn hợp có chứa CEFU với hàm lượng: 200 mg/g - 400 mg/g - 600 mg/g - 800 mg/g - 1000 mg/g cho mỗi nền tá dược.

- Đo phổ NIRS của các hỗn hợp thu được và sử dụng phần mềm TQ Analyst version 9.2 để thiết lập đường chuẩn.

2.2.2.2. Xác định đường chuẩn thích hợp để định lượng mẫu viên thực tế

- Đo phổ NIRS của các viên nén và nang đối chiếu tự tạo, thiết lập thư viện phổ chuẩn.

- Đo phổ NIRS của mẫu thực tế, so sánh với các phổ trong thư viện phổ chuẩn vừa thiết lập, xác định mẫu viên tự tạo có phổ giống phổ viên thực tế nhất. Sử dụng đường chuẩn được xây dựng từ mẫu placebo tương ứng với viên tự tạo có phổ giống nhất để định lượng CEFU trong mẫu thực tế.

2.2.2.3. Khảo sát độ đặc hiệu

- Chế tạo viên placebo của các nền mẫu thử thực tế.

- Viên đối chiếu tự tạo: Chế tạo 5 mẫu viên nén công thức từ 1 đến 5 có chứa CEFU và 5 mẫu viên nén placebo tương ứng; 5 mẫu viên nang đối chiếu tự tạo chứa CEFU và 5 mẫu viên nang placebo tương ứng.

Lựa chọn các nhóm khác nhau trong số các tá dược sau đây để tạo nền mẫu (5 nền mẫu cho viên nén và 5 nền mẫu cho viên nang): Tinh bột sắn, Tinh bột mỳ, Lactose, Tabletose, Natri crosscarmellose, Dicalci hydrophosphat, Avicel, Talc, Magnesi stearat, Natri starch glycolat, Natri lauryl sulfat, PVP-K30, HPMC.

Các tá dược này là các tá dược được sử dụng phổ biến trên thị trường để sản xuất viên nén và viên nang.

2.2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Mẫu nghiên cứu

- Đo phổ NIRS của các nền placebo của mẫu thử.

- Sử dụng đường chuẩn đã xác định được ở Mục 2.2.2.2 và phần mềm TQ Analyst version 9.2 để định lượng CEFU trong các viên placebo tương ứng.

- Yêu cầu: Kết quả thu được không quá 2,0%.

2.2.2.4. Khảo sát độ lặp lại

- Đo phổ NIRS của các mẫu thử và xác định hàm lượng CEFU trong các mẫu thử dựa trên các đường chuẩn tương ứng đã xác định được ở Mục 2.2.2.2.

2.2.2.5. Khảo sát độ đúng

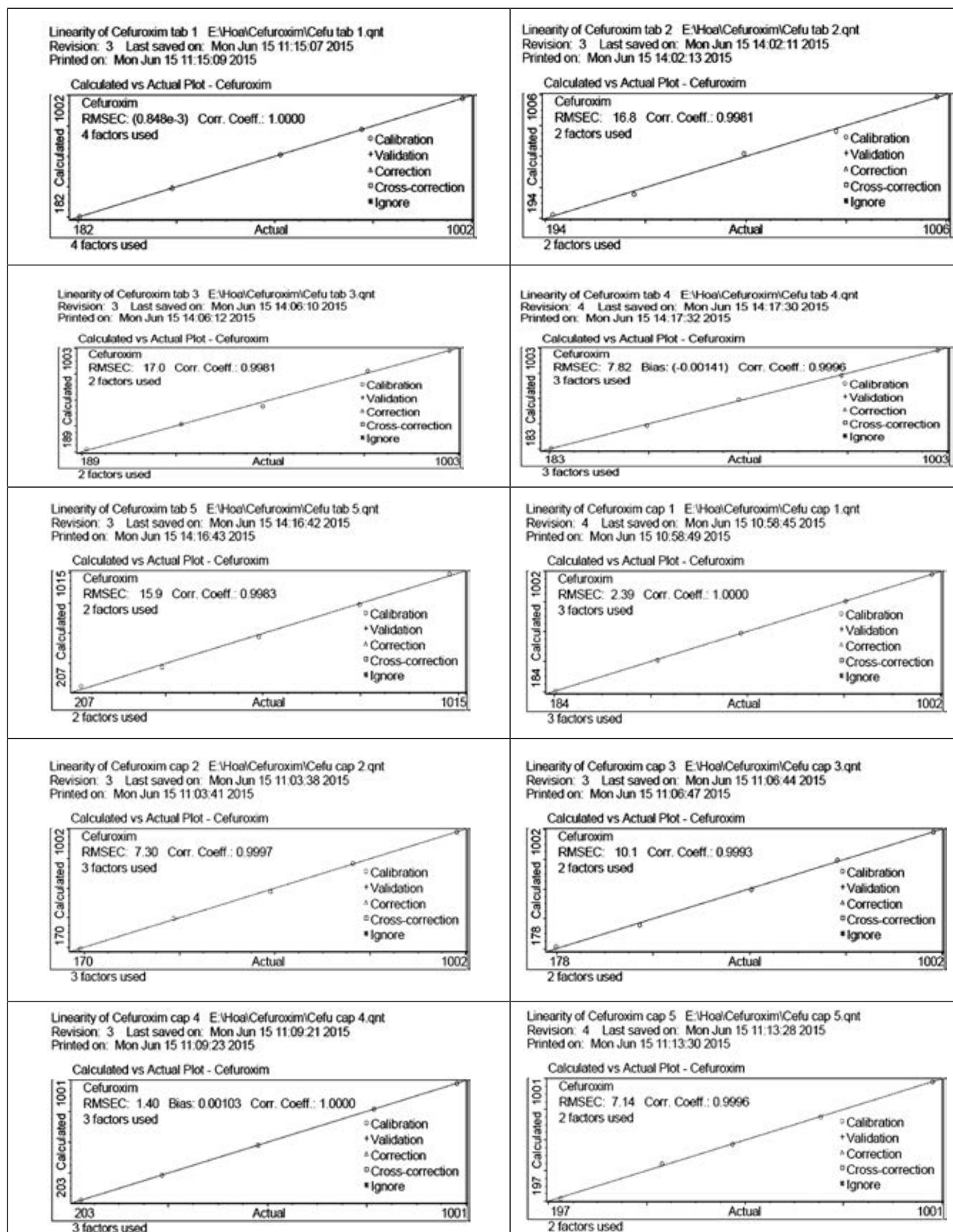
- Trộn chất chuẩn CEFU với từng nền placebo của các mẫu thử để thu được các hỗn hợp có chứa lượng CEFU tương ứng 80% - 100% - 120% so với hàm lượng CEFU ghi trên nhãn.

- Đo phổ NIRS của các hỗn hợp thu được và sử dụng phần mềm TQ Analyst version 9.2 để định lượng và xác định tỷ lệ thu hồi.

3. Kết quả và bàn luận

3.1. Xây dựng các đường chuẩn

10 đường chuẩn dựa trên 10 nền mẫu placebo khác nhau (5 nền viên nén và 5 nền viên nang) được thể hiện trong Hình 1.



Hình 1. Đường chuẩn CEFU dựa trên 10 nền mẫu placebo khác nhau.

Các đường chuẩn xây dựng được cho thấy có sự tương quan tuyến tính giữa độ hấp thụ và nồng độ CEFU với hệ số $r > 0,998$.

3.2. Xác định đường chuẩn thích hợp để định lượng mẫu viên thực tế

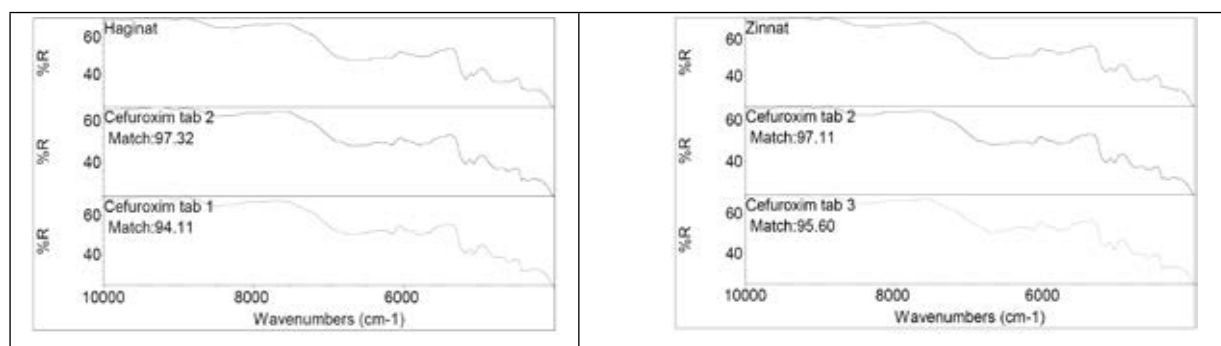
- Xây dựng thư viện phổ NIRS của các viên đối chiếu tự tạo để xác định đường chuẩn định lượng các mẫu thử có chứa CEFU.

- So sánh phổ NIRS của các mẫu thử với phổ viên nén và viên nang đối chiếu tự tạo trong thư viện phổ chuẩn vừa được thiết lập.

Bảng 1. Kết quả so sánh phổ NIRS mẫu thử và mẫu đối chiếu tự tạo

TT	Tên mẫu	Viên đối chiếu tự tạo tương ứng	Hệ số Match *
1	Haginat 500	Viên nén tự tạo công thức 2	97,32%
2	Zinnat tablets 250	Viên nén tự tạo công thức 2	97,11%

* : là hệ số tương đồng phổ lớn nhất thu được



Hình 2. Phổ NIRS của mẫu thử và viên chuẩn tương ứng

Kết quả cho thấy sự tương đồng về phổ NIRS của các mẫu thử với phổ NIRS của các viên nén và viên nang đối chiếu tự tạo chứa CEFU là khá cao (trên 90%). Chúng ta xác định được đường chuẩn để định lượng hai mẫu Haginat và Zinnat đều là đường chuẩn của viên nén tự tạo công thức 2. Kết quả thể hiện trong **Bảng 1** và **Hình 2**.

3.3. Khảo sát độ đặc hiệu

Chế tạo các viên placebo tương ứng với các nền mẫu của viên Haginat và Zinnat, mỗi viên khối lượng khoảng 400 mg. Sử dụng đường chuẩn của viên nén đối chiếu tự tạo công thức 2 để định lượng CEFU trong các viên placebo ấy.

Kết quả hàm lượng CEFU trong các mẫu placebo của hai nền mẫu thử như sau:

Bảng 2. Hàm lượng CEFU trong các mẫu thử

Mẫu placebo tương ứng	Đường chuẩn sử dụng	Hàm lượng CEFU (mg/g)	Hàm lượng % so với nhãn	Hàm lượng trung bình (%)
HAGINAT 500	Viên nén tự tạo CT 2	0,25	0,04	0,03
		0,16	0,02	
		0,19	0,03	
ZINNAT TABLETS 250	Viên nén tự tạo CT 2	0,17	0,03	0,03
		0,23	0,04	
		0,14	0,02	

Kết quả cho thấy hàm lượng CEFU trong các viên placebo của các mẫu thử tương ứng là dưới 2,0%. Như vậy sự ảnh hưởng của placebo lên kết quả định lượng CEFU là không đáng kể. Các đường chuẩn đã thiết lập đảm bảo yêu cầu về độ đặc hiệu để định lượng CEFU trong viên Haginat 500 và Zinnat Tablets 250.

3.4. Khảo sát độ lặp lại

Lựa chọn đường chuẩn thu được từ nền tá dược tương ứng với nền tá dược của viên đối chiếu tự tạo có hệ số đáp ứng (hệ số Match) với mẫu thử là lớn nhất để tính hàm lượng CEFU trong các mẫu thử.

Kết quả hàm lượng CEFU trong các mẫu thử thể hiện trong *Bảng 3*.

Bảng 3. Hàm lượng CEFU trong các mẫu thử

Tên mẫu	Đường chuẩn sử dụng	Hàm lượng nhãn (mg)	Khối lượng trung bình viên (mg)	Nồng độ CEFU (mg/g)	Hàm lượng CEFU (%)	Hàm lượng trung bình (%)
HAGINAT 500	Viên nén CT 2	500	734,6	653,84	96,1	96,1%; n = 6; RSD = 0,07%
				653,12	96,0	
				654,07	96,1	
				653,82	96,1	
				654,56	96,2	
				654,23	96,1	
ZINNAT TABLETS 250	Viên nén CT 2	250	413,2	590,78	97,6	97,7%; n = 6; RSD = 0,12%
				590,14	97,5	
				591,03	97,7	
				590,26	97,6	
				591,56	97,8	
				592,01	97,8	

Kết quả cho thấy phương pháp đạt yêu cầu về độ lặp lại với RSD < 2,0%.

3.5. Khảo sát độ đúng

Trộn chất chuẩn CEFU với từng nền placebo của các mẫu thử để thu được các hỗn hợp có chứa lượng CEFU tương ứng 80% - 100% - 120% so với hàm lượng CEFU ghi trên nhãn. Đo phổ NIRS của các hỗn hợp thu được và sử dụng phần mềm TQ Analyst version 9.2 để định lượng và xác định tỷ lệ thu hồi.

Kết quả được thể hiện trong *Bảng 4*.

