

ĐỊNH HƯỚNG CÔNG TÁC KIỂM TRA VÀ GIÁM SÁT CHẤT LƯỢNG THUỐC NĂM 2018

PGS. TS. ĐOÀN CAO SƠN

Viện trưởng Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương

Trong năm 2017, hệ thống kiểm nghiệm trên cả nước vẫn tiếp tục 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 Viện trưởng Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương tặng giấy khen cho 16 tập thể và 19 cá nhân đã có thành tích xuất sắc trong công tác kiểm tra, giám sát và đảm bảo chất lượng thuốc năm 2017. Các đơn vị gồm Viện Kiểm nghiệm Thuốc Thành phố Hồ Chí Minh, TTKN Thuốc - Mỹ phẩm - Thực phẩm Thành phố Hồ Chí Minh, TTKN Dược phẩm - Mỹ phẩm Hải Phòng, TTKN Thuốc - Mỹ phẩm - Thực phẩm Quảng Ngãi và TTKN Gia Lai đã được tặng Cờ thi đua của Bộ Y tế. Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương được Hội đồng thi đua Bộ Y tế đề nghị tặng Cờ thi đua của Chính phủ năm 2017.

- Về năng lực của hệ thống kiểm nghiệm: Đến nay toàn hệ thống đã có 10 đơn vị đạt GLP và 46 đơn vị đạt tiêu chuẩn ISO/IEC-17025.

Hội thảo tổng kết công tác kiểm tra, giám sát chất lượng thuốc năm 2017 tại Thành phố Ninh Bình vào ngày 30 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 2018.

1. Định hướng công tác

- Tăng cường thiết lập chất chuẩn, chất đối chiếu để mở rộng danh mục hoạt chất được kiểm soát chất lượng.

- Củng cố và duy trì hệ thống đảm bảo chất lượng bên ngoài (EQAS) theo mô hình của Tổ chức Y tế Thế giới, đây là kết quả của Dự án hợp phần “Tăng cường năng lực kiểm nghiệm thuốc” thuộc Dự án “Hỗ trợ hệ thống y tế” do Quỹ Toàn cầu vòng 10 tài trợ.

- Đối với Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương và Viện Kiểm nghiệm thuốc Thành phố 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 xác định chất lượng các thuốc có nguồn gốc sinh học và enzym. Mở các lớp đào tạo cho

các Trung tâm kiểm nghiệm và các phòng kiểm nghiệm của các doanh nghiệp về chuyên môn kỹ thuật, quản lý chất lượng; tổ chức chương trình đánh giá năng lực thử nghiệm thành thạo bằng so sánh liên phòng thí nghiệm; quản lý phòng thí nghiệm theo tiêu chuẩn GLP và ISO/IEC-17025.

- Đối với 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 tăng cường năng lực quản lý chất lượng thử nghiệm; các Trung tâm Kiểm nghiệm đạt tiêu chuẩn ISO/IEC 17025 và GLP tích cực tham gia công tác tiền kiểm. Tăng cường công tác kiểm tra giám sát chất lượng thuốc trên địa bàn, tại các cơ sở điều trị, sử dụng thuốc, đặc biệt là đối với các thuốc dễ bị biến đổi chất lượng.

2. Nhiệm vụ trọng tâm

2.1. Đối với Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương và Viện Kiểm nghiệm thuốc Thành phố Hồ Chí Minh

- Xây dựng kế hoạch lấy mẫu để làm căn cứ thực hiện và chỉ đạo các Trung tâm Kiểm nghiệm, trong đó tập trung lấy mẫu từ đầu nguồn; tại các nhà phân phối, nhập khẩu; tăng cường lấy mẫu thuốc trúng thầu tại các bệnh viện và các cơ sở y tế.

- Tăng cường năng lực chuyên môn, nhất là tăng cường các thiết bị và chất chuẩn, tạp chuẩn để thực hiện kịp thời kế hoạch tiền kiểm thuốc nhập khẩu và kiểm tra các thuốc phục vụ cho các chương trình của Bộ Y tế (chương trình chống lao, sốt rét và HIV/AIDS).

- Xây dựng và thực hiện đề án nâng cấp Trung tâm Đánh giá tương đương sinh học ở hai Viện theo chuẩn mực Quốc tế và Khu vực.

- Mở rộng 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.

2.2. Đối với các Trung tâm kiểm nghiệm tuyến Tỉnh, Thành phố

- Tiếp tục 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 các chương trình thử nghiệm thành thạo và các lớp tập huấn kỹ thuật do hai Viện tổ chức.

- Xây dựng và thực hiện kế hoạch lấy mẫu theo định hướng và chỉ đạo chuyên môn của Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương.

- Các Trung tâm tham gia đánh giá thuốc nhập khẩu trước khi lưu hành (tiền kiểm) cần bám sát vào tiêu chuẩn thuốc đăng ký, kiểm tra toàn bộ các chỉ tiêu chất lượng theo quy định.

- Cần lưu ý báo cáo kịp thời tình hình chất lượng thuốc, các mẫu không đạt chất lượng về Sở Y tế và hai Viện để có hướng giải quyết và xử lý, tránh để lọt lưới

các thuốc kém chất lượng lưu hành trên thị trường.

2.3. Đối với các 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.

- Rà soát các tiêu chuẩn chất lượng thuốc cho phù hợp với Dược điển Việt Nam V có hiệu lực từ ngày 01/7/2018.

- Cần thực hiện nghiêm túc việc kiểm tra chất lượng nguyên liệu đầu vào, đặc biệt là các dược liệu để tránh sử dụng dược liệu nhầm lẫn hoặc giả mạo.

NGHIÊN CỨU KHOA HỌC

NGHIÊN CỨU ĐỊNH LƯỢNG CURCUMINOIDS TRONG CHẾ PHẨM BẰNG PHƯƠNG PHÁP HPLC VỚI DETECTOR PDA

NGUYỄN THỊ THANH PHƯƠNG, NGUYỄN THÀNH ĐẠT, DƯƠNG THỊ VÂN,

CHU THỊ THÚY, NGUYỄN THỊ HỒNG HẠNH, ĐÀM THỊ THU

Trung tâm Y tế dự phòng Hà Nội

Từ khóa: Curcuminoids, Nghệ, HPLC, nano curcumin

1. Đặt vấn đề

Cây Nghệ vàng hay còn gọi là Uất kim, Khương hoàng, có tên khoa học là *Curcuma longa L.* thuộc họ gừng (*Zingiberaceae*). Nghệ vàng là loài cây khá phổ biến ở nước ta suốt từ Bắc vào Nam [2]. Theo GS. Đỗ Tất Lợi - tác giả của cuốn sách nổi tiếng “Những cây thuốc và vị thuốc Việt Nam” thành phần chính của củ Nghệ vàng là các chất màu vàng gồm curcumin (chiếm khoảng 60%) và hai dẫn chất của nó là demethoxycurcumin (chiếm 24%) và bisdemethoxycurcumin (chiếm 14%), gọi chung là các curcuminoids. Các curcuminoids có nhiều tác dụng sinh học như: ức chế sự phát triển của khối u, chống oxy hóa, tăng khả năng miễn dịch...[1]. Chính vì có nhiều tác dụng như trên, các sản phẩm chiết xuất từ Nghệ đang được sử dụng rộng rãi trên thị trường, chủ yếu ở các dạng: đơn thành phần curcuminoids hoặc Nghệ, hoặc kết hợp với các dược liệu và các hoạt chất hóa học khác để tăng hấp thu và hiệu quả điều trị [4]. Dược điển Mỹ, Trung Quốc mới chỉ có chuyên luận xác định hàm lượng của các curcuminoids trong dược liệu Nghệ bằng phương pháp HPLC, chưa có quy trình phân tích các curcuminoids trong chế phẩm. Vì vậy, cần

nghiên cứu phương pháp có thể phân tách và định lượng riêng từng thành phần các curcuminoids và hạn chế ảnh hưởng của các thành phần khác trong quá trình phân tích. Nghiên cứu này nhằm xây dựng và thẩm định phương pháp định lượng curcuminoids trong các sản phẩm có thành phần từ chiết xuất Nghệ vàng.