Bảng 4. Kết quả khảo sát độ đúng

HAGINAT 500					ZINNAT TABLETS 250				
Lượng placebo (mg)	Lượng thêm vào (mg)	Nồng độ CEFU (mg/g)	Lượng tìm thấy (mg)	Tỷ lệ thu hồi (%)	Lượng placebo (mg)	Lượng thêm vào (mg)	Nồng độ CEFU (mg/g)	Lượng tìm thấy (mg)	Tỷ lệ thu hồi (%)
234,8	402,1	601,04	382,80	95,2	160,7	200,7	539,79	195,08	97,2
235,9	401,5	609,75	388,65	96,8	163,4	202,4	533,94	195,32	96,5
233,5	403,2	616,17	392,31	97,3	161,2	201,6	532,34	193,13	95,8
235,1	501,3	658,28	484,76	96,7	162,5	251,3	595,76	246,53	98,1
236,4	502,4	669,82	494,86	98,5	164,2	252,5	589,59	245,68	97,3
235,3	500,6	641,48	472,07	94,3	162,8	250,6	574,67	237,57	94,8
234,1	601,5	686,01	573,23	95,3	163,4	300,8	631,80	293,28	97,5
236,3	603,2	698,40	586,31	97,2	163,6	303,1	641,01	299,16	98,7
236,8	602,7	726,54	609,93	101,2	162,9	302,5	639,58	297,66	98,4
Trung bình = 96,9%; n = 9; RSD = 2,11%					Trung bình = 97,1% ; n = 9; RSD = 1,30%				

Kết quả độ thu hồi trung bình là 96,9% với RSD là 2,11% đối với mẫu Haginat 500 và 97,1% với RSD là 1,30% đối với mẫu Zinnat tablets 250. Kết quả cho thấy độ đúng của phương pháp là chấp nhận được đối với phương pháp đo trực tiếp trên mẫu mà không loại bỏ nền mẫu.

4. Kết luận

Các kết quả thu được cho thấy phương pháp quang phổ cận hồng ngoại có độ đặc hiệu, độ đúng và độ lặp lại tốt, có thể được ứng dụng để định lượng nhanh Cefuroxim axetil trong một số chế phẩm thuốc viên.

Tài liệu tham khảo

1. Bernard A.Olsen et al., "Screening for counterfeit drugs using Near-infrared spectroscopy", *Pharmaceutical Technology* June 2002, 64-71.
2. USP 34-NF29 (2011), p.1965.
3. M.J.Vredenbregt et al., "Screening suspected counterfeit Viagra® and imitations of Viagra® near-infrared spectroscopy", *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* Volume 40, issue 4, 3 March 2006, pages 840-849.
4. www.thuocantoan.com.vn

SUMMARY

A NIRS method was developed and validated for determination of Cefuroxime axetil (CEFU) in a pharmaceutical dosage form in the presence of sample matrixes. The method was linear over the concentration range of 200 mg CEFU/g to 1000 mg CEFU/g with correlation coefficient higher than 0.998. The % RSD values for precision study were found to be lower than 2.0% for studied samples. The recovery values were found to be 96.9% for Haginat 500 and 97.1% for Zinnat tablets 250.

XÂY DỰNG VÀ THẨM ĐỊNH QUY TRÌNH ĐỊNH TÍNH, ĐỊNH LƯỢNG CONESSIN TRONG DƯỢC LIỆU MỘC HOA TRẮNG BẰNG PHƯƠNG PHÁP HPLC

HÀ VÂN OANH, CHỦ THỊ THANH HUYỀN

HỒ NGỌC KỲ

NGUYỄN THỊ LAN PHƯƠNG,
TRỊNH THỊ QUY, ĐỖ THỊ BÍCH THUẬN

Trường Đại học Dược Hà Nội

Học Viện Quân y

Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương

1. Đặt vấn đề

Mộc hoa trắng (*Holarrhena pubescens* Wall. ex G. Don) là một cây phân bố rộng rãi ở Việt Nam, và cũng đã trở nên quen thuộc đối với nhiều người dân bởi những tác dụng mà nó mang lại. Vỏ thân của cây Mộc hoa trắng được dùng nhiều để chữa lỵ amip và tiêu chảy [2]. Hiện nay trên thị trường đã có nhiều chế phẩm chứa dược liệu Mộc hoa trắng như viên Holanin (Viện Dược liệu), viên Hipolten (Công ty Cổ phần Dược - Vật tư Y tế Hải Dương), viên Mộc hoa trắng HT (Công ty Dược - Vật tư Y tế Hà Tĩnh)...

Chuyên luận dược liệu Mộc hoa trắng (Vỏ thân) cũng đã được ban hành trong Dược điển Việt Nam IV, tuy nhiên trong chuyên luận này chỉ mới dừng lại ở các chỉ tiêu chất lượng cơ bản: Mô tả, vi phẫu, soi bột, định tính bằng phản ứng màu và sắc ký lớp mỏng với chất đối chiếu là Conessin, độ ẩm, tro toàn phần, tro không tan trong acid, kim loại nặng và định lượng alkaloid toàn phần [1]. Vì vậy việc hoàn thiện và nâng cấp chuyên luận này bằng cách bổ sung phương pháp định lượng Conessin là việc làm hết sức quan trọng và cần thiết nhằm nâng cao chất lượng nguyên liệu, với mong muốn tạo ra các sản phẩm có chất lượng để chăm sóc sức khỏe người dân. Trước yêu cầu như vậy chúng tôi đã tiến hành xây dựng và thẩm định phương pháp định tính, định lượng conessin trong dược liệu Mộc hoa trắng (Vỏ thân) bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao.

2. Thực nghiệm

2.1. Thiết bị, dụng cụ, hóa chất, chất chuẩn

2.1.1. Thiết bị, dụng cụ

Đã được hiệu chuẩn theo GLP và ISO/IEC 17025.

- Máy sắc ký lỏng Shimadzu UFLC;
- Cân phân tích Mettler Toledo AB-2S có độ chính xác $\pm 0,1$ mg;
- Các dụng cụ thủy tinh cần thiết.

2.1.2. Hóa chất:

- Diclorometan (PA; Merck);
- Amoniac (PA; BDH Prolabo);
- Acid hydrocloric (PA; Merck);
- Kali dihydrophosphat (PA; Scharlau);
- Triethylamin (PA; Scharlau);
- Acid phosphoric (PA; JTBaker);
- Methanol (HPLC; Merck).

2.1.3. Chất chuẩn:

Conessin: Hàm lượng: 97,80% $C_{24}H_{40}N_2$ (nguyên trạng); SKS: KC.10.16-04.02; Nguồn gốc: Đề tài nhà nước KC.10.16/06-10.

2.2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Đối tượng nghiên cứu

Dược liệu Mộc hoa trắng (Vỏ thân) được thu hái tại Hà Tĩnh.

2.2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.2.1. Điều kiện sắc ký

- Cột Phenomenex C18 (250 x 4,6 mm; 5 μ m);
- Pha động: Methanol - Đệm Kali dihydrophosphat 25 mM (24:76);

(Cách pha đệm: Hòa tan 3,4 g KH_2PO_4 /1000 ml nước + 3 ml Triethylamin, điều chỉnh pH = 3,0 bằng acid phosphoric đặc);

- Tốc độ dòng: 1,2 ml/phút;
- Detector DAD bước sóng 205 nm;
- Thể tích tiêm: 10 μ l.

2.2.2.2. Chuẩn bị các dung dịch chuẩn, dung dịch thử:

- *Chuẩn bị dung dịch chuẩn:* Dung dịch conessin trong acid hydrocloric 0,1N có nồng độ chính xác khoảng 0,35 mg/ml.

- *Chuẩn bị dung dịch thử:* Cân chính xác khoảng 1 g bột dược liệu (qua rây có đường kính mắt rây 0,4 mm) vào bình nón nút mài dung tích 50 ml, làm ẩm bằng dung dịch amoniac đặc (khoảng 35 - 40 giọt), đậy kín để yên trong 2 giờ. Thêm 20 ml diclorometan, lắc siêu âm trong 20 phút, để lắng, gạn lấy dịch chiết. Tiếp tục chiết như trên 4 lần nữa, mỗi lần 20 ml diclorometan. Gộp các dịch chiết diclorometan, cô trên cách thủy đến cạn. Hòa tan và chuyển toàn bộ cặn vào bình định mức 20 ml bằng dung dịch acid hydrocloric 0,1N, bổ sung dung dịch acid hydrocloric 0,1N vừa đủ, lắc đều, lọc qua màng lọc 0,45 μ m.

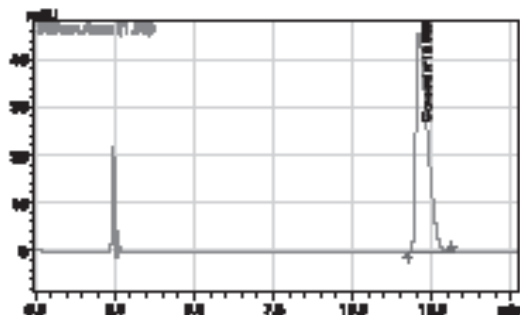
3. Kết quả và bàn luận

3.1. Độ đặc hiệu

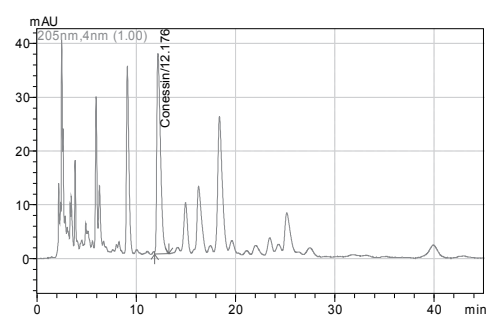
Với phương pháp đã chọn, tiến hành tiêm vào hệ thống sắc ký lần lượt các dung dịch sau:

- Dung môi pha mẫu: Dung dịch acid hydrocloric 0,1N.
- Dung dịch thử và dung dịch chuẩn: Tiến hành như quy trình phân tích.

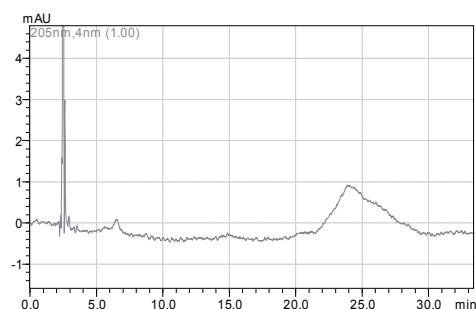
Kết quả được thể hiện ở Hình 1.



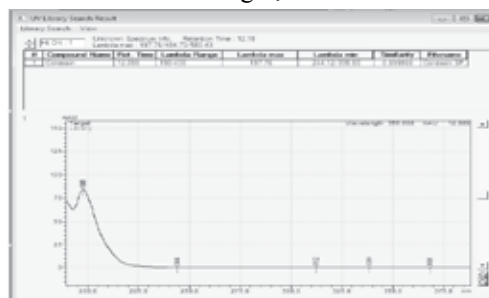
Dung dịch chuẩn



Dung dịch thử



Mẫu trắng



So sánh phổ UV-VIS của pic conessin trong dung dịch chuẩn và dung dịch thử

Hình 1. Sắc ký đồ và so sánh phổ của mẫu dược liệu Mộc hoa trắng và mẫu chuẩn

* *Nhận xét:*

- Thời gian lưu của pic conessin trong sắc ký đồ của dung dịch thử dược liệu Mộc hoa trắng cho pic có cùng thời gian lưu với pic conessin trong sắc ký đồ của dung dịch chuẩn.

- Phổ UV của pic conessin trên sắc ký đồ của dung dịch thử và chuẩn giống nhau. Kết quả chồng phổ cho hệ số so sánh là 0,9999.

- Độ tinh khiết của pic conessin thu được trên sắc ký đồ dung dịch thử là 1,000 cho thấy pic thu được trên sắc ký đồ của dung dịch thử là tinh khiết.

- Sắc ký đồ của dung môi pha mẫu không xuất hiện pic ở trong khoảng thời gian lưu tương ứng với thời gian lưu của chất chuẩn.

3.2. Tính thích hợp của hệ thống sắc ký

Tiêm vào hệ thống sắc ký 6 lần dung dịch chuẩn được chuẩn bị từ phần độ đặc hiệu. Ghi lại các SKĐ. Kết quả được thể hiện ở Bảng 1.

Bảng 1. Tính thích hợp của hệ thống sắc ký

STT	Thời gian lưu (phút)	Diện tích pic (mAU.s)	Số đĩa lý thuyết	Hệ số đối xứng
1	12,427	1145885	5099	2,23
2	12,332	1147298	5071	2,24
3	12,201	1148266	5117	2,24
4	12,119	1150528	5090	2,23
5	12,088	1147799	5034	2,23
6	12,099	1145866	5017	2,21
TB	12,211	1147607	5071	2,2
RSD (%)	1,14	0,15		

Nhận xét: Kết quả cho thấy hệ thống HPLC sử dụng là phù hợp và đảm bảo sự ổn định với độ lệch chuẩn tương đối (RSD) của thời gian lưu và diện tích pic đều nhỏ hơn 2,0%.

3.3. Khoảng tuyến tính

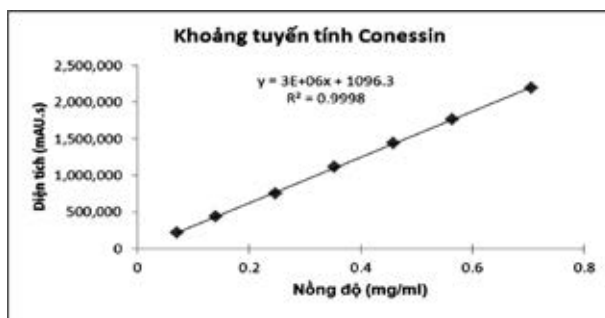
- Chuẩn bị dung dịch chuẩn gốc conessin: Cân chính xác 10,3 mg chuẩn conessin vào bình định mức 10 ml, hòa tan và thêm vừa đủ bằng dung dịch acid hydrocloric 0,1N.