2. Thực nghiệm

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

2.1.1. Thiết bị và dụng cụ: Đã được hiệu chuẩn theo ISO/IEC 17025 và GLP.

- Máy sắc ký lỏng Shimadzu SPD M20A/RF 20A với detector PDA

- Cân phân tích Sartorius CP224S, độ chính xác $d = 0,1 \text{ mg}$

- Máy lắc siêu âm

- Các dụng cụ thủy tinh cần thiết.

2.1.2. Hóa chất, chất chuẩn

- *Chất chuẩn:*

- + Chuẩn đối chiếu Curcumin (CUR) của Viện Kiểm nghiệm Thuốc Thành phố Hồ Chí Minh;

+ Chuẩn làm việc Demethoxycurcumin (DMC) của Trung Quốc;

+ Chuẩn làm việc Bisdemethoxycurcumin (BDMC) của Trung Quốc.

- *Dung môi, hóa chất*: Methanol, Acetonitril, Acid acetic đạt tiêu chuẩn tinh khiết dùng cho phân tích hoặc cho HPLC.

2.2. Mẫu nghiên cứu

- *Mẫu thử*: Viên nang Nano Curmin Gold Golden Health USA của Công ty Cổ phần VTYT Hải Dương có công thức bào chế cho 1 viên như sau:

Nano Curcumin 320 mg, Trần bì 50 mg, Chè dây 50 mg, Nấm linh chi 150 mg, Piperin 5 mg và phụ gia vừa đủ.

- *Mẫu placebo*: Có các thành phần khác giống viên nang Nano Curmin Gold Golden Health USA nhưng không chứa Curcumin.

2.3. Phương pháp nghiên cứu

2.3.1. Điều kiện sắc ký

- Cột sắc ký: Agilent Zorbax Eclipse XDB C18 (250 x 4,6 mm; 5 μ m).

- Nhiệt độ cột 40°C.

- Pha động: Acetonitril - Dung dịch acid acetic 4% (40 : 60)

- Tốc độ dòng: 1,5 ml/phút.

- Detector: UV- VIS 430 nm.

- Thể tích tiêm: 20 μ l.

2.3.2. Chuẩn bị các dung dịch chuẩn và thử

- *Dung dịch thử*: Cân chính xác khoảng 0,2 g mẫu thử, cho vào bình định mức 100 ml. Thêm khoảng 60 ml methanol, lắc siêu âm trong 15 phút, thêm methanol vừa đủ đến vạch, lắc đều. Lọc qua màng lọc 0,45 μ m.

- *Dung dịch chuẩn*:

+ *Dung dịch chuẩn gốc CUR*: Cân chính xác khoảng 40 mg chuẩn Curcumin vào bình định mức 100 ml, thêm 60 ml methanol, lắc cho tan, thêm methanol vừa đủ thể tích, lắc đều.

+ *Dung dịch chuẩn gốc DMC*: Cân chính xác khoảng 10 mg chuẩn Demethoxycurcumin vào bình định mức 100 ml, thêm 60 ml methanol, lắc cho tan, thêm methanol vừa đủ thể tích, lắc đều.

+ *Dung dịch chuẩn gốc BDMC*: Cân chính xác khoảng 10 mg chuẩn Bisdemethoxycurcumin vào bình định mức 100 ml, thêm 60 ml methanol, lắc cho tan, thêm methanol vừa đủ thể tích, lắc đều.

+ *Dung dịch chuẩn hỗn hợp*: Từ các dung dịch chuẩn gốc trên, pha các dung dịch chuẩn hỗn hợp có chứa CUR nồng độ khoảng 2 μ g/ml đến 120 μ g/ml; DMC và BDMC nồng độ khoảng 0,5 μ g/ml đến 30 μ g/ml trong methanol.

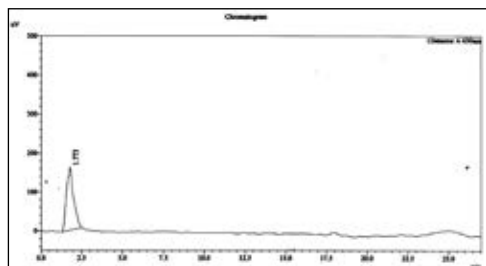
2.3.3. Phương pháp tính kết quả

- Xác định nồng độ CUR, DMC và BDMC có trong các mẫu thử dựa vào diện tích pic của từng chất thu được từ sắc ký đồ của mẫu thử và đường chuẩn biểu thị mối tương quan giữa nồng độ CUR, DMC hoặc BDMC có trong các mẫu chuẩn với diện tích pic tương ứng của mẫu chuẩn.

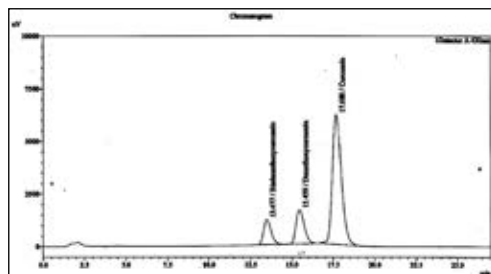
3. Kết quả và bàn luận

3.1. Độ đặc hiệu

Tiến hành phân tích các mẫu trắng và mẫu đối chiếu chứa CUR, DMC và BDMC theo phương pháp đã xây dựng và ghi lại sắc ký đồ (Hình 1, 2).



Hình 1. SKĐ mẫu trắng



Hình 2. SKĐ mẫu chuẩn hỗn hợp

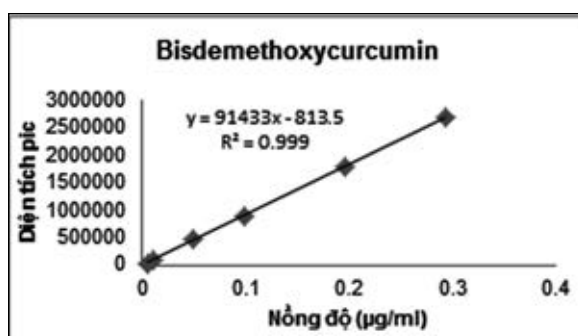
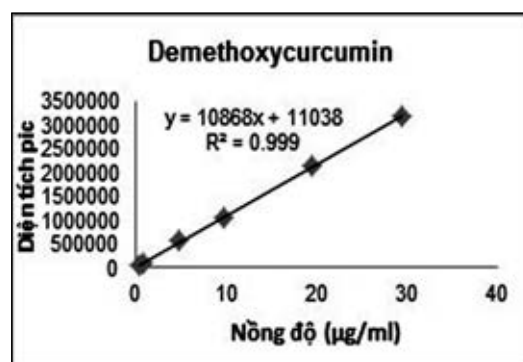
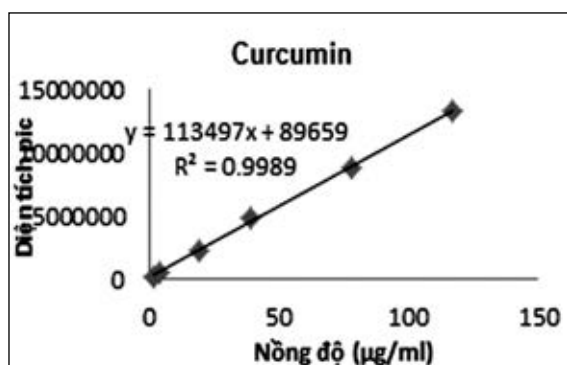
Trên SKĐ của mẫu đối chiếu (Hình 2) xuất hiện các pic tại các thời điểm 13,5 phút; 15,5 phút và 17,7 phút của BDMC, DMC và CUR. SKĐ của mẫu trắng (Hình 1) không xuất hiện các pic tại các thời điểm trên. Do vậy, phương pháp phân tích có độ đặc hiệu-chọn lọc với CUR, DMC và BDMC để phân tích các chất này trong chế phẩm.