- Từ dung dịch chuẩn gốc conessin, pha một dãy các dung dịch chuẩn trong dung dịch acid hydrocloric 0,1N để được các dung dịch có nồng độ conessin lần lượt bằng 20%, 40%, 70%, 100%, 130%, 160% và 200% so với nồng độ định lượng.

Tiến hành sắc ký theo điều kiện đã nêu trên. Kết quả được thể hiện ở Bảng 2 và Hình 2.

Bảng 2. Kết quả khảo sát khoảng tuyến tính

Dung dịch	1	2	3	4	5	6	7
Nồng độ (mg/ml)	0,0705	0,1410	0,2468	0,3526	0,4583	0,5641	0,7051
Diện tích pic (mAU.s)	224002	444539	751148	1115158	1437195	1767816	2197219
Phương trình hồi quy: $y = 3123661x + 1096,3$ Hệ số tương quan (correl): 0,9999 % hệ số chặn: 0,1%							



Hình 2. Đồ thị biểu diễn mối tương quan giữa nồng độ và diện tích pic

Nhận xét: Kết quả khảo sát cho thấy trong khoảng nồng độ từ 0,07 mg/ml đến 0,70 mg/ml có sự tương quan tuyến tính chặt chẽ giữa nồng độ conessin và diện tích pic tương ứng với hệ số tương quan $r = 0,9999$. Khoảng nồng độ khảo sát rộng phù hợp với các hoạt chất có khoảng hàm lượng dao động lớn trong mẫu được liệu. Chọn nồng độ định lượng là 0,35 mg/ml nằm trong khoảng tuyến tính đã khảo sát.

3.4. Độ đúng

- Độ đúng của phương pháp được xác định bằng phương pháp thêm chuẩn. Thêm vào mẫu thử một lượng chất chuẩn conessin tương ứng với 3 mức nồng độ 80%, 100% và 120% so với nồng độ định lượng. Tại mỗi mức nồng

độ thực hiện trên 03 mẫu độc lập. Tiến hành như đã mô tả ở mục 2.2.2.2, phân tích mẫu theo quy trình. Sử dụng dung dịch chuẩn được chuẩn bị từ phân độ đặc hiệu.

- Dựa vào hàm lượng hoạt chất đã biết trong mẫu thử, hàm lượng của chất chuẩn thêm vào và căn cứ vào diện tích pic trên sắc ký đồ để tính hàm lượng thu hồi của conessin. Kết quả khảo sát độ đúng được trình bày ở Bảng 3.

Bảng 3. Kết quả khảo sát độ đúng

STT	Lượng cân mẫu thử (g)	Lượng có sẵn (mg)	Lượng thêm vào (mg)	Diện tích pic (mAU.s)	Lượng tìm thấy (mg)	% thu hồi	% TB	% RSD
1	0,6236	4,51	1,88	1022345	6,41	100,89	101,5	2,1
2	0,6269	4,54	1,88	1022664	6,41	99,72		
3	0,6299	4,56	1,88	1038647	6,51	103,90		
4	0,6298	4,56	3,42	1285468	8,05	102,20	99,2	2,7
5	0,6207	4,49	3,42	1254967	7,86	98,54		
6	0,6200	4,49	3,42	1245226	7,80	96,91		
7	0,6260	4,53	4,70	1480197	9,28	100,98	101,7	0,7
8	0,6208	4,49	4,70	1484151	9,30	102,31		
9	0,6223	4,50	4,70	1482501	9,29	101,86		

Nhận xét: Các kết quả thực nghiệm cho thấy % thu hồi ở mỗi mức nồng độ từ 96,9% đến 103,9% với độ lệch chuẩn tương đối ở 3 mức nồng độ đều nhỏ hơn 3%. Như vậy, phương pháp phân tích có độ đúng khá tốt đối với hoạt chất nghiên cứu trong mẫu được liệu có chứa thành phần phức tạp, hàm lượng hoạt chất nghiên cứu thấp.

3.5. Độ chính xác

Tiến hành định lượng lặp lại trên 6 mẫu thử độc lập, thực hiện trên cùng một thiết bị, trên hai ngày khác nhau và 2 kiểm nghiệm viên khác nhau với cách tiến hành và điều kiện sắc ký như trên. Kết quả được trình bày ở Bảng 4.

Bảng 4. Kết quả đánh giá độ chính xác của phương pháp

Mẫu thử	Ngày 1			Ngày 2		
	Lượng cân mẫu thử (g)	Diện tích pic (mAU.s)	Hàm lượng Conessin (% nguyên trạng)	Lượng cân mẫu thử (g)	Diện tích pic (mAU.s)	Hàm lượng Conessin (% nguyên trạng)
1	0,9785	1110403	0,70	1,0027	1122161	0,70
2	1,0103	1165218	0,71	1,0183	1194578	0,74
3	1,0519	1213116	0,71	1,0093	1183512	0,73
4	0,9721	1107415	0,70	1,0058	1168362	0,73
5	0,9711	1068136	0,68	1,0079	1163420	0,72
6	0,9721	1083782	0,69	1,0003	1147259	0,72
TB	0,70%; n = 6; RSD = 1,89%			0,72%; n = 6; RSD = 1,75%		
Hàm lượng conessin trung bình tính theo nguyên trạng = 0,71%; n = 12; RSD = 2,67%						

Nhận xét: Độ lệch chuẩn tương đối trên 6 mẫu thử là 1,9% và độ lệch chuẩn tương đối trên 12 mẫu thử là 2,7%. Như vậy phương pháp có độ chính xác đạt yêu cầu.

3.6. Xác định giới hạn phát hiện (LOD) và giới hạn định lượng (LOQ)

- Từ dung dịch chuẩn có nồng độ chính xác khoảng 35,2 µg/ml tiến hành pha loãng nhiều lần để sơ bộ xác định nồng độ tối thiểu mà tại đó có thể đọc được đáp ứng của chất phân tích. Chuẩn bị 10 dung dịch mẫu thử có nồng độ xấp xỉ bằng nồng độ ước tính đã khảo sát ở trên, tiêm vào hệ thống sắc ký. Tính độ lệch chuẩn của đáp ứng.

Xác định giới hạn phát hiện của chất cần phân tích theo công thức sau:

$$\text{LOD} = \frac{3,3\sigma}{S}$$

Trong đó: LOD: nồng độ giới hạn phát hiện
σ: độ lệch chuẩn của đáp ứng
S: là độ dốc của đường chuẩn

Kết quả:

- Giới hạn phát hiện LOD = 1,36 µg/ml; tương ứng với 27,2 µg conessin/g dược liệu.
- Giới hạn định lượng LOQ = $3,3 \times 1,36 = 4,49$ µg/ml; tương ứng với 89,8 µg conessin/g dược liệu.

4. Kết luận

Phương pháp định lượng conessin trong dược liệu Mộc hoa trắng bằng HPLC đã xây dựng có độ chính xác đạt yêu cầu, độ đúng tốt, phương pháp cũng có khoảng tuyến tính rộng từ 20% đến 200% so với nồng độ định lượng, đồng thời có giới hạn phát hiện và giới hạn định lượng thấp do đó thích hợp cho phân tích thành phần hoạt chất trong mẫu chế phẩm đông dược có thành phần phức tạp và hàm lượng hoạt chất không ổn định.

Tài liệu tham khảo

1. Bộ Y tế (2009), *Dược điển Việt Nam IV*, Nhà xuất bản Y học, trang 832.
2. Viện Dược liệu (2003), *Cây thuốc và động vật làm thuốc ở Việt Nam*, tập 2, Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật, trang 325.

SUMMARY

An HPLC-DAD method was developed and validated for determination of Conessine in Cortex Holarrhenae. The chromatographic conditions are as follows: column: Phenomenex C18, 5 µm (250 × 4.6 mm); mobile phase: the mixture of acetonitrile - 25 mM KH₂PO₄ (adjust to pH = 3.0 with H₃PO₄) (24:76); flow rate: 1 ml/min; DAD: 205 nm.

The method was linear within range of low, large conessine concentration and was low Conessine LOD-LOQ concentration so it was suitable to analyse the herbal medicines with its substance concentration is unstable.

XÂY DỰNG PHƯƠNG PHÁP HPLC ĐỂ PHÂN TÍCH ĐỒNG THỜI MỘT SỐ THUỐC HÓA DƯỢC ĐIỀU TRỊ ĐÁI THÁO ĐƯỜNG CÓ THỂ TRỘN TRONG MỘT SỐ CHẾ PHẨM TỪ DƯỢC LIỆU

VŨ NGỌC THẮNG, TÔ MINH HÙNG,

VƯƠNG THỊ PHƯƠNG DUNG, NGUYỄN DUY CHÍ

Viện Kiểm nghiệm Nghiên cứu Dược và Trang Thiết bị Y tế Quân đội

1. Đặt vấn đề

Hiện nay trên thị trường, các sản phẩm thuốc, thực phẩm chức năng rất đa dạng và được người bệnh tin tưởng sử dụng vì cho rằng an toàn, ít tác dụng không mong muốn, trong đó có các sản phẩm điều trị hay hỗ trợ điều trị đái tháo đường. Tuy nhiên, các sản phẩm này thường có tác dụng chậm hoặc chưa rõ ràng nên một số cơ sở đã trộn trái phép các chất hóa dược vào để tăng tác dụng điều trị, để lừa đảo, kiếm lời, gây nguy hiểm tới người bệnh, đặc biệt là các tác dụng không mong muốn của thuốc hóa dược gây ra mà bệnh nhân không được cảnh báo. Thực tế đã có nhiều sản phẩm như vậy bị phát hiện [1],[2],[3].

Việc phân tích, kiểm soát các thuốc hóa dược trộn trái phép trong các chế phẩm từ dược liệu gặp nhiều khó khăn do các thuốc hóa dược gồm nhiều nhóm có công thức rất khác nhau và nền mẫu chế phẩm từ dược liệu phức tạp. Các thuốc glipizid (GLPZ), gliclazid (GLCZ), glimepirid (GLMZ) và glibenclamid (GLBC) là những thuốc điều trị đái tháo đường tác dụng mạnh (liều dùng

thấp), giá rẻ và phổ biến trên thị trường nên rất dễ bị trộn trái phép trong các chế phẩm từ dược liệu. Hai thuốc pioglitazon (PIO) và rosiglitazon (ROSI) đã được cơ quan quản lý Dược nhiều nước khuyến cáo sử dụng thận trọng và chống chỉ định trong nhiều trường hợp do có nhiều tác dụng không mong muốn nghiêm trọng [4],[5],[6],[7]. Vì vậy, chúng tôi xây dựng phương pháp HPLC để phân tích đồng thời 6 thuốc điều trị đái tháo đường (PIO, ROSI, GLPZ, GLCZ, GLBC và GLMZ) làm cơ sở để kiểm tra, giám sát chất lượng các sản phẩm điều trị hoặc hỗ trợ điều trị đái tháo đường có nguồn gốc từ dược liệu.

2. Thực nghiệm

2.1. Thiết bị, dụng cụ, hóa chất và chất chuẩn

2.1.1. Thiết bị, dụng cụ

- Máy HPLC Shimadzu 10 Avp với detector UV-Nhật;
- Cột sắc ký Phenomenex C18, 150 x 4,6 mm, 5 µm và bảo vệ cột cùng loại;

- Một số loại thiết bị, dụng cụ khác.

2.1.2. Hóa chất, dung môi

- Acetonitril, methanol (loại dùng cho HPLC) của Merck;

- Dicloromethan, aceton, triethylamin, acid phosphoric (loại PA) của Merck.

2.1.3. Chất chuẩn

- Pioglitazon hydroclorid, rosiglitazon maleat, glipizid của Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương;

- Glibenclamid, glimepirid, gliclazid của Viện Kiểm nghiệm thuốc Thành phố Hồ Chí Minh.

2.2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Đối tượng nghiên cứu

Mẫu để thẩm định phương pháp: Chế phẩm được lựa chọn để thẩm định phương pháp là 2 mẫu viên nang cứng chứa phần lớn các dược liệu điều trị đái tháo đường hiện nay, được thể hiện ở Bảng 1.

Bảng 1. Danh mục các mẫu để thẩm định phương pháp

Mẫu	Thành phần công bố	Liều dùng
M01	Khổ qua, Dây thìa canh, Thương truật, Hoài sơn, Tảo Spirulina, Linh chi, Sinh địa.	Ngày uống 2 lần x 2 - 3 viên/lần
M02	Giảo cổ lam, Dây thìa canh, Tang diệp, Sinh địa, Thiên hoa phấn, Sa sâm, Sơn thù, Bạch linh, Mạch môn, Mấu đơn bì, Trạch tả, Cát căn, Câu kỷ tử, Hoài sơn, Bạch thực.	Ngày uống 3 lần x 3 viên/lần

2.2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.2.1. Xác định các điều kiện sắc ký

Khảo sát trên cột C18; tiến hành thay đổi thành phần, tỷ lệ pha động, tốc độ dòng... để tìm điều kiện sắc ký có thể tách riêng 6 chất nghiên cứu trên sắc ký đồ.

2.2.2.2. Thẩm định phương pháp phân tích

a. Phương pháp xử lý mẫu: Cân chính xác một lượng bột viên đã nghiền mịn tương đương với một liều uống, thêm chính xác 50 ml methanol, siêu âm 20 phút, để nguội, hút chính xác 20 ml dịch nổi, bốc hơi tới khô trên cách thủy ở 80°C. Hòa tan cân bằng 20 ml hỗn hợp ACN - dung dịch đệm (70 : 30), lọc qua màng 0,45 µm.

b. Thẩm định phương pháp phân tích: Theo hướng dẫn của USP và ICH: Độ chọn lọc; độ tuyến tính; độ đúng và độ lặp lại; giới hạn định lượng và giới hạn phát hiện.

3. Kết quả và bàn luận

3.1. Kết quả xác định điều kiện sắc ký

Qua khảo sát, điều kiện sắc ký được chọn như sau:

Pha động: Hỗn hợp ACN - dung dịch đệm (Dung

dịch đệm: Lấy 5 ml triethylamin vào bình định mức 1000 ml, thêm nước vừa đủ, điều chỉnh pH về 3,4 bằng acid phosphoric, lọc qua màng 0,45 µm) theo chương trình gradient sau:

Bảng 2. Chương trình gradient dung môi của pha động

Thời gian (phút)	Tỷ lệ ACN (%)	Thời gian (phút)	Tỷ lệ ACN (%)
0,01	30	10,00	60
2,00	30	12,00	30
4,00	60	14,00	30

Tốc độ dòng: 1,2 ml/phút.

Thể tích tiêm: 20 µl.

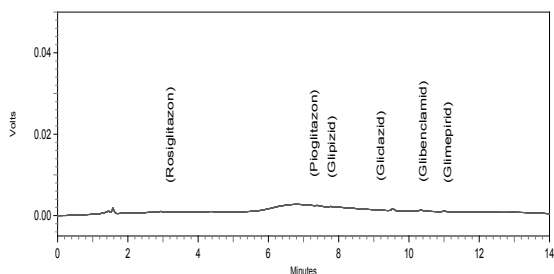
Detector UV - VIS ở 230 nm.

Với điều kiện sắc ký trên, sắc ký đồ cho 6 pic tách riêng biệt, cân xứng và thời gian phân tích khoảng 14 phút.

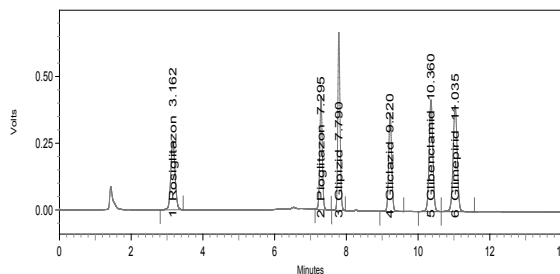
3.2. Kết quả thẩm định phương pháp phân tích

3.2.1. Tính chọn lọc, đặc hiệu

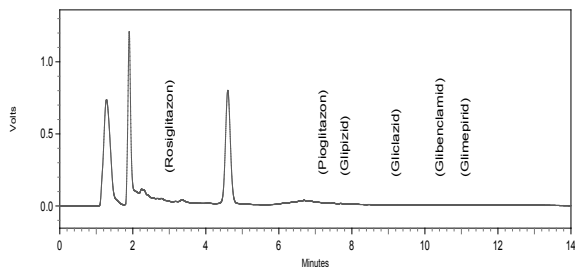
Chuẩn bị các mẫu: Mẫu trắng (hỗn hợp ACN - dung dịch đệm (70 : 30)); mẫu chuẩn hỗn hợp trong ACN - dung dịch đệm (70 : 30); mẫu thử M01, M02 và mẫu thử M01, M02 thêm chuẩn. Tiến hành xử lý mẫu và chạy sắc ký theo các điều kiện trên. Kết quả thể hiện ở Hình 1.



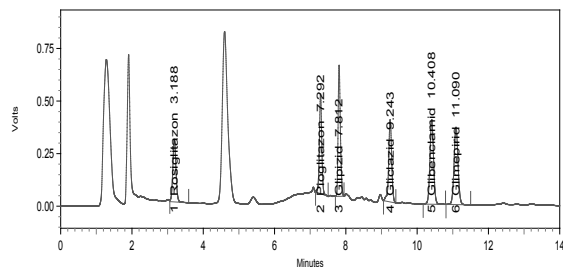
a) Sắc ký đồ mẫu trắng



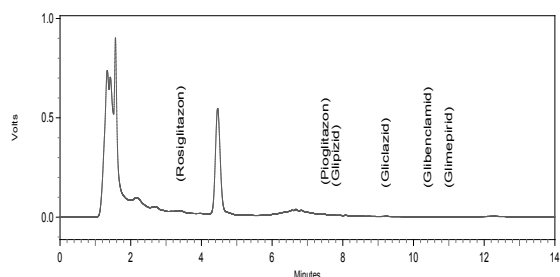
b) Sắc ký đồ mẫu chuẩn hỗn hợp



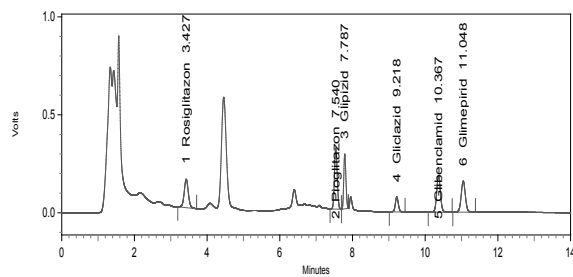
c) Sắc ký đồ mẫu thử M01



d) Sắc ký đồ mẫu thử M01 thêm chuẩn



đ) Sắc ký đồ mẫu thử M02



e) Sắc ký đồ mẫu thử M02 thêm chuẩn

Hình 1. Sắc ký đồ các mẫu: Mẫu trắng (a); mẫu chuẩn hỗn hợp (b); mẫu thử M01 (c); mẫu thử M01 thêm chuẩn (d); mẫu thử M02 (đ) và mẫu thử M02 thêm chuẩn (e)

Nhận xét: Kết quả cho thấy trên sắc ký đồ của mẫu thử thêm chuẩn xuất hiện các pic tương ứng với vị trí của các chất nghiên cứu như trên sắc ký đồ của mẫu chuẩn hỗn hợp. Các pic này cân đối và riêng biệt. Trên sắc ký đồ của mẫu trắng và các mẫu thử, tại các vị trí tương ứng với các chất nghiên cứu không thấy xuất hiện pic, các pic phụ trên sắc ký đồ ít và tín hiệu thấp. Như vậy quy trình xử lý mẫu và phân tích đảm bảo có tính chọn lọc đối với các mẫu M01 và M02.

3.2.2. Độ tuyến tính

Chuẩn bị các dung dịch chuẩn của 6 chất nghiên cứu trong hỗn hợp ACN - dung dịch đệm (70 : 30) ở 7 nồng độ khác nhau. Tiêm các dung dịch vào hệ thống, ghi lại sắc ký đồ, vẽ đường hồi quy tuyến tính giữa diện tích pic và nồng độ các chất nghiên cứu, kết quả được trình bày trong Bảng 3.

Bảng 3. Sự phụ thuộc tuyến tính giữa nồng độ các chất nghiên cứu và diện tích pic ($n = 5$)

		X1	X2	X3	X4	X5	X6	X7
ROSI	Nồng độ (µg/ml)	5	10	20	30	40	50	60
	Diện tích pic TB	202693	400901	791988	1167522	1577502	1941669	2350637
	Đường chuẩn TB	$y = 38906 x + 9731; r = 0,9999$						
PIO	Nồng độ (µg/ml)	5	10	20	30	40	50	60
	Diện tích pic TB	189694	377805	746399	1096016	1486122	1825160	2215030
	Đường chuẩn TB	$y = 36640 x + 8387; r = 0,9999$						
GLPZ	Nồng độ (µg/ml)	5	10	20	30	40	50	60
	Diện tích pic TB	271144	538301	1089210	1602183	2173318	2665979	3210057
	Đường chuẩn TB	$y = 53409 x + 9600; r = 0,9999$						

GLCZ	Nồng độ (µg/ml)	5	10	20	30	40	50	60
	Diện tích pic TB	223492	444805	904087	1350914	1826676	2244362	2668275
	Đường chuẩn TB	y = 44727 x + 6612; r = 0,9998						
GLBC	Nồng độ (µg/ml)	5	10	20	30	40	50	60
	Diện tích pic TB	293600	579999	1165754	1718379	2325262	2857720	3433615
	Đường chuẩn TB	y = 57102 x + 13908; r = 0,9999						
GLMZ	Nồng độ (µg/ml)	5	10	20	30	40	50	60
	Diện tích pic TB	280580	556531	1096987	1619574	2188312	2694506	3277207
	Đường chuẩn TB	y = 54179 x + 9327; r = 0,9999						

Ghi chú: TB: Trung bình

Đơn vị diện tích pic: mAU.s

Nhận xét: Kết quả cho thấy trong khoảng nồng độ khảo sát có sự phụ thuộc tuyến tính chặt chẽ giữa diện tích pic với nồng độ các chất nghiên cứu, các hệ số tương quan r đều lớn hơn 0,999.

3.2.3. Độ đúng và độ lặp lại

Tiến hành thẩm định bằng phương pháp thêm chuẩn với các mẫu được chuẩn bị như sau: Lấy lượng bột viên tương đương với một liều uống, thêm các lượng chính xác 1, 3 và 5 ml dung dịch chuẩn hỗn hợp (nồng độ 500 µg/ml trong methanol đối với mỗi chất), để khô tự nhiên trong 1- 2 giờ. Xử lý mẫu theo mục 2.2.2.2 và tiến hành sắc ký theo điều kiện ghi ở mục 3.1, tính lượng chuẩn tìm lại. Độ đúng là tỷ lệ % giữa lượng tìm lại và lượng chuẩn thêm vào; độ lặp lại là giá trị RSD%. Kết quả được trình bày trong Bảng 4 và Bảng 5.

Bảng 4. Kết quả thẩm định độ đúng, độ lặp lại với mẫu M01 (n = 3)

TT	Chất nghiên cứu	Lượng chuẩn thêm vào (mg)	Lượng chuẩn tìm lại (mg)	Độ đúng (TB% ± SD)	RSD (%)
1	ROSI	9,7749	9,8380	100,65 ± 0,73	0,72
		28,2526	28,4096	100,56 ± 0,44	0,44
		47,7314	47,1331	98,75 ± 3,27	3,31
2	PIO	12,2598	12,1661	99,24 ± 1,67	1,68
		35,0790	34,9865	99,74 ± 2,61	2,62
		59,1034	58,7306	99,37 ± 1,64	1,66
3	GLPZ	10,3603	10,3258	99,67 ± 0,91	0,92
		29,6790	30,1637	101,63 ± 0,93	0,92
		50,1218	50,0748	99,91 ± 1,59	1,59
4	GLCZ	10,1877	10,4822	102,89 ± 0,88	0,86
		29,2650	29,7002	101,49 ± 1,50	1,48
		49,3489	49,3792	100,06 ± 1,92	1,92
5	GLBC	10,1041	10,1675	100,63 ± 0,45	0,45
		29,6167	29,9817	101,23 ± 1,29	1,27
		49,8424	49,7570	99,83 ± 1,74	1,74
6	GLMZ	11,1403	10,8698	97,57 ± 0,74	0,76
		31,3463	31,7612	101,32 ± 1,41	1,40
		52,8795	53,5082	101,19 ± 0,40	0,40

Bảng 5. Kết quả thẩm định độ đúng, độ lặp lại với mẫu M02 (n = 3)

TT	Chất nghiên cứu	Lượng chuẩn thêm vào (mg)	Lượng chuẩn tìm lại (mg)	Độ đúng (TB% ± SD)	RSD (%)
1	ROSI	9,7749	9,4844	97,03 ± 0,14	0,14
		28,2526	28,1561	99,66 ± 1,32	1,32
		47,7314	46,5465	97,52 ± 0,32	0,33
2	PIO	12,2598	12,3324	100,59 ± 1,36	1,35
		35,0790	35,7101	101,80 ± 1,28	1,26
		59,1034	57,9683	98,08 ± 1,84	1,87
3	GLPZ	10,3603	10,7505	103,77 ± 1,98	1,91
		29,6790	30,2745	102,01 ± 2,48	2,43
		50,1218	50,3647	100,48 ± 0,60	0,60
4	GLCZ	10,1877	10,1878	100,00 ± 1,14	1,14
		29,2650	29,7038	101,50 ± 3,05	3,00
		49,3489	49,8117	100,94 ± 0,81	0,80
5	GLBC	10,1041	10,1464	100,42 ± 2,04	2,03
		29,6167	30,2400	102,10 ± 1,11	1,08
		49,8424	49,4080	99,13 ± 1,35	1,36
6	GLMZ	11,1403	10,9908	98,66 ± 0,22	0,22
		31,3463	32,1830	102,67 ± 1,33	1,29
		52,8795	52,4539	99,20 ± 1,77	1,79

Nhận xét: Kết quả cho thấy, khi thẩm định trên hai mẫu là M01 và M02, phương pháp có độ đúng cao từ 97,03% (đối với ROSI trên mẫu M02) đến 103,77% (đối với GLPZ trên mẫu M02); độ lặp lại tốt với RSD% từ 0,14% đến 3,31%.

3.2.4. Giới hạn phát hiện (LOD) và giới hạn định lượng (LOQ)

Kết quả xác định LOD và LOQ của phương pháp trên mẫu M01 và M02 bằng cách tính từ độ lệch chuẩn của mẫu trắng và hệ số góc của phương trình hồi qui, kết quả như sau:

Bảng 6. Kết quả LOD và LOQ trên mẫu M01 và M02

Mẫu		ROSI	PIO	GLPZ	GLCZ	GLBC	GLMZ
M01	LOD (µg/ml)	0,1176	0,2336	0,2358	0,0254	0,0164	0,0190
	LOQ (µg/ml)	0,3528	0,7008	0,7074	0,0762	0,0492	0,0570
M02	LOD (µg/ml)	0,2183	0,0550	0,0846	0,0527	0,0115	0,0186
	LOQ (µg/ml)	0,6549	0,1650	0,2538	0,1581	0,0345	0,0558

Nhận xét: LOD và LOQ thấp nhất lần lượt là 0,0115 và 0,0345 µg/ml (GLBC trên mẫu M02); cao nhất lần lượt là 0,2336 và 0,7008 µg/ml (PIO trên mẫu M01).