3.2. Độ tuyến tính

Phân tích các mẫu chuẩn hỗn hợp có chứa CUR nồng độ khoảng 2 µg/ml đến 120 µg/ml; DMC và BDMC nồng độ khoảng 0,5 µg/ml đến 30 µg/ml theo quy trình đã xây dựng. Xác định sự tương quan giữa nồng độ CUR, DMC và BDMC có trong mẫu và diện tích pic tương ứng thu được trên SKĐ bằng phương pháp hồi qui tuyến tính. Kết quả xác định mối tương quan này được trình bày ở Bảng 1.

Bảng 1. Kết quả thẩm định khoảng tuyến tính của phương pháp

CUR	Nồng độ (µg/ml)	1,95	3,90	19,5	39,0	78,0	117
	Diện tích pic	235139	426909	2272424	4864938	8834580	13320002
	Phương trình hồi quy: $y = 113496,6 x + 89659$; $r = 0,999$						
DMC	Nồng độ (µg/ml)	0,49	0,98	4,9	9,8	19,6	29,4
	Diện tích pic	55011	104322	565273	1079774	2145360	3199250
	Phương trình hồi quy: $y = 10868 x + 11038$; $r = 1,000$						
BDMC	Nồng độ (µg/ml)	0,49	0,98	4,9	9,8	19,6	29,4
	Diện tích pic	38075	82442	460530	894090	1796127	2682569
	Phương trình hồi quy: $y = 91433 x - 813,5$; $r = 1,000$						



Hình 3. Đồ thị khảo sát sự tương quan tuyến tính giữa nồng độ và diện tích pic của CUR, DMC, BDMC

Kết quả thẩm định cho thấy trong khoảng nồng độ từ 2 µg/ml đến 120 µg/ml có sự tương quan tuyến tính giữa nồng độ và diện tích pic CUR, từ 0,5 µg/ml đến 30 µg/ml có sự tương quan tuyến tính giữa nồng độ và diện tích pic DMC và BDMC với hệ số tương quan xấp xỉ bằng 1. Nồng độ CUR, DMC và BDMC xác định từ đường chuẩn so với nồng độ lý thuyết đều nằm trong giới hạn cho phép (80 - 120%).

3.3. Giới hạn định lượng (LOQ)

Pha loãng dần dung dịch chuẩn hỗn hợp CUR, DMC và BDMC ở mục 2.3.3 đến nồng độ thấp nhất sao cho khi tiêm vào hệ thống sắc ký tín hiệu thu được cao gấp 10 lần so với nhiễu đường nền và có độ đúng, độ lặp lại đạt yêu cầu để định lượng. Giới hạn định lượng của CUR, DMC và BDMC lần lượt là 0,195 µg/ml; 0,049 µg/ml và 0,049 µg/ml.

3.4. Độ đúng và độ lặp lại

Tiến hành đánh giá độ đúng, độ lặp lại của phương pháp trên mẫu tự tạo: Thêm các chuẩn vào nền mẫu placebo và xử lý theo quy trình phân tích để dung dịch cuối cùng có nồng độ các curcuminoids ở 3 mức là 50% (mẫu LQC), 100% (mẫu MQC), và 150% (mẫu HQC) so với nồng độ định lượng. Mỗi mức nồng độ làm 03 mẫu. Xác định hàm lượng các Curcuminoids có trong các mẫu bằng đường chuẩn phân tích trong cùng điều kiện. Độ đúng của phương pháp là tỷ lệ % giữa nồng độ xác định được so với nồng độ lý thuyết. Độ lặp lại của phương pháp được biểu thị bằng giá trị RSD%. Kết quả xác định độ đúng, độ lặp lại của phương pháp được trình bày ở Bảng 2.

Bảng 2. Kết quả thẩm định độ đúng, độ lặp lại

	Curcumin			Demethoxycurcumin			Bisdemethoxycurcumin		
	LQC (19,5 µg/ml)	MQC (39,0 µg/ml)	HQC (58,5 µg/ml)	LQC (4,9 µg/ml)	MQC (9,8 µg/ml)	HQC (14,7 µg/ml)	LQC (4,9 µg/ml)	MQC (9,8 µg/ml)	HQC (14,7 µg/ml)
Độ thu hồi (%)	98,4	98,7	98,7	100,5	101,5	100,2	101,0	101,9	101,8
Độ lặp lại (RSD %)	0,2	0,3	0,03	0,3	0,3	0,04	0,5	0,4	0,04
Trung bình	98,6% (RSD = 0,18%)			100,9% (RSD = 0,21%)			101,5% (RSD = 0,94%)		

Kết quả thẩm định cho thấy ở các nồng độ thấp, trung bình và cao, phương pháp có độ đúng xấp xỉ 100%; độ lặp lại trong ngày và khác ngày với giá trị RSD nhỏ.

3.5. Khoảng xác định

Từ kết quả độ tuyến tính, độ đúng, độ chính xác của phương pháp, khoảng xác định của phương pháp đối với CUR từ 19,5 µg/ml đến 58,5 µg/ml; đối với DMC và BDMC từ 4,9 µg/ml đến 14,7 µg/ml.

3.6. Kết quả phân tích mẫu thực tế

Sử dụng phương pháp đã xây dựng để xác định hàm lượng của các curcuminoids trong mẫu viên nang Nano Curmin Gold Golden Health USA. Kết quả phân tích được trình bày ở Bảng 3.