3.3. Bàn luận

Trong nghiên cứu này, chúng tôi không sử dụng các dược liệu để chiết xuất làm nền mẫu mà tiến hành phân tích

và thẩm định thẳng trên thành phẩm. Khi phân tích mẫu M01 và M02 nếu trên sắc ký đồ mẫu thử có pic trùng với một trong các pic của 6 chất nghiên cứu thì phải tiến hành định tính xác định bằng cách lấy phổ DAD và thay đổi tỷ lệ pha động để so sánh thời gian lưu giữa mẫu thử và mẫu chuẩn. Nếu khẳng định đó là pic của chất nghiên cứu bị trộn thì tiến hành định lượng bằng phương pháp thêm chuẩn để hạn chế sai số do tác động của nền mẫu.

Tuy nhiên, khi phân tích không thấy sự có mặt của các chất nghiên cứu nên tiến hành thêm chuẩn để xây dựng mô hình thẩm định phương pháp phân tích cho các mẫu này. Kết quả cho thấy có thể áp dụng phương pháp phân tích cho các chế phẩm có thành phần tương tự như mẫu M01 và M02. Tuy nhiên, để hạn chế ảnh hưởng do thành phần tá dược, qui trình chiết xuất, bào chế khác nhau của các nhà sản xuất khác nhau thì khi phân tích định tính phải xem xét thêm phổ DAD và khi định lượng phải dùng phương pháp thêm chuẩn.

4. Kết luận

Đã xây dựng được phương pháp phân tích đồng thời sáu thuốc điều trị đái tháo đường (PIO, ROSI, GLCZ, GLPZ, GLBC và GLMZ) có thể trộn lẫn trong một số chế phẩm thuốc hoặc thực phẩm chức năng có nguồn gốc từ dược liệu. Phương pháp có độ chọn lọc cao khi thẩm định trên hai mẫu M01 và M02; độ tuyến tính của mỗi chất phân tích trong khoảng khảo sát từ 5 - 60 µg/ml, với hệ số tương quan $r \geq 0,9998$; độ đúng đạt từ 97,03% đến 103,77%; độ lặp lại RSD% từ 0,14% đến 3,31%; đưa ra được giới hạn phát hiện và giới hạn định lượng của mỗi chất trên chế phẩm khảo sát.

Tài liệu tham khảo

1. Bộ Y tế (2008), *Công văn số 10634/QLD-CL về việc thu hồi thuốc vi phạm các quy chế Dược hiện hành*.
2. Bộ Y tế (2009), *Công văn số 14147/QLD-CL về việc đình chỉ lưu hành và thu hồi thuốc đông dược có trộn tân dược*.
3. Bộ Y tế (2010), *Công văn số 14601/QLD-CL về việc đình chỉ lưu hành và thu hồi thuốc đông dược có trộn tân dược*.
4. Bộ Y tế (2010), *Công văn số 11816/QLD-TT về việc khuyến cáo sử dụng thuốc có chứa Rosiglitazon*.
5. Bộ Y tế (2011), *Công văn số 3886/QLD-ĐK về đăng ký, sản xuất, nhập khẩu, lưu hành, sử dụng thuốc có chứa Rosiglitazon*.
6. Bộ Y tế (2012), *Công văn số 1564/QLD-TT về việc khuyến cáo sử dụng thuốc có chứa Pioglitazon, Stavidin, Trimetazidin*.
7. Bộ Y tế (2012), *Công văn số 13707/QLD-ĐK về việc đăng ký thuốc chứa thành phần Pioglitazon*.
8. Ayyappan. J, Umamathi. P, Darlin Quine. S (2011), "Validated HPLC method for the fast and sensitive determination of few anti-diabetic drugs residues in support of cleaning validation in formulation area", *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, Vol.3, Suppl. 5, pp. 371- 374.
9. B. Udaykumar Rao and Anna Pratima Nikalje (2010), "Determination of glipizide, glibenclamide and glimepiride in a tablet dosage form in the presence of metformin hydrochloride by ion pair- Reversed phase liquid chromatographic technique", *Journal of Analytical and Bioanalytical Techniques*, Vol. 1, Issue 2, 1000105.
10. G. V. S. Kumar, D. Triveni, S. B. Puranik (2012), "Development and validation of RP- HPLC method for simultaneous estimation of glipizide and metformin in Bulk drugs and tablet dosage form", *International Research Journal of Pharmacy*, Vol. 3, Issue 9, pp. 260- 263.
11. K. S. Lakshmi and T. Rajesh (2009), "Development and validation of RP-HPLC method for simultaneous determination of glipizide, rosiglitazone, pioglitazone, glibenclamide and glimepiride in pharmaceutical dosage forms and human plasma", *Journal of the Iranian Chemical Society*, Vol. 8, No. 1, pp. 31- 37.
12. Vasanth kumar Kunithala, Sateesh kumar Vemula, Vijaya Bhaskar Kunithala and Raja Abhilash Punagoti (2012), "A new validated RP-HPLC method for simultaneous determination of pioglitazone and glimepiride in the combined tablet dosage form", *International Journal of Pharmacy and Biological Sciences*, Volume 2, Issue 2, pp. 191- 197.

SUMMARY

The reversed-phase HPLC method has been developed for the simultaneous determination of six anti - diabetic drugs (rosiglitazone, pioglitazone, glipizide, gliclazide, glibenclamide and glimepiride) in drug and supplement products from medicinal plants. They were separated using a Phenomenex C18 column (150 mm x 4.6 mm; 5 µm) and gradient of mixture acetonitrile - buffer (pH 3.4) as mobile phase, the flow rate was 1.0 ml/min, UV detector at 230 nm. The method was statistically validated for specificity, accuracy, precision, linearity, limit of quantitation and detection. The method was applied to determine some anti - diabetic drugs in some drug and supplement from medicinal plants samples.

ĐỊNH LƯỢNG TECTORIDIN TRONG CAO LÔNG VĨ NGÂN BẰNG PHƯƠNG PHÁP SẮC KÝ LỎNG HIỆU NĂNG CAO

TRẦN VIỆT HÙNG
Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương

BÙI HỒNG CƯỜNG
Trường Đại học Dược Hà Nội

1. Đặt vấn đề

Cao lông Vĩ ngân là thuốc trị viêm họng được Công ty TNHH Dược phẩm Hoa Linh bào chế từ phương thuốc gồm: Xạ can (*Rhizoma Belamcandae*), Kim ngân hoa (*Flos Lonicerae*), Bạc hà (*Herba Menthae*), Hùng chanh (*Folium Coleus*), Núc nác (*Cortex Oroxyli*), Cát cánh (*Radix Platycodi grandiflori*), Huyền sâm (*Radix Scrophulariae*), Mạch môn (*Radix Ophiopogonis*),... đã được chứng minh tác dụng chống viêm cấp, giảm ho, long đờm trên thực nghiệm [1]... Trong đó, Xạ can có tác dụng chống viêm, kháng khuẩn [2], là vị Quân, quyết định tác dụng của phương thuốc. Tectoridin là một isoflavon trong Xạ can có tác dụng chống viêm mạnh [3]. Việc nghiên cứu tiêu chuẩn hóa và xác định được hàm lượng hoạt chất trong sản phẩm là cần thiết. Bài báo này trình bày kết quả định lượng tectoridin trong cao lông Vĩ ngân, làm căn cứ để xây dựng Tiêu chuẩn cơ sở của cao lông này. Mục tiêu: Xây dựng được phương pháp định lượng bằng sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) và xác định hàm lượng tectoridin trong cao lông Vĩ ngân.

2. Thực nghiệm

2.1. Thiết bị, dụng cụ, hóa chất, chất chuẩn

2.1.1. Thiết bị, dụng cụ

- Cân phân tích Sartorius BP 221S (Đức) có độ chính xác 0,1 mg;
- Hệ thống sắc ký lỏng hiệu năng cao Hitachi D-7000 (Nhật Bản);
- Bể siêu âm Daihan WUC D22H (Hàn Quốc);
- Bình định mức dung tích 10 ml, 50 ml và dụng cụ thủy tinh các loại.

2.1.2. Hóa chất, chất chuẩn

- Hóa chất, dung môi: methanol, acetonitril, acid formic đạt tiêu chuẩn tinh khiết phân tích dùng cho HPLC (Merck).

- Chất chuẩn: tectoridin hàm lượng 99,2% do phòng Hóa dược, Viện Hóa học các Hợp chất thiên nhiên, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam cung cấp.

2.2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Đối tượng nghiên cứu

- Cao lông Vĩ ngân (5/1): Kim ngân hoa, Xạ can chiết bằng ethanol 70% (ngâm kiệt), cất thu hồi dung môi; các vị còn lại nấu với nước, cô dịch chiết. Gộp 2 cao, cô đến cao lỏng 5/1.

- Cao lỏng placebo: Chuẩn bị như cao lỏng Vĩ ngân, bỏ Xạ can.

2.2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.2.1. Điều kiện sắc ký

- Pha tĩnh: Cột sắc ký HiQ Sil C18 (250 x 4,6 mm; 5 μ m);
- Nhiệt độ cột: nhiệt độ phòng thí nghiệm ($25 \pm 5^{\circ}\text{C}$);
- Tốc độ dòng: 0,6 ml/phút;
- Detector UV: 330 nm;
- Thể tích tiêm: 30 μ l;
- Pha động: Acetonitril - acid formic 0,1%, chạy gradient theo chương trình (Bảng 1):

Bảng 1. Chương trình chạy gradient pha động

Thời gian (phút)	Acetonitril (%)	Acid formic 0,1% (%)	Kiểu rửa giải
0-10	10-16	90-84	Gradient
10-52	16-17	84-83	Gradient
52-53	17-25	83-75	Gradient

2.2.2.2. Chuẩn bị các dung dịch chuẩn, dung dịch thử

- Dung dịch chuẩn: Cân chính xác 10,0 mg chất chuẩn tectoridin vào bình định mức 50 ml, hòa tan trong methanol, thêm methanol vừa đủ 50 ml, lọc qua màng lọc 0,45 μ m thu được dung dịch chuẩn gốc tectoridin nồng độ 0,2 mg/ml. Pha dung dịch chuẩn gốc với methanol thành các dung dịch chuẩn tectoridin với các nồng độ 2,5; 5; 7,5; 10 và 12,5 μ g/ml.

- Dung dịch thử: Cân chính xác khoảng 20 mg cao lông Vĩ ngân, cô cách thủy đến cạn, hòa tan cần trong methanol vừa đủ 10 ml bằng cách lắc siêu âm 10 phút, lọc qua màng lọc 0,45 μ m.

2.2.2.3. Tiến hành

Tiêm riêng biệt 30 μ l các dung dịch chuẩn vào máy sắc ký, tiến hành sắc ký theo điều kiện đã nêu, ghi thời gian lưu, diện tích pic của tectoridin. Xây dựng đường hồi quy biểu diễn mối tương quan giữa nồng độ (μ g/ml) và diện tích pic.

Tiêm 30 μ l dung dịch thử, ghi lại sắc ký đồ, ghi diện tích pic tectoridin.

2.2.2.4. Tính kết quả

Thiết lập đường chuẩn của tectoridin giữa nồng độ dung dịch (μ g/ml) và diện tích pic tương ứng theo phương trình $y = ax + b$.

Trong đó:

y: diện tích pic của tectoridin trên sắc ký đồ.

x: nồng độ dung dịch tectoridin ($\mu\text{g/ml}$).

Tính nồng độ C ($\mu\text{g/ml}$) tectoridin trong dung dịch thử dựa trên phương trình đường chuẩn đã xây dựng.

Hàm lượng tectoridin trong dung dịch thử được tính theo công thức sau:

$$C_{\text{tectoridin}} = \frac{y - b}{a} (\mu\text{g/ml})$$

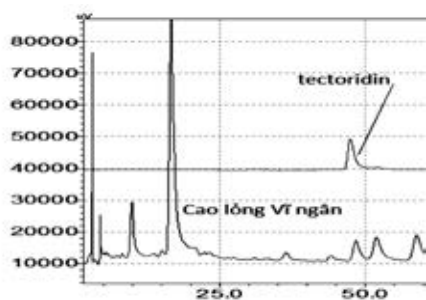
Trong đó: y: diện tích pic tectoridin trên sắc ký đồ của dung dịch thử

a, b: hệ số của phương trình tuyến tính

3. Kết quả và bàn luận

3.1. Phát hiện tectoridin trên sắc ký đồ của mẫu thử Vĩ ngân và lựa chọn bước sóng phân tích

Sắc ký đồ của tectoridin chuẩn và cao lỏng Vĩ ngân ở bước sóng 330 nm (Hình 1) cho thấy các pic trên sắc ký đồ của cao lỏng Vĩ ngân tách nhau hoàn toàn. Tectoridin được phát hiện ở thời gian lưu khoảng 48 phút, tách hoàn toàn khỏi các pic khác, pic cân đối, độ rộng chân pic nhỏ. Do đó, bước sóng 330 nm được chọn để phát hiện tectoridin, phương pháp đảm bảo độ chọn lọc, đặc hiệu.



Hình 1. Sắc ký đồ của tectoridin chuẩn và cao Vĩ ngân ở bước sóng 330 nm

Bảng 3. Kết quả khảo sát khoảng tuyến tính của tectoridin

STT	Nồng độ ($\mu\text{g/ml}$)	Diện tích pic ($\mu\text{V} \times \text{giây}$)
1	2,5	46435,1
2	5,0	86402,4
3	7,5	133841,0
4	10,0	177904,0
5	12,5	221480,2
Phương trình hồi qui tuyến tính $y = 17664x + 735$ $r = 0,9995$		

3.2. Tính tương thích của hệ thống

Tính tương thích của hệ thống sắc ký được xác định bằng cách phân tích dung dịch chuẩn tectoridin nồng độ 10 $\mu\text{g/ml}$ 5 lần lặp lại trong điều kiện sắc ký đã lựa chọn. Các thông số về thời gian lưu, diện tích pic của tectoridin được trình bày trong Bảng 2.