Bảng 3. Hàm lượng CUR, DMC và BDMC trong chế phẩm

TT	Tên chất	Hàm lượng trong chế phẩm (mg/viên)	Tỷ lệ % trong 1 viên chứa 320 mg nano curcumin
1	Curcumin	14,51	4,53
2	Demethoxycurcumin	2,40	0,75
3	Bisdemethoxycurcumin	0,39	0,12
Tổng các curcuminoids		17,30	5,28

4. Kết luận

Nghiên cứu đã xây dựng được phương pháp định lượng CUR, DMC và BDMC trong chế phẩm bằng phương pháp HPLC-PDA. Quy trình xử lý mẫu bằng cách hòa tan trong methanol; điều kiện sắc ký: cột sắc ký C18 (250 x 4,6 mm; 5 µm), detector UV 430 nm, pha động ACN - CH₃COOH 4% (40:60, v/v), tốc độ dòng 1,5 ml/phút, thể tích tiêm mẫu 20 µl. Kết quả thẩm định cho thấy, phương pháp có giá trị giới hạn định lượng nhỏ (0,195 µg/ml đối với CUR; 0,049 µg/ml đối với DMC và BDMC); khoảng tuyến tính rộng (từ 2 µg/ml đến 120 µg/ml đối với CUR và từ 0,5 µg/ml đến 30 µg/ml đối với DMC và BDMC); độ đúng dao động trong khoảng 98,7% - 101,9%; độ lặp lại với giá trị RSD% nhỏ (0,4% - 3,9%), đáp ứng yêu cầu đối với phương pháp phân tích

hóa học theo AOAC. Phương pháp đã xây dựng có thể ứng dụng định lượng các CUR, DMC và BDMC trong các chế phẩm chứa curcuminoids và các thành phần khác.

Tài liệu tham khảo

1. Đỗ Tất Lợi (2006), *Những cây thuốc và vị thuốc Việt Nam*, NXB Y học
2. Võ Văn Chi (1996), *Từ điển cây thuốc Việt Nam*, NXB Y học, Thành phố Hồ Chí Minh.
3. Jadhav, B.-K., Mahadik, K.-R. and Paradkar, A.-R (2007), "Development and validation of improved reversed phase-hplc method for simultaneous determination of curcumin, demethoxycurcumin and bis- demethoxycurcumin", *Chromatographia*, 65, pp.483-488.
4. Shoba G, Joy D, Joseph T, Majeed M, Rajendran R, Srinivas PS (1998), "Influence of piperine on the pharmacokinetics of curcumin in animals and human volunteers", *Planta med*, May, 64(4):353-6.
5. Tanaka, K. Kuba, Y. Sasaki, T. Hiwatashi, F. and Komatsu (2008), "Quantitation of curcuminoids in curcuma rhizome by near-infrared spectroscopic analysis", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, pp.8787- 8792.
6. Zhang, Y, H. Zhang D. Wang, Y. Cai, D.F. and Sun (2009), "Determination of curcuminoids in Turmeric by HPLC", *Chinese Pharmaceutical Journal*, 44, pp.1423-1425.

SUMMARY

A HPLC was proposed to determine Curcuminoids in samples with the chromatographic conditions as follows: Agilent Zorbax Eclipse XDB C18 Column (250 x 4.6 mm; 5 μ m), UV-VIS detector at 430 nm, mobile phase is a mixture of Acetonitrile and 4% acetic acid solution (40: 60), the flow rate about 1.5 ml/minute, injection volume is 20 μ l, temperature column: 40°C.

The experimental results proved that the proposed HPLC method is specificity, precision and accuracy. The method had linear over the concentration range of 2-120 μ g/ml for CUR, and 0.5 - 30 μ g/ml for DMC and BDMC; the LOQ of CUR, DMC and BDMC were 0.195 μ g/ml, 0.049 μ g/ml and 0.049 μ g/ml; the accuracy were within 98.4% - 101.9%. This method was suitable for determination of CUR, DMC and BDMC in sample.

(Ngày nhận bài: 17/11/2017 ; Ngày phản biện: 14/12/2017 ; Ngày duyệt đăng: 20/12/2017)

XÂY DỰNG PHƯƠNG PHÁP ĐỊNH LƯỢNG BẠC BẰNG QUANG PHỔ HẤP THỤ NGUYÊN TỬ (AAS) VÀ KIỂM NGHIỆM HÌNH DẠNG, KÍCH THƯỚC TIỂU PHÂN NANO BẠC

THÁI NGUYỄN HÙNG THU, VÕ VIỆT HÙNG
Trường Đại học Dược Hà Nội

TRẦN VIỆT HÙNG
Viện Kiểm nghiệm thuốc TP. HCM

LÊ THỊ HƯỜNG HOA
Viện Kiểm nghiệm thuốc TW

Từ khóa: Bạc, nano bạc, AAS, định lượng

1. Đặt vấn đề

Trong lĩnh vực y tế, thị trường ngày càng xuất hiện nhiều sản phẩm có chứa nano bạc như: gel rửa tay nano bạc, dung dịch rửa xoang, dung dịch rửa vết thương, nước súc miệng, khẩu trang chứa nano bạc... Các sản phẩm này đã đóng vai trò tích cực trong công tác phòng chống một số dịch bệnh như: dịch tay chân miệng, dịch tiêu chảy, dịch cúm gia cầm, dịch sởi. Tại Việt Nam, đã có một số nghiên cứu xây dựng tiêu chuẩn đối với gel rửa tay nano bạc. Tuy nhiên, đối với một số sản phẩm nano bạc khác như dạng: hỗn dịch nano bạc (HD), dung dịch nước súc miệng (NSM) thì hiện nay chưa có phương pháp kiểm tra chất lượng. Để góp phần đánh giá chất lượng của những sản phẩm này, nghiên cứu đã được thực

hiện với mục tiêu: Xây dựng được quy trình xác định hàm lượng bạc trong một số sản phẩm nano bạc đảm bảo độ chính xác cao, độ lặp lại và độ nhạy cao; đồng thời xây dựng được phương pháp xác định hình dạng, kích thước tiểu phân nano bạc. Phương pháp cũng được áp dụng đối với một số mẫu hỗn dịch nano bạc 1000 ppm và dung dịch nước súc miệng 5 ppm được bào chế tại Khoa Nghiên cứu & Phát triển của Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương.

2. Thực nghiệm

2.1. Hóa chất, chất chuẩn và mẫu nghiên cứu

Do yêu cầu nghiêm ngặt của phương pháp AAS nên nước cất và hoá chất sử dụng phải có độ tinh khiết

rất cao, loại superpure hay tinh khiết dùng cho AAS, bao gồm:

- Dung dịch bạc chuẩn 1000 ppm (Merck, Đức);
- Bạc nitrat (Merck, Đức);
- Dung dịch acid nitric 65% (Merck, Đức).

Tất cả các dung dịch thuốc thử và các bước pha loãng thực hiện trong quá trình phân tích đều được thực hiện với nước cất được làm sạch bằng phương pháp trao đổi ion, có điện trở suất $\geq 18 \text{ M}\Omega\cdot\text{cm}^{-1}$ hay các dung dịch thích hợp được chuẩn bị trong dung môi là nước cất được xử lý như trên.

- Mẫu nghiên cứu bao gồm: 2 mẫu hỗn dịch nano bạc 1000 ppm (HD1, HD2) và 2 mẫu dung dịch nước súc miệng nano bạc 5 ppm (NSM1, NSM2) được bảo chế vào tháng 10 và tháng 12/2016 tại khoa Nghiên cứu & phát triển của Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương.

2.2. Thiết bị, dụng cụ

2.2.1. Thiết bị, dụng cụ dùng để định lượng bạc bằng phương pháp AAS

- Máy quang phổ hấp thụ nguyên tử Z-5000 (Hitachi, Nhật Bản) có trang bị đèn cathod rỗng, đầu đốt sử dụng ngọn lửa acetylen - không khí nén;

- Cân phân tích có độ chính xác 0,1 mg (Mettler Toledo AB 204S, Mỹ);

- Hệ thống lọc nước trao đổi ion (Easypure UV/UF, Barnsted, Mỹ);

- Các dụng cụ thủy tinh, nồi cách thủy.