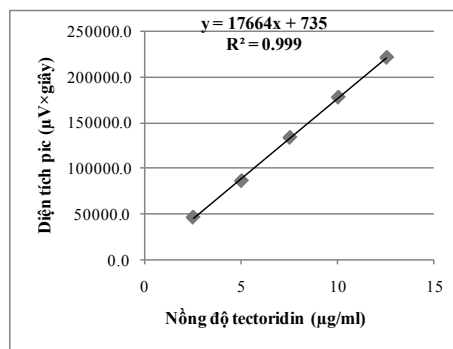
Bảng 2. Tính tương thích của hệ thống sắc ký

Lần tiêm	Thời gian lưu (phút)	Diện tích pic ($\mu\text{V} \times \text{giây}$)
Lần 1	48,05	177904,0
Lần 2	48,10	177723,4
Lần 3	48,09	177835,5
Lần 4	48,07	177640,8
Lần 5	48,12	177916,7
$X \pm SD$	$48,09 \pm 0,03$	$177804,1 \pm 119,2$
RSD (%)	0,06	0,1

Nhận xét: Phương pháp có độ lặp lại cao, không có sự khác biệt nhiều về thời gian lưu và diện tích pic giữa các lần phân tích ($RSD < 0,5\%$). Như vậy, phương pháp phân tích này là tương thích với hệ thống sắc ký.

3.3. Xác định khoảng tuyến tính giữa nồng độ và diện tích pic

Pha một dãy dung dịch chuẩn tectoridin ở các nồng độ 2,5; 5,0; 7,5; 10; 12,5 $\mu\text{g/ml}$. Tiến hành sắc ký như điều kiện đã mô tả. Kết quả khảo sát khoảng tuyến tính của phương pháp được trình bày trong Bảng 3, Hình 2.



Hình 2. Đồ thị biểu diễn sự phụ thuộc tuyến tính giữa nồng độ và diện tích pic của tectoridin

Kết quả ở Bảng 3 và Hình 2 cho thấy với nồng độ tectoridin từ 2,5 - 12,5 µg/ml, có sự tương quan tuyến tính giữa nồng độ tectoridin và diện tích pic trên sắc ký đồ theo phương trình $y = 17664x + 735$, với hệ số tương quan $r = 0,9995$.

3.4. Khảo sát độ chính xác của phương pháp

Tiến hành định lượng lặp lại trên 6 mẫu thử độc lập, thực hiện trên 2 ngày khác nhau và 2 người định lượng khác nhau với cách tiến hành và điều kiện sắc ký như trên. Kết quả được trình bày ở Bảng 4.

Bảng 4. Độ chính xác của phương pháp định lượng tectoridin

	STT	Hàm lượng trên mẫu (%)	
		Ngày 1	Ngày 2
Trong ngày	1	0,261	0,263
	2	0,254	0,251
	3	0,255	0,258
	4	0,258	0,259
	5	0,241	0,247
	6	0,256	0,253
	X ± SD (%)	0,254 ± 0,007	0,255 ± 0,006
	RSD (%)	2,72	2,30
Trong 2 ngày	X ± SD (%)	0,255 ± 0,006	
	RSD (%)	2,41	

Kết quả ở Bảng 4 cho thấy phương pháp có độ lặp lại trong ngày và trong hai ngày cao, ổn định với độ lệch chuẩn tương đối < 3%. Như vậy, độ chính xác của phương pháp được đảm bảo.

3.5. Khảo sát độ đúng của phương pháp

Độ đúng được thực hiện bằng cách thêm một lượng đã biết chất chuẩn (dung dịch chuẩn gốc) vào nền mẫu không chứa tectoridin (20 mg mẫu placebo) ở 3 mức nồng độ khác nhau bằng 80, 100 và 120% so với mẫu thử, tiến hành chuẩn bị mẫu theo quy trình (mục 2.2.2.1) và sắc ký theo điều kiện đã chọn, mỗi nồng độ thực hiện 3 lần, xác định tỷ lệ (%) tìm lại được so với nồng độ ban đầu. Kết quả được trình bày ở Bảng 5.

Bảng 5. Độ thu hồi của phương pháp định lượng tectoridin

Mẫu	Lượng dung dịch chuẩn gốc (µl)	Khoảng nồng độ (%)	Lượng tectoridin ban đầu (µg)	Lượng tectoridin tìm lại (µg)	Tỷ lệ thu hồi (%)	X ± SD (%)	RSD (%)
1	200	80	40,0	38,0	94,9	97,9 ± 1,6	1,6
			40,0	39,5	98,8		
			40,0	39,7	99,2		
2	250	100	50,0	48,9	97,8		
			50,0	49,8	99,6		
			50,0	49,4	98,8		
3	300	120	60,0	57,5	95,8		
			60,0	58,9	98,1		
			60,0	58,7	97,9		

Nhận xét: Tỷ lệ thu hồi trung bình đạt > 97% với RSD < 2%. Như vậy khả năng tìm lại hoạt chất tương đối cao, tỷ lệ thu hồi thấp nhất là 94,9%, cao nhất là 99,6%.

3.6. Áp dụng phương pháp để định lượng tectoridin trong cao lỏng Vĩ ngân

Chuẩn bị dung dịch mẫu thử và tiến hành sắc ký trong điều kiện như đã mô tả trên 12 mẫu cao lỏng Vĩ ngân. Kết quả hàm lượng tectoridin trong cao lỏng Vĩ ngân là $0,255 \pm 0,006\%$.

3.7. Bàn luận

Tectoridin là hoạt chất chính trong thân rễ Xạ can (*Belamcanda chinensis*) với hàm lượng khá lớn (khoảng 1,5%) [4]. Hoạt chất này có tác dụng chống viêm mạnh và đóng vai trò chủ yếu trong cơ chế kháng viêm của Xạ can thông qua khả năng ức chế sự sản sinh prostaglandin E_2 và cyclooxygenase-2 sinh ra trong các phản ứng viêm [3]. Bởi vậy, xác định hàm lượng của tectoridin trong cao lỏng Vĩ ngân là một chỉ tiêu kỹ thuật quan trọng, có liên quan với tác dụng chống viêm của phương thuốc.

Bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao, đã định lượng được tectoridin trong cao lỏng Vĩ ngân là 0,255%. Kết quả này cũng cho thấy có sự liên quan giữa thành phần hoá học và tác dụng sinh học của sản

phẩm và phù hợp với kết quả nghiên cứu trước của chúng tôi về tác dụng chống viêm, giảm ho và long đờm của sản phẩm [1]. Từ kết quả này, có thể suy ra hàm lượng tectoridin tương ứng trong dược liệu Xạ can khoảng 0,9%, thấp hơn so với hàm lượng trung bình đã được biết đến của tectoridin trong Xạ can là khoảng 1,5% [4]. Như vậy, có thể hàm lượng tectoridin trong nguyên liệu Xạ can trong nghiên cứu này thấp hơn hoặc hiệu suất chiết xuất chưa cao. Cần tiếp tục nghiên cứu chọn nguyên liệu có hàm lượng hoạt chất cao và nghiên cứu quy trình chiết xuất cho hiệu suất cao.

Từ kết quả trên, chúng tôi đề xuất xây dựng tiêu chuẩn kỹ thuật cao lỏng Vĩ ngân (5:1) có hàm lượng tectoridin không thấp hơn 0,2%. Cần tiếp tục khảo sát các chỉ tiêu khác để xây dựng tiêu chuẩn kỹ thuật cao lỏng Vĩ ngân.

4. Kết luận

Phương pháp HPLC định lượng tectoridin trong cao lỏng Vĩ ngân đã được xây dựng tương thích với hệ thống sắc ký, đảm bảo tính chọn lọc, đặc hiệu, có độ chính xác, độ đúng đạt yêu cầu, khoảng tuyến tính (2,5 - 12,5 $\mu\text{g/ml}$), có thể áp dụng để định lượng tectoridin trong các mẫu nghiên cứu. Hàm lượng tectoridin trong mẫu cao lỏng Vĩ ngân là $0,255 \pm 0,006\%$.

Tài liệu tham khảo

1. Nguyễn Thị Thu Trang, Bùi Hồng Cường, Phạm Thị Vân Anh (2015), Nghiên cứu tác dụng chống viêm cấp, giảm ho và long đờm của cao lỏng Vĩ ngân trên thực nghiệm, *Tạp chí Dược học*, (469), 61-66.
2. Viện dược liệu (2004), *Cây thuốc và động vật làm thuốc ở Việt Nam*, tập 2, NXB Khoa học và Kỹ thuật, Hà Nội, tr. 1095 - 1098.
3. Kim YP, Yamada M, Lim SS, Lee SH, Ryu N, Shin KH, Ohuchi K (1999), Inhibition by tectorigenin and tectoridin of prostaglandin E_2 production and cyclooxygenase-2 induction in rat peritoneal macrophages, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1438(3), pp 399-407.
4. Bộ môn Dược liệu - Trường Đại học Dược Hà Nội (2011), *Dược liệu học*, tập 1, NXB Y học, tr. 281-283, 424-425.

SUMMARY

An HPLC method for quantification of Tectoridin in Vĩ ngân liquid extract was established and validated. The chromatographic analysis was performed with C18 column (250 x 4.6 mm; 5 μm), detector UV (330 nm); mobile phase Acetonitril - Formic acid 0.1% (gradient 10-90 to 25-75); flow rate 0.6 ml/min; injection volume 30 μl . The method was validated for the specificity, linearity, and accuracy (recovery: 94.9% - 99.6%). For the tested sample, the content of Tectoridin was $0.255 \pm 0.006\%$.

ĐIỀU CHẾ TẠP CHUẨN (2-CLOROPHENYL)DIPHENYLMETHANOL ĐỂ SỬ DỤNG TRONG KIỂM TRA CHẤT LƯỢNG NGUYÊN LIỆU VÀ CÁC DẠNG BÀO CHẾ CỦA CLOTRIMAZOL

NGUYỄN VĂN GIANG

Trường Đại học Dược Hà Nội

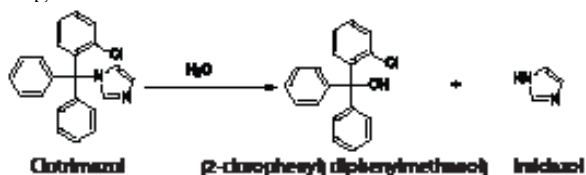
NGUYỄN THỊ QUỲNH GIANG, LÊ THỊ THU,

NGUYỄN THỊ PHƯƠNG THẢO, ĐOÀN CAO SƠN

Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương

1. Đặt vấn đề

Clotrimazol [1-(α -2-clorotrityl)imidazol] là thuốc kháng nấm phổ rộng được sử dụng phổ biến để điều trị các bệnh nấm do *Trichomonas*, *Staphylococcus* và *Bacteroides* gây ra [2]. Trong dung dịch, độ ổn định của clotrimazol phụ thuộc vào pH của môi trường và đặc biệt không ổn định trong môi trường acid [5]. Sản phẩm phân hủy của clotrimazol trong môi trường nước là (2-clorophenyl)diphenylmethanol (tên khác: 2-clorotritanol hay clotrimazol tap A) và imidazol (Sơ đồ 1). Nhiều nghiên cứu đã chỉ ra sản phẩm phân hủy của clotrimazol trong các dạng bào chế là (2-clorophenyl)diphenylmethanol và imidazol [4],[6]. Do đó, trong các dược điển như Dược điển Việt Nam, Dược điển Mỹ, Dược điển Anh,... qui định phải sử dụng chất chuẩn (2-clorophenyl)diphenylmethanol để đánh giá tạp chất này trong nguyên liệu và các chế phẩm chứa clotrimazol [1],[7],[8]. Tuy nhiên, chất chuẩn (2-clorophenyl)diphenylmethanol lại chưa được sản xuất tại Việt Nam, khi cần sử dụng đều phải nhập khẩu từ nước ngoài. Chính vì vậy, trong nghiên cứu này chúng tôi tiến hành điều chế (2-clorophenyl)diphenylmethanol để làm chuẩn tạp ứng dụng trong công tác kiểm tra chất lượng nguyên liệu và thành phẩm của clotrimazol tại các công ty dược phẩm cũng như hệ thống kiểm nghiệm trong cả nước.



Sơ đồ 1. Sự phân hủy của clotrimazol trong dung dịch

2. Thực nghiệm

2.1. Thiết bị, dụng cụ, hóa chất, chất chuẩn

2.1.1. Thiết bị và dụng cụ

- Máy chuẩn độ KF - Metrohm;
- Máy đo quang phổ hồng ngoại Thermo Nicolet IS 50 FT-IR;

- Máy đo quang Hitachi U-3900H;
- Máy sắc ký lỏng khối phổ: LC/MS/MS-Agilent;
- Máy đo phổ cộng hưởng từ hạt nhân ¹H-NMR và ¹³C-NMR: Bruker AV500;
- Máy đo nhiệt độ nóng chảy Buchi 565;
- Máy sắc ký lỏng hiệu năng cao: Agilent 1260;
- Máy quét nhiệt lượng vi sai: Shimadzu DSC- 60,...;
- Dụng cụ thủy tinh các loại.

2.1.2. Dung môi, hóa chất, chất chuẩn

- Clotrimazol tap A USPRS, số lô: J2M033, hàm lượng: 0,99 mg/mg (nguyên trạng);
- Clotrimazol chuẩn ĐĐVN, SKS: 0110271.01, hàm lượng: 99,50% (nguyên trạng);
- Acetonitril (HPLC), natri dihydrophosphat (PA),...