Tất cả các máy móc và dụng cụ đã được hiệu chuẩn và kiểm định theo đúng tiêu chuẩn ISO/IEC 17025, GLP.

2.2.2. Thiết bị, dụng cụ dùng để kiểm nghiệm kích thước tiểu phân nano bạc

- Kính hiển vi điện tử quét FESEM Hitachi S-4800 với các thông số cụ thể:

(Súng điện tử: Nguồn điện tử phát xạ trường lạnh; Thế gia tốc: 0,5 kV đến 30 kV; Độ phóng đại: 20 lần đến 800000 lần; Độ phân giải: 1 nm đến 5 nm).

- Giá đỡ mẫu: Hình trụ bằng nhôm.

- Đầu dò: Điện tử thứ cấp.

- Bảng carbon có diện tích khoảng 10 mm².

- Máy sấy.

2.3. Phương pháp nghiên cứu

2.3.1. Kiểm nghiệm hình dạng và kích thước nano bạc bằng SEM [1]

- Tiến hành kiểm nghiệm với kính hiển vi điện tử quét (Scanning Electron Microscope, SEM), loại kính hiển vi tạo ảnh với độ phân giải cao nhờ chùm điện tử

hẹp quét trên bề mặt mẫu. Việc tạo ảnh mẫu vật được thực hiện bằng ghi nhận và phân tích bức xạ phát ra từ tương tác của chùm điện tử với bề mặt mẫu vật.

- Lựa chọn tốc độ quét ảnh, điều kiện xử lý mẫu, độ phóng đại nhằm thu được hình ảnh rõ nét của các tiểu phân bạc, để có thể xác định kích thước của các tiểu phân nhỏ nhất, lớn nhất và tỷ lệ các tiểu phân hình cầu trên tổng số tiểu phân trên vi trường.

2.3.2. Định tính, định lượng bạc bằng AAS [2]

- Khảo sát các điều kiện tối ưu cho định tính, định lượng bạc bằng AAS: Tiến hành khảo sát để lựa chọn điều kiện phân tích thích hợp nhằm định tính, định lượng được bạc trong các mẫu nghiên cứu trên máy quang phổ hấp thụ nguyên tử. Các điều kiện cần khảo sát bao gồm: nồng độ acid, tốc độ khí, độ rộng khe, chiều cao đầu đốt.

- Thẩm định phương pháp định lượng bạc bằng AAS: Về tính thích hợp của hệ thống, độ đặc hiệu, độ lặp lại, khoảng tuyến tính, độ đúng, khoảng xác định của phương pháp [3],[4].

3. Kết quả và bàn luận

3.1. Kiểm nghiệm hình dạng và kích thước nano bạc bằng SEM

3.1.1. Chuẩn bị mẫu

- Đặt mẫu: Lấy khoảng 20 μl chế phẩm, nhỏ lên bằng carbon đã được làm sạch bằng ethanol tuyệt đối, vừa nhỏ vừa sấy sao cho chế phẩm được dàn đều và khô đều.

- Tạo màng dẫn điện: Phủ màng kim loại lên mẫu bằng phương pháp tạo màng phún xạ (sputtering). Sau khi đặt giá đỡ đã gắn mẫu vào buồng mẫu, dùng bơm hút chân không tới áp suất 0,1 Pa để loại bỏ nước và oxy. Tiến hành quá trình phủ màng kim loại lên mặt mẫu và đo ngay.

3.1.2. Tiến hành đo

Gắn mẫu vào giá đỡ, lấy tiêu cự và đo ở thế gia tốc 4 kV đến 5 kV với cường độ dòng điện 10 μA . Điều chỉnh độ phóng đại thích hợp (chọn khoảng 500 000 lần) để chụp ảnh các tiểu phân nano bạc, chỉnh sao cho ảnh rõ nét nhất, tiến hành chụp và ghi lại ảnh.

3.1.3. Đánh giá

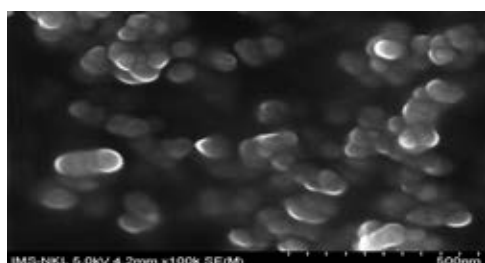
Chọn 6 vị trí, mỗi vị trí khoảng 1 μm^2 , tại các điểm bất kỳ của ảnh trên màn hình. Xử lý để thu các kết quả sau:

- Tỷ lệ tiểu phân hình cầu: Đếm tổng số tiểu phân và số lượng tiểu phân hình cầu tại các vị trí quan sát. Tính tỷ lệ trung bình của tiểu phân hình cầu so với tổng số tiểu phân tại các vị trí.

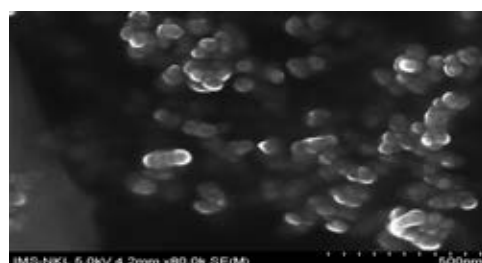
- Kích thước của tiểu phân bạc: Đo kích thước của tiểu phân lớn nhất, tiểu phân nhỏ nhất và kích thước (một cách tương đối) của đa số tiểu phân trong vi trường theo thước đo trên ảnh.

3.1.4. Kết quả đo

Kiểm nghiệm hình dạng và kích thước của 02 mẫu hỗn dịch nano bạc 1000 ppm và 02 mẫu nước súc miệng 5 ppm. Kết quả được thể hiện ở Hình 1, Hình 2 và Bảng 1.



A)



B)

Hình 1. Ảnh SEM của hỗn dịch nano bạc 1000 ppm: A) mẫu HD1; B) mẫu HD2



a)



b)

Hình 2. Ảnh SEM của nước súc miệng nano bạc 5 ppm: a) mẫu NSM1; b) mẫu NSM2

Bảng 1. Kết quả kiểm nghiệm hình dạng, kích thước nano bạc của 04 mẫu thử

Chỉ tiêu	HD1	HD2	NSM1	NSM2
Tỷ lệ tiểu phân bạc hình cầu (%)	94,5	96,6	95,1	94,8
Kích thước tiểu phân bạc lớn nhất (nm)	58	55	58	55
Kích thước tiểu phân bạc bé nhất (nm)	25	25	25	25
Tỷ lệ tiểu phân bạc có kích thước 30 nm đến 40 nm (%)	92,9	93,6	91,4	90,8

Kết quả trong Hình 1, Hình 2 và Bảng 1 cho thấy cả 4 mẫu nano bạc thử nghiệm đều có kích thước tiểu phân bạc ở mức nano (25 nm đến 58 nm) với đa số trong khoảng 30 nm đến 40 nm (90,8% đến 93,6%) và tỷ lệ tiểu phân bạc hình cầu khá cao (94,5% đến 96,6%).

3.2. Định lượng bạc bằng AAS

3.2.1. Khảo sát và lựa chọn các điều kiện thích hợp cho định lượng bạc bằng AAS

Dựa trên một số tài liệu tham khảo và điều kiện hiện có, đã tiến hành khảo sát và chọn được dung dịch acid nitric là dung môi thích hợp để pha mẫu. Tiến hành đo độ hấp thụ của dung dịch bạc ở nồng độ 2 ppm được pha trong các dung dịch acid nitric lần lượt có nồng độ là 0,2%, 1%, 1,5% và 2%. Kết quả thu được cho thấy: Nếu sử dụng acid nitric ở nồng độ 0,2% thì độ hấp thụ rất thấp. Sử dụng acid nồng độ 1%, 1,5% cho kết quả ổn định và độ lặp lại tốt, đồng thời nồng độ acid càng nhỏ sẽ giảm ảnh hưởng hóa học tới phép đo quang phổ hấp thụ nguyên tử. Vì vậy, nồng độ acid nitric thích hợp để pha mẫu là 1% đã được chọn.

Tiếp theo, tiến hành khảo sát tốc độ khí, cường độ đèn, độ rộng khe để chọn được điều kiện đo cho phép định lượng bạc tốt nhất. Từ kết quả thu được, xác định được điều kiện đo AAS như sau:

- Đèn cathod rỗng Ag.
- Bước sóng 328,1 nm.
- Loại ngọn lửa: Acetylen - không khí nén.
- Chiều cao đầu đốt: 7,5 mm.

3.2.2. Quy trình thử

- *Chuẩn bị dãy dung dịch chuẩn:* Hút chính xác 5,0 ml dung dịch bạc chuẩn gốc 1000 ppm vào bình định mức 100,0 ml. Thêm dung dịch acid nitric 1% đến vừa đủ, lắc đều, thu được dung dịch bạc chuẩn 50 ppm. Pha loãng dung dịch bạc chuẩn 50 ppm bằng dung dịch acid nitric 1% để thu được dãy dung dịch chuẩn có nồng độ bạc là 0,5 ppm; 1,0 ppm; 2,0 ppm; 3,0 ppm; 4,0 ppm và 5,0 ppm.

- *Chuẩn bị các dung dịch thử:*

- Đối với hỗn dịch nano bạc 1000 ppm: Hút chính xác 5,0 ml chế phẩm, cho vào bình định mức 100,0 ml. Thêm 10 ml dung dịch acid nitric 10% lắc đều, đun cách thủy 10 phút, để nguội, thêm nước trao đổi ion vừa đủ đến vạch thu được dung dịch bạc cỡ 50 ppm. Pha loãng bằng dung dịch acid nitric 1% để được dung dịch có nồng độ bạc cỡ 2,0 ppm.

- Đối với nước súc miệng nano bạc 5 ppm: Hút chính xác 10,0 ml chế phẩm, cho vào bình định mức 25 ml, thêm 2,5 ml dung dịch HNO₃ 10%, đun cách thủy 30 phút, để nguội, thêm nước trao đổi ion vừa đủ để thu được dung dịch bạc cỡ 2 ppm.

- *Cách đo:*

Khởi động hệ thống máy quang phổ hấp thụ nguyên tử. Mở đường nước, mở van khí. Bật đèn, để ổn định 15 phút. Bật ngọn lửa. Khi tín hiệu đường nền đã ổn định, tiến hành đo các dung dịch chuẩn (từ nồng độ thấp tới nồng độ cao), các dung dịch thử theo các thông số đưa ra trong mục khảo sát các điều kiện đo. Dựng đường chuẩn thực nghiệm biểu diễn sự phụ thuộc của độ hấp thụ và nồng độ bạc trong dãy chuẩn. Nồng độ bạc trong dung dịch thử được tính toán dựa vào đường chuẩn.

- *Cách tính toán kết quả*

Hàm lượng (%) bạc so với lượng ghi trên nhãn được tính theo công thức:

$$X (\%) = \frac{C \times f}{V \times A} \times 100$$

trong đó:

C: Nồng độ của chế phẩm suy ra từ đường chuẩn (ppm).

- Cường độ đèn 4,0 mA.
- Độ rộng khe: 0,4 nm.
- Tốc độ khí acetylen: 1 ml/phút.

f : Hệ số pha loãng mẫu thử.

V: Thể tích mẫu thử đem pha loãng (ml).

A: Nồng độ trên nhãn của chế phẩm (ppm).

3.2.3. Thẩm định quy trình

3.2.3.1. Tính thích hợp của hệ thống

Tiến hành 6 lần đo độ hấp thụ của một dung dịch bạc chuẩn có nồng độ 2 ppm theo các điều kiện đã lựa chọn. Kết quả được thể hiện trong Bảng 2.

Bảng 2. Kết quả đánh giá tính thích hợp của hệ thống

Lần đo	Cường độ hấp thụ
1	0,0718
2	0,0713
3	0,0715
4	0,0717
5	0,0720
6	0,0720
Trung bình	0,0717; n = 6; RSD = 0,39%

Kết quả thu được cho thấy hệ thống có độ ổn định tốt, đạt yêu cầu về tính thích hợp của hệ thống, đảm bảo cho việc định lượng bạc.

3.2.3.2. Độ đặc hiệu của phương pháp

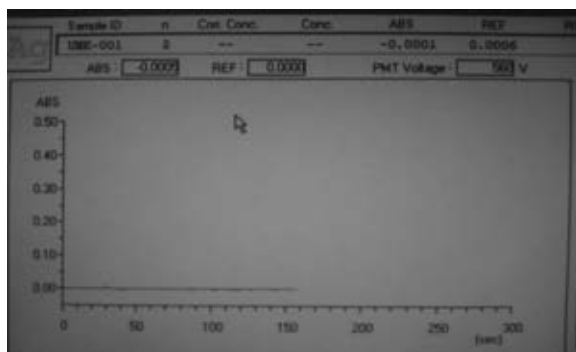
Chuẩn bị các mẫu nền (mẫu placebo) có thành phần tương tự như các chế phẩm nhưng không có bạc. Cụ thể như sau:

Mẫu placebo của hỗn dịch có các thành phần: 2000 ml hỗn hợp nước cất - ethanol 96° (50:50), 15 g PVP, 2,36 g NaNO₃, nước RO vừa đủ 3000 ml.

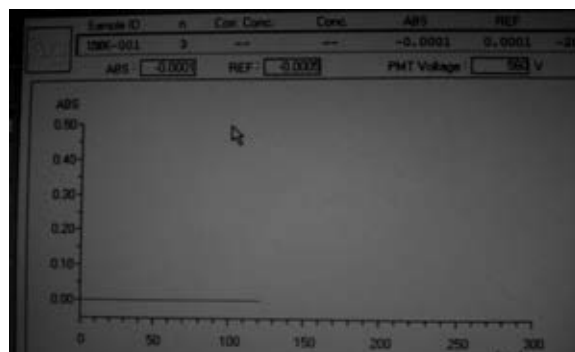
Mẫu placebo của nước súc miệng có các thành phần: 10 g sorbitol, 20 g isopropanol, 5 g natri saccharin, 5 g Natri benzoat, 1 g xylitol, 1 g thymol, 60 ml ethanol 90°, màu Brilliant Blue FCF và hương liệu vừa đủ, nước RO vừa đủ 1000 ml.

- Chuẩn bị mẫu chuẩn có nồng độ bạc 2 ppm và mẫu thử theo mục 3.2.2.

- Tiến hành đo độ hấp thụ của các dung dịch mẫu nền, dung dịch chuẩn và dung dịch mẫu thử ở các điều kiện đã lựa chọn. Kết quả thu được thể hiện ở Hình 3 và Hình 4.