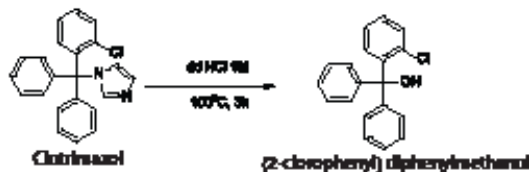
2.2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Đối tượng nghiên cứu

Nguyên liệu clotrimazol đạt yêu cầu tiêu chuẩn cơ sở của nhà sản xuất Chemicalpoint - Đức, số lô: CP1933.

2.2.2. Điều chế (2-clorophenyl)diphenylmethanol

(2-clorophenyl)diphenylmethanol được điều chế từ clotrimazol theo phản ứng thủy phân trong môi trường acid [3] theo Sơ đồ 2.



Sơ đồ 2. Sơ đồ phản ứng điều chế (2-clorophenyl)diphenylmethanol

2.2.3. Tinh chế và thử độ tinh khiết sơ bộ

Sử dụng phương pháp kết tinh lại trong dung môi hữu cơ để tinh chế sản phẩm.

Sản phẩm sau tinh chế được kiểm tra chất lượng sơ bộ bằng phương pháp đo điểm chảy, sắc ký trên bản mỏng silica gel 60F₂₅₄ với hệ dung môi pha động toluen

- propanol - amoniac (90:10:0,5), phát hiện vết dưới đèn tử ngoại 254 nm và phân tích nhiệt vi sai.

2.2.4. Xác định cấu trúc, nhận dạng chất

Cấu trúc của sản phẩm được khẳng định bằng các phương pháp phân tích phổ hiện đại: phổ hồng ngoại (nén viên KBr), phổ khối (MS) với chế độ ESI-MS, phổ cộng hưởng từ hạt nhân ^1H -NMR và ^{13}C -NMR với chất chuẩn nội tetramethylsilan (TMS).

2.2.5. Kiểm tra chất lượng nguyên liệu sau tinh chế

Sản phẩm sau tinh chế và xác định cấu trúc được kiểm tra chất lượng, sử dụng chuẩn clotrimazol tạp A USPRS, số lô: J2M033, hàm lượng 0,99 mg/mg tính theo nguyên trạng làm chuẩn gốc với các chỉ tiêu cụ thể: Định tính, xác định nhiệt độ nóng chảy, xác định hàm lượng nước, phân tích nhiệt vi sai, tạp chất liên quan, định lượng.

3. Kết quả và bàn luận

3.1. Quá trình điều chế

Cho vào bình cầu đáy tròn dung tích 500 ml 34,50 g clotrimazol (0,1 mol) và 120 ml dung dịch HCl 1M (0,12 mol). Sau đó, khối phản ứng được khuấy đều và đun hồi lưu trong bể cách thủy trong 3h. Theo dõi điểm kết thúc phản ứng bằng SKLM với hệ dung môi cloroform - methanol (9:1), phát hiện vết dưới đèn tử ngoại 254 nm. Sau quá trình hồi lưu kết thúc, khối phản ứng được làm lạnh bên ngoài bằng nước đá thấy xuất hiện tủa. Hỗn hợp này được chiết bằng ethyl acetat 3 lần mỗi lần 30 ml, gộp pha hữu cơ, rửa lại bằng nước cất 3 lần mỗi lần 10 ml, sau đó được làm khan bằng Na_2SO_4

qua đêm. Lọc lấy pha hữu cơ, cất loại dung môi hữu cơ dưới áp suất giảm thu được cặn: chất rắn màu trắng (alcol thô).

3.2. Quá trình tinh chế

Hòa tan sản phẩm alcol thô thu được ở trên trong 100 ml n-hexan ở nhiệt độ khoảng 50°C . Làm lạnh qua đêm ở nhiệt độ $5 - 10^\circ\text{C}$, lọc lấy tinh thể. Quá trình kết tinh được lặp lại 2 lần như trên với dung môi n-hexan, bay hơi dung môi, tiếp tục sấy chân không ở 60°C đến khối lượng không đổi (24 giờ) thu được (2-clorophenyl) diphenylmethanol tinh khiết.

Hiệu suất của quá trình điều chế khoảng 45%. Sản phẩm sau tinh chế được kiểm tra chất lượng sơ bộ bằng phương pháp sắc kí lớp mỏng, đo nhiệt độ nóng chảy và quét nhiệt vi sai. Kết quả cho thấy sản phẩm có nhiệt độ nóng chảy $94,0^\circ\text{C}$; trên sắc kí đồ của nguyên liệu với hệ dung môi pha động toluen - propanol - amoniac (90:10:0,5) thu được cho một vết duy nhất có $R_f = 0,88$ (254 nm); độ tinh khiết khi phân tích DSC = 99,12%.

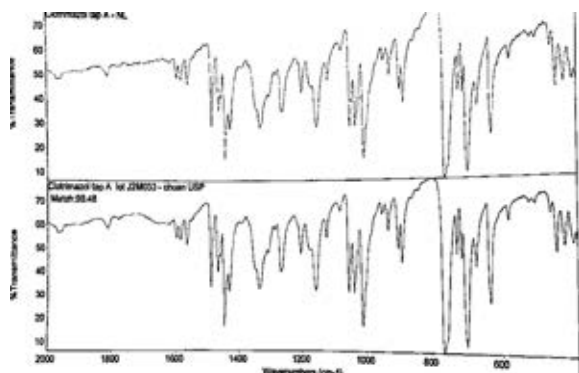
3.3. Kết quả khẳng định cấu trúc của sản phẩm bằng phân tích phổ

3.3.1. Phổ IR

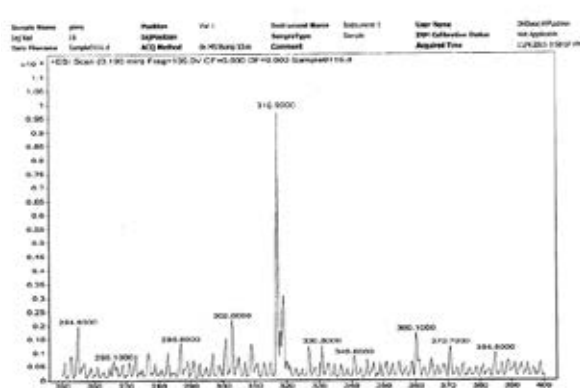
Phổ hồng ngoại của nguyên liệu (2-clorophenyl) diphenylmethanol sau tinh chế trùng với phổ hồng ngoại của clotrimazole related compound A USPRS số lô: J2M033 với hệ số match 99,48% (Hình 1).

3.3.2. Phổ khối (MS)

Trên phổ MS xuất hiện pic ion (m/z): 316,90 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$, tương ứng với công thức phân tử của chất nghiên cứu là $\text{C}_{19}\text{H}_{15}\text{ClO}$ (Hình 2).



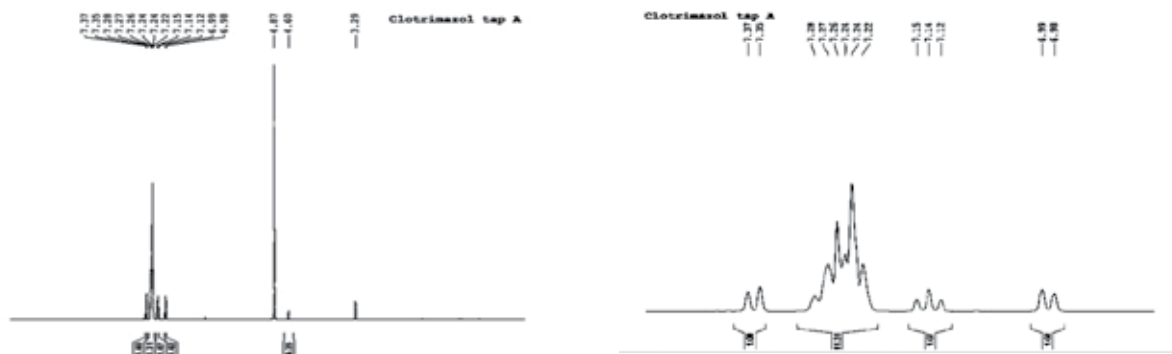
Hình 1. Phổ IR của (2-clorophenyl)diphenylmethanol



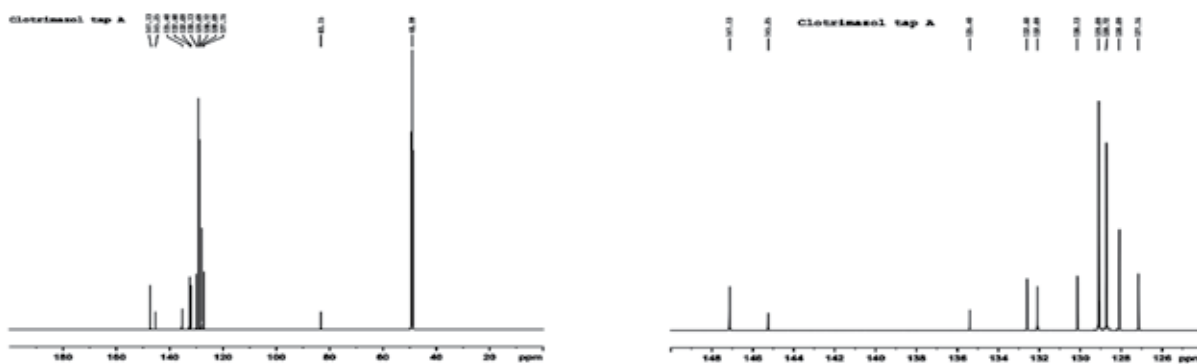
Hình 2. Phổ MS của (2-clorophenyl)diphenylmethanol

3.3.3. Phổ cộng hưởng từ hạt nhân (NMR)

^1H -NMR (500MHz, MeOD), δ (ppm): 4,6 (1H, s, OH); 6,98 (d, 1H, $J=8,0$, H-6'); 7,14 (m, 1H, H-5'); 7,27-7,28 (11H, m, H-4', H-2''-H-6'', H-2'''-H-6'''), 7,36 (1H, d, $J=8,0$, H-3') (Hình 3).

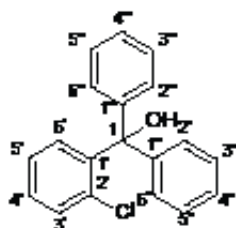


Hình 3. Phổ ^1H -NMR của (2-clorophenyl)diphenylmethanol



Hình 4. Phổ ^{13}C -NMR của (2-clorophenyl)diphenylmethanol

^{13}C -NMR (500MHz, MeOD) , δ (ppm) 83,15 (C-OH), 127,16 ($\text{C}_{4''}$, $\text{C}_{4'''}$) ; 128,19 ($\text{C}_{5'}$); 128,72 ($\text{C}_{4'}$); 129,09 ($\text{C}_{2''}$, $\text{C}_{2'''}$, $\text{C}_{6''}$, $\text{C}_{6'''}$); 130,13 ($\text{C}_{3''}$, $\text{C}_{3'''}$, $\text{C}_{5''}$, $\text{C}_{5'''}$); 132,09 ($\text{C}_{6'}$); 132,60 ($\text{C}_{3'}$); 135,40 ($\text{C}_{2'}$) ; 145,25 ($\text{C}_{1'}$); 147, 13 ($\text{C}_{1''}$, $\text{C}_{1'''}$) (Hình 4).



(2-clorophenyl)diphenylmethanol

Phân tích dữ liệu phổ cộng hưởng từ ^1H và ^{13}C của hợp chất sau tinh chế được cho thấy xuất hiện các tín hiệu proton và carbon phù hợp với công thức cấu tạo của (2-clorophenyl) diphenylmethanol.

Như vậy, từ kết quả phân tích tính chất và dữ liệu phổ IR, MS và NMR kết hợp so sánh với chuẩn có thể khẳng định hợp chất sau khi tinh chế là (2-clorophenyl) diphenylmethanol.

3.4. Kết quả kiểm tra chất lượng nguyên liệu sau tinh chế

3.4.1. Định tính

Tiến hành so sánh với chuẩn clotrimazole related compound A USPRS số lô: J2M033.

- IR: Phổ IR của nguyên liệu trùng với phổ IR của mẫu chuẩn.

- HPLC: Thời gian lưu của pic chính trên sắc ký đồ của dung dịch thử trùng với thời gian lưu của pic chính trên sắc ký đồ của dung dịch chuẩn (t_R chuẩn: 9,6 phút, t_R thử: 9,6 phút)

3.4.2. Xác định nhiệt độ nóng chảy

Nhiệt độ nóng chảy: 94,2°C

3.4.3. Hàm lượng nước (KF)

Bảng 1. Kết quả xác định hàm lượng nước

Mẫu thử	Hàm lượng nước (%)
1	0,26
2	0,24
3	0,23
4	0,27
5	0,25
Trung bình	0,25 %

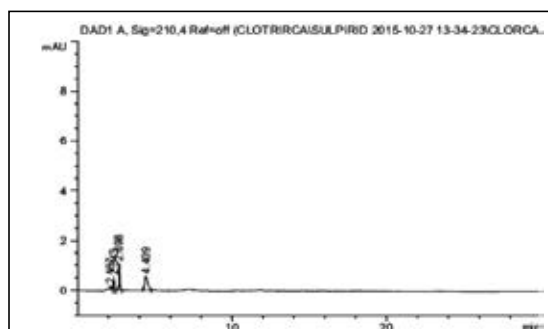
3.4.4. Xác định tạp chất liên quan

Sử dụng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao với điều kiện sắc ký: pha động là hỗn hợp dung dịch natri dihydrophosphat pH 6,8 và acetonitril (30:70), sử dụng cột Gemini C18 (250 x 4,6 mm, 5 μ m), tốc độ dòng 1,0 ml/phút, thể tích tiêm 20 μ l, bước sóng phát hiện 210 nm. Sử dụng dung dịch phân giải chứa clotrimazol tạp A và clotrimazol có nồng độ 0,025 mg/ml mỗi chất để đánh giá khả năng tách của hệ sắc ký. Dung dịch thử có nồng độ 0,5 mg/ml trong pha động. Pha loãng dung dịch thử 200 lần bằng pha động, sử dụng làm dung dịch đối chiếu để so sánh tạp chất (0,5%).