A)

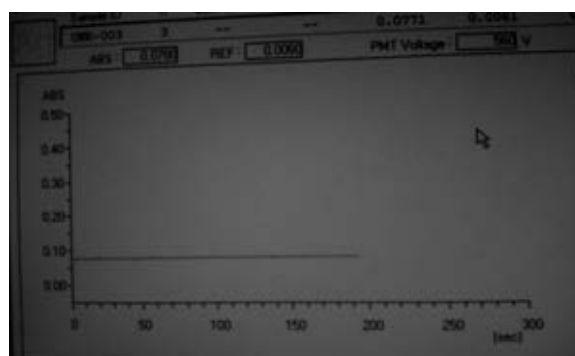


B)

Hình 3. Độ hấp thụ của mẫu nền theo thời gian: A)Hỗn dịch; B)Nước súc miệng



a)



b)

Hình 4. Độ hấp thụ của mẫu thử: a) Hỗn dịch HD1; b) Nước súc miệng NSMI

Kết quả cho thấy: Mẫu nền của cả hỗn dịch nano bạc và nước súc miệng độ hấp thụ đều ổn định ở giá trị 0,00; Mẫu thử của cả hỗn dịch nano bạc 1000 ppm và nước súc miệng 5 ppm có độ hấp thụ duy trì khá ổn định ở mức 0,07 - 0,08.

Như vậy, phương pháp có độ đặc hiệu cao, có thể dùng để định tính và đảm bảo cho việc định lượng bạc.

3.2.3.3. Khoảng tuyến tính

Chuẩn bị dãy 6 dung dịch chuẩn bạc trong dung dịch acid nitric 1% từ 0,5 ppm đến 5,0 ppm. Tiến hành đo độ hấp thụ theo các thông số đo đã khảo sát. Kết quả thu được như ở Bảng 3.

Bảng 3. Kết quả khảo sát khoảng tuyến tính

Nồng độ Ag (ppm)	0,5	1,0	2,0	3,0	4,0	5,0
Độ hấp thụ (Abs)	0,0177	0,0358	0,0717	0,1064	0,1415	0,1755
Phương trình hồi quy	$y = 0,0351x + 0,0008; r = 0,9999$					

Kết quả cho thấy có sự tương quan tuyến tính chặt chẽ giữa nồng độ Ag của dung dịch đo và độ hấp thụ trong khoảng nồng độ đã khảo sát từ 0,5 µg/ml đến 5 µg/ml với hệ số tương quan $r = 0,9999$.

3.2.3.4. Độ lặp lại

Tiến hành phân tích ở mức nồng độ 100% với 6 lần cân mẫu thử độc lập của cùng một chế phẩm, tính toán hàm lượng Ag tìm được. Đánh giá độ phân tán của số liệu dựa vào giá trị RSD (%).

Bảng 4. Kết quả khảo sát độ lặp lại của phương pháp với mẫu hỗn dịch (HD1)

STT	Độ hấp thụ (Abs)	Nồng độ Ag của dung dịch thử ($\mu\text{g/ml}$)	Hàm lượng bạc tìm được so với nhãn (%)	Số liệu thống kê
1	0,0696	1,9601	98,01	HL trung bình = 98,15%; n = 6; RSD = 0,54%
2	0,0696	1,9601	98,01	
3	0,0694	1,9544	97,72	
4	0,0701	1,9744	98,72	
5	0,0693	1,9516	97,58	
6	0,0702	1,9772	98,86	

Bảng 5. Kết quả khảo sát độ lặp lại của phương pháp với mẫu nước súc miệng (NSM1)

STT	Độ hấp thụ (Abs)	Nồng độ Ag của dung dịch thử ($\mu\text{g/ml}$)	Hàm lượng bạc tìm được so với nhãn (%)	Số liệu thống kê
1	0,0719	2,0256	101,28	HL trung bình = 100,71%; n = 6; RSD = 0,26%
2	0,0714	2,0114	100,57	
3	0,0717	2,0199	101,00	
4	0,0718	2,0228	101,14	
5	0,0716	2,0171	100,85	
6	0,0715	2,0142	100,71	

Kết quả ở Bảng 5 và Bảng 6 cho thấy quy trình đã xây dựng có độ lặp lại tốt, RSD không quá 0,6%.

3.2.3.5. Độ đúng

Độ đúng của phương pháp được xác định bằng cách đánh giá ở trên các mẫu tự tạo:

- Các hỗn dịch nano bạc tự tạo: Tiến hành pha chế 09 mẫu hỗn dịch nano bạc tự tạo có đủ các thành phần (do nhóm nghiên cứu tự làm) theo quy trình sản xuất của Khoa Nghiên cứu & Phát triển của Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương để được các hỗn dịch có hàm lượng bạc là: 800 ppm (80%), 1000 ppm (100%) và 1200 ppm (120%) so với hàm lượng của công thức pha chế.

- Các dung dịch nano bạc 5 ppm tự tạo: Hút chính xác 200 μl , 250 μl , 300 μl dung dịch bạc chuẩn 1000 ppm vào các bình định mức 50,0 ml, thêm vừa đủ bằng dung dịch mẫu nền, lắc đều để được các dung dịch có chứa bạc.

- Tiến hành định lượng bạc với điều kiện xử lý mẫu và đo độ hấp thụ nguyên tử như đã nêu. Ở mỗi nồng độ tiến hành 03 mẫu thử riêng biệt. Độ đúng được thể hiện qua tỷ lệ phần trăm giữa kết quả tìm lại được so với lượng hoạt chất đã cho vào.

Kết quả thu được như ở Bảng 6 và Bảng 7. Kết quả cho thấy tỷ lệ thu hồi ở cả 3 mức nồng độ của mẫu tự tạo đều khá tốt từ 97,37% đến 97,86% (đối với hỗn dịch nano bạc 1000 ppm) và từ 101,90% đến 103,99% (đối với nước súc miệng nano bạc 5 ppm) với RSD lớn nhất là 1,05%. Kết quả thu được chứng tỏ phương pháp có độ đúng cao, đảm bảo tốt cho các phép phân tích xác định hàm lượng bạc trong các chế phẩm hỗn dịch nano bạc 1000 ppm và nước súc miệng nano bạc 5 ppm.

Bảng 6. Kết quả khảo sát độ đúng đối với hỗn dịch nano bạc 1000 ppm

Loại mẫu tự tạo	Lượng cân AgNO_3 (g)	Lượng Ag tương ứng (g)	Nồng độ Ag trong dung dịch đo AAS (ppm)	Độ hấp thụ (Abs)	Nồng độ Ag tìm lại (ppm)	Tỷ lệ thu hồi (%)	Trung bình (%)
80%	0,3782	0,2403	1,6020	0,0560	1,5727	98,18	97,86%; RSD = 0,29%
	0,3777	0,2400	1,6000	0,0557	1,5640	97,78	
	0,3776	0,2399	1,5993	0,0556	1,5613	97,62	
100%	0,4717	0,2997	1,9980	0,0689	1,9400	97,12	97,37%; RSD = 0,23%
	0,4724	0,3001	2,0007	0,0693	1,9513	97,54	
	0,4728	0,3004	2,0027	0,0693	1,9513	97,46	
120%	0,5661	0,3596	2,3973	0,0831	2,3447	97,79	97,52%; RSD = 0,34%
	0,5664	0,3598	2,3987	0,0826	2,3307	97,15	
	0,5671	0,3603	2,4020	0,0831	2,3447	97,62	

Bảng 7. Kết quả khảo sát độ đúng đối với nước súc miệng nano bạc 5 ppm

Loại mẫu tự tạo	Lượng mẫu Ag chuẩn (μl)	Nồng độ Ag pha chế (ppm)	Nồng độ Ag trong dung dịch đo AAS (ppm)	Độ hấp thụ (Abs)	Nồng độ Ag tìm lại (ppm)	Tỷ lệ thu hồi (%)	Trung bình (%)
80%	200	4,0000	1,600	0,0581	1,63248	102,03	102,74%; RSD = 1,05%
	200	4,0000	1,600	0,0592	1,66380	103,99	
	200	4,0000	1,600	0,0582	1,63532	102,21	
100%	250	5,0000	2,000	0,0726	2,04560	102,28	101,90%; RSD = 0,53%
	250	5,0000	2,000	0,0719	2,02564	101,28	
	250	5,0000	2,000	0,0725	2,04272	102,14	
120%	300	6,0000	2,400	0,0881	2,48716	103,63	103,99%; RSD = 0,59%
	300	6,0000	2,400	0,0881	2,48716	103,63	
	300	6,0000	2,400	0,0890	2,51284	104,70	

3.2.3.6. Khoảng xác định của phương pháp

Từ kết quả trong phần độ đúng, các nồng độ này đều nằm trong khoảng tuyến tính và đạt yêu cầu về độ lặp lại. Vì vậy đây chính là khoảng nồng độ xác định của phương pháp (từ 1,6000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ đến 2,4020 $\mu\text{g}/\text{ml}$ trong dung dịch cuối đem đo AAS).

3.2.4. Áp dụng định lượng bạc trong một số sản phẩm

Áp dụng phương pháp phân tích xây dựng được để định lượng bạc trong các mẫu nghiên cứu: HD1, HD2, NSM1, NSM2. Mỗi mẫu làm 03 lần, kết quả thu được như ở Bảng 8.

Bảng 8. Hàm lượng bạc toàn phần của các mẫu nghiên cứu

Mã mẫu	Hàm lượng so với nhãn (%)	RSD (%)
HD1	98,15	0,54
HD2	102,04	1,73
NSM1	100,93	0,26
NSM2	102,85	1,10

3.3. Bàn luận

Phương pháp sử dụng kính hiển vi điện tử quét với độ phóng đại lựa chọn là 500000 lần, với phương pháp xử lý mẫu đơn giản, nhanh chóng, làm khô mẫu sau đó tạo một lớp màng dẫn điện cho mẫu bằng máy phun xạ. Bằng kỹ thuật này từ hình chụp được có thể xác định được kích thước và hình dạng tiểu phân nano bạc qua các thông số: kích thước tiểu phân bạc lớn nhất và nhỏ nhất, tỷ lệ các tiểu phân bạc có hình cầu. Kết quả cho thấy các mẫu nghiên cứu đều có: kích thước tiểu phân bạc đều dưới 100 nm, tỷ lệ các tiểu phân bạc có kích thước 30-40 nm không dưới 90%, tỷ lệ các tiểu phân bạc có hình cầu đều đạt trên 90%.

Quy trình định lượng bạc trong một số sản phẩm nano bạc bằng quang phổ hấp thụ nguyên tử đã được chúng tôi xây dựng trên cơ sở thiết bị hiện có ở Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương. Phương pháp xử lý mẫu rất đơn giản, nhanh chóng với việc sử dụng acid nitric 1% làm môi trường hòa tan. Quá trình phân tích bạc được thực hiện bằng phương pháp đo phổ hấp thụ nguyên tử dùng kỹ thuật nguyên tử hóa mẫu bằng ngọn lửa đèn khí, sử dụng đèn cathod rỗng bạc ở bước sóng 328,1 nm. Quy trình đã được khảo sát tối ưu hóa, được thẩm định về độ thích hợp của hệ thống, khoảng tuyến tính, độ lặp lại, độ đúng trên các sản phẩm nano bạc với kết quả tốt, phù hợp cho ứng dụng đề ra ban đầu của nghiên cứu là sử dụng để xác định hàm lượng bạc trong một số sản phẩm nano bạc. Quy trình đã được áp dụng kiểm tra hàm lượng bạc trong 2 mẫu hỗn dịch nano bạc 1000 ppm và 2 mẫu dung dịch nước súc miệng nano bạc 5 ppm được bào chế vào tháng 10 và tháng 12 năm 2016 tại Khoa Nghiên cứu & Phát triển của Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương. Kết quả cho thấy cả 4 mẫu đều có hàm lượng bạc đạt yêu cầu.

Hàm lượng bạc trong các mẫu nghiên cứu xác định ở trên là hàm lượng toàn phần, muốn xác định riêng hàm lượng bạc nano có thể làm thêm phương pháp chuẩn độ thích hợp để xác định hàm lượng Ag^+ hoặc loại ion Ag^+ bằng cách kết tủa trước khi xử lý mẫu, từ đó có thể tính riêng hàm lượng bạc dưới dạng phân tử.

4. Kết luận

Đã xây dựng được phương pháp xác định kích thước tiểu phân và định lượng hàm lượng bạc trong hỗn dịch và dung dịch nước súc miệng có chứa nano bạc. Kết quả nghiên cứu trên một số chế phẩm cho thấy trên 90% tiểu phân bạc có hình cầu, có kích thước đều dưới 100 nm, tỷ lệ các tiểu phân bạc có kích thước 30-40 nm không dưới 90%, các mẫu đều có hàm lượng bạc đạt yêu cầu.

Tài liệu tham khảo

1. Nguyễn Kim Giao (2004), *Hiển vi điện tử trong khoa học sự sống*, Nhà xuất bản Đại học Quốc gia Hà Nội.
2. Phạm Luận (1987), *Cơ sở lý thuyết phổ hấp thụ nguyên tử*, tr. 1-35, Nhà xuất bản trường Đại học Tổng hợp Hà Nội, Hà Nội.
3. Tạ Mạnh Hùng, Đoàn Cao Sơn (2012), “Hướng dẫn chung thẩm định qui trình phân tích bằng phương pháp HPLC”, *Tạp chí Kiểm nghiệm thuốc*, 10 (38), trang 1-8.
4. Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương (2007), *Đảm bảo chất lượng thuốc và một số phương pháp kiểm nghiệm thuốc* (Tài liệu đào tạo).

SUMMARY

The method uses scanning electron microscope with a magnification of 500,000 times, simple sample processing, rapid drying of the sample and then forming a conductive film for the sample by sputtering machine. Using this technique, we determined the size and shape of the silver nanoparticles by parameters: the largest and smallest silver size, the proportion of silver spheres. The results showed that the samples were of silver particle size < 100 nm, proportion of silver nanoparticles of 30-40 nm in size was not less than 90%, ratio of silver spheres was 90%.

Silver quantitative method in some silver nanoparticles by atomic absorption spectrophotometry have been developed on the basis of existing equipment at National Institute of Drug Quality Control (NIDQC). The sample processing method is simple, quick with the use of nitric acid 1% as the soluble medium. The analysis total of silver was performed by atomic absorption spectrometry using a gas atomization technique using a cathode-ray tube at 328.1 nm. The process has been optimized, evaluated for system suitability, linearity, repeatability, accuracy on silver nanoparticles with good results, suitable for initial application. The study is used to determine the silver content of some silver nanoparticles. The procedure was applied to examine the silver content of the two 1000 ppm silver nanoparticles and two 5 ppm silver nanoparticles prepared