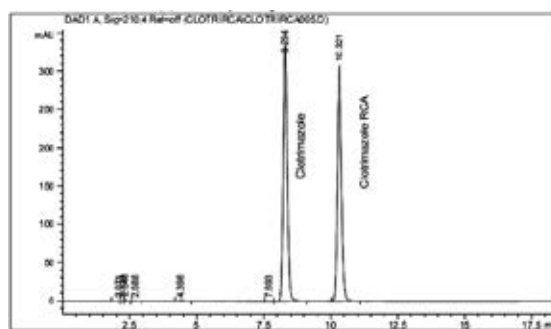
Kết quả cho thấy, thời gian lưu của pic (2-clorophenyl)diphenylmethanol là 10,3 phút, thời gian lưu của pic clotrimazol là 8,3 phút, hệ số phân giải giữa pic clotrimazol và pic (2-clorophenyl)diphenylmethanol là 7,33, diện tích của pic chính trên sắc kí đồ của dung dịch đối chiếu là 367,3 mAU.s.

Bảng 2. Kết quả xác định tạp chất trong nguyên liệu (2-clorophenyl)diphenylmethanol

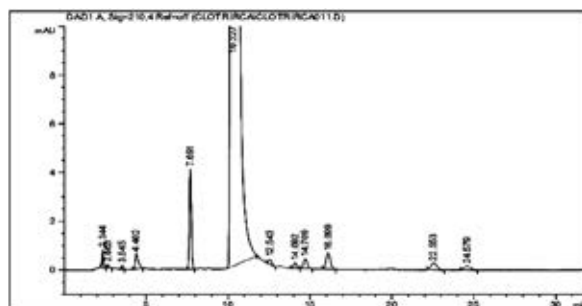
Tạp	Thời gian lưu (phút)	Diện tích các pic tạp chất (mAU.s)			
		Thứ 1	Thứ 2	Thứ 3	TB
1	3,5	0,75	0,78	0,75	0,76
2	7,7	34,56	35,79	35,2	35,18
3	12,5	2,29	2,50	2,54	2,44
4	14,0	3,15	4,20	3,31	3,55
5	14,7	5,83	7,62	6,39	6,61
6	16,0	11,35	18,82	12,01	14,06
7	22,5	6,88	7,51	7,25	7,21
8	24,6	5,35	4,59	4,4	4,78
Tổng		70,16	81,81	71,85	74,61 (0,10%)



Mẫu trắng



Dung dịch phân giải



Mẫu thử

Hình 5. Sắc ký đồ xác định tạp chất liên quan trong nguyên liệu (2-clorophenyl)diphenylmethanol

3.4.5. Định lượng

Sử dụng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao với điều kiện tiến hành như trong phần tạp chất liên quan để tiến hành định lượng nguyên liệu. Tiến hành song song với chuẩn Clotrimazole related compound A USPRS, số lô: J2M033, hàm lượng 0,99 mg/mg tính theo nguyên trạng.

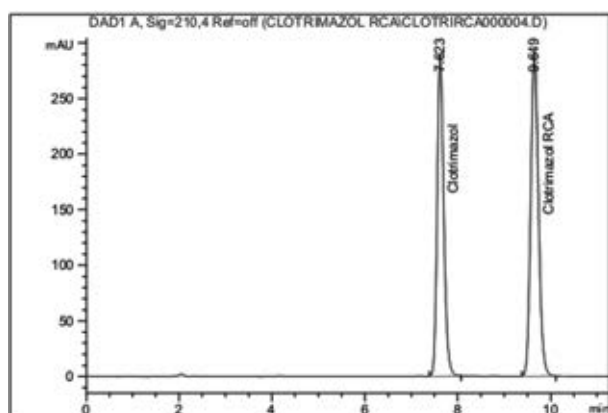
Dung dịch chuẩn: Hòa tan 25,33 mg trong pha động vừa đủ 50 ml, hút 1,0 ml dung dịch này pha loãng vừa đủ 20,0 ml bằng pha động. Diện tích pic chuẩn: 2964,13 mAU.s.

Dung dịch thử: pha như dung dịch chuẩn.

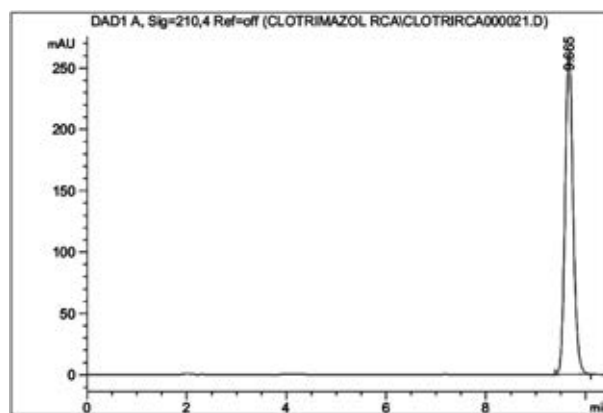
Bảng 3. Kết quả định lượng nguyên liệu (2-clorophenyl)diphenylmethanol

	<i>Thử 1</i>	<i>Thử 2</i>	<i>Thử 3</i>	<i>Thử 4</i>	<i>Thử 5</i>	<i>Thử 6</i>
<i>Lượng cân (mg)</i>	25,27	24,98	25,25	25,14	25,55	25,30
<i>Diện tích pic (mAU.s)</i>	2964,29	2951,70	2979,16	2963,23	3005,24	2995,82
<i>Hàm lượng (%)</i>	99,24	99,97	99,82	99,72	99,51	100,18
Hàm lượng trung bình	99,74%; n = 6; RSD = 0,33%					

Hàm lượng nguyên liệu (2-clorophenyl)diphenylmethanol thu được là 99,74% tính theo nguyên trạng (n = 6, RSD = 0,33%).



Dung dịch phân giải



Mẫu thử



Mẫu chuẩn

Hình 6. Sắc ký định lượng nguyên liệu (2-clorophenyl)diphenylmethanol

4. Kết luận

Đã tiến hành điều chế được nguyên liệu (2-clorophenyl) diphenylmethanol có chất lượng cao để làm nguyên liệu sử dụng cho thiết lập chất chuẩn tạp với hiệu suất khoảng 45%. Sản phẩm được khẳng định cấu trúc bằng phương pháp phổ LC/MS, NMR và IR. Kết quả kiểm tra chất lượng cho thấy hàm lượng của nguyên liệu đạt 99,74% - nguyên trạng và hàm lượng tạp chất liên quan nhỏ (0,1%), tiếp tục tiến hành các bước tiếp theo của quá trình thiết lập chất chuẩn: đóng gói, đánh giá liên phòng và theo dõi độ ổn định.

Tài liệu tham khảo

1. Bộ Y tế (2009), *Dược điển Việt Nam IV*, tr. 193, Nhà xuất bản Y học, Hà nội.
2. Bộ Y tế (2015), *Dược thư quốc gia Việt Nam*, tr. 452, Nhà xuất bản Khoa học và kỹ thuật, Hà nội.
3. Grant A. McNaughton-Smith, J. Ford Burns, Jonathan W. Stocker et al (2008), “Novel Inhibitors of the Gardos Channel for the Treatment of Sick Cell Disease”, *Journal of Medicinal Chemistry* 51, pp. 976-982.
4. Hájková R, Sklenářová H, Matysová L, Svecová P, Solich P. (2007), “Development and validation of HPLC method for determination of clotrimazole and its two degradation products in spray formulation”, *Talanta*, 73 (3), p.483
5. Hoogerheide, B. E. Wyka (1982), “Chlotrimazole”, *Analytical Profiles of Drug Substances II*, pp. 225-255.
6. Solich P., Hájková R., Pospíšilová M., Šícha J. (2002), “Determination of methylparaben, propylparaben, clotrimazole and its degradation products in topical cream by RP-HPLC”, *Chromatographia*, 56 (1), pp.181-184.
7. The British Pharmacopoeia Commission (2014), *British Pharmacopoeia 2014 (offline edition)*.
8. U.S. Pharmacopeial Convention (2015), *United States Pharmacopeia 38 (USB flash drive)*.

SUMMARY

(2-Chlorophenyl)diphenylmethanol (Clotrimazole impurity A) is an important impurity used in analysis of drug substance and dosage form of Clotrimazole, as directed in current pharmacopoeias. In this research, (2-chlorophenyl) diphenylmethanol is synthesized by acid hydrolysis and purified by crystallization in organic solvent. The structure of obtained substance is elucidated by IR, ESI-MS and NMR. Quality of (2-chlorophenyl)diphenylmethanol is determined also to ensure that it meets the requirements of a material used for establishment of Vietnamese Pharmacopoeia reference standard. The material contains 99.74% of $C_{19}H_{15}ClO$ (on as is basis, calculated with reference to Clotrimazole related compound A USPRS), and is used for further studies to establish reference standard.

MỤC LỤC

Trang

● Quản lý - Trao đổi nghiệp vụ

- Định hướng công tác kiểm tra và giám sát chất lượng thuốc năm 2017.

PGS. TS. ĐOÀN CAO SON - VIỆN TRƯỞNG VIỆN KIỂM NGHIỆM THUỐC TW 1

● Nghiên cứu khoa học

- Định lượng Vincamin trong viên nén chứa hai thành phần Vincamin và Rutin bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao.

NGUYỄN THỊ HỒNG HẠNH, TRẦN THỊ HỒNG ANH, LÊ THỊ QUỲNH NGA 2

- Nghiên cứu ứng dụng quang phổ cận hồng ngoại để định lượng Cefuroxim axetil trong một số chế phẩm thuốc viên.

TRỊNH THỊ HỒNG THẢO, NGUYỄN THỊ HOA, PHẠM THỊ KIỀU DUNG,
VŨ THỊ NGUYỆT MINH, TRẦN THỊ BÍCH VÂN 7

- Xây dựng và thẩm định quy trình định tính, định lượng Conessin trong dược liệu Mộc hoa trắng bằng phương pháp HPLC.

NGUYỄN THỊ LAN PHƯƠNG, TRỊNH THỊ QUY, ĐỖ THỊ BÍCH THUẬN,
HỒ NGỌC KỲ, CHỦ THỊ THANH HUYỀN, HÀ VÂN OANH 12

- Xây dựng phương pháp HPLC để phân tích đồng thời một số thuốc hóa dược điều trị đái tháo đường có thể trộn trong một số chế phẩm từ dược liệu.

VŨ NGỌC THẮNG, TÔ MINH HÙNG, VƯƠNG THỊ PHƯƠNG DUNG, NGUYỄN DUY CHÍ 16

- Định lượng Tectoridin trong cao lỏng Vĩ ngân bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao.

BÙI HỒNG CƯỜNG, TRẦN VIỆT HÙNG 22

- Điều chế tạp chuẩn (2-Chlorophenyl)diphenylmethanol để sử dụng trong kiểm tra chất lượng nguyên liệu và các dạng bào chế của Clotrimazol.

NGUYỄN THỊ QUỲNH GIANG, LÊ THỊ THU,
NGUYỄN THỊ PHƯƠNG THẢO, NGUYỄN VĂN GIANG, ĐOÀN CAO SON 26

CONTENTS

Page

● Management - Professional exchange

- Objectives and activities of the drug quality control and monitoring for the year 2017.

Associate Prof. ĐOÀN CAO SON, Ph.D., Director of NIDQC 1

● Scientific researches

- Assay of Vincamin in tablets containing two components Vincamin and Rutin by High Performance Liquid Chromatography method.

NGUYỄN THỊ HỒNG HẠNH, TRẦN THỊ HỒNG ANH, LÊ THỊ QUỲNH NGA 2

- Application of near infrared spectroscopy to quantify of Cefuroxime axetil in tablet products.

TRỊNH THỊ HỒNG THẢO, NGUYỄN THỊ HOA, PHẠM THỊ KIỀU DUNG,
VŨ THỊ NGUYỆT MINH, TRẦN THỊ BÍCH VÂN 7

- Development and validation of the qualitative and quantitative process of Conessine in Cortex Holarrhenae by HPLC method.

NGUYỄN THỊ LAN PHƯƠNG, TRỊNH THỊ QUY, ĐỖ THỊ BÍCH THUẬN,
HỒ NGỌC KỲ, CHỦ THỊ THANH HUYỀN, HÀ VÂN OANH 12

- Development of HPLC method for simultaneous analysis of anti-diabetic APIs that can be illegally mixed in some drug products from medicinal herbs.

VŨ NGỌC THẮNG, TÔ MINH HÙNG, VƯƠNG THỊ PHƯƠNG DUNG, NGUYỄN DUY CHÍ 16

- Quantitation of Tectoridin in Vi ngan liquid extract by High Performance Liquid Chromatography.

BÙI HỒNG CƯỜNG, TRẦN VIỆT HÙNG 22

- Preparation of (2-Chlorophenyl) diphenylmethanol as the impurity reference substance used for quality control of raw materials and dosage forms of Clotrimazole.

NGUYỄN THỊ QUỲNH GIANG, LÊ THỊ THU,
NGUYỄN THỊ PHƯƠNG THẢO, NGUYỄN VĂN GIANG, ĐOÀN CAO SON 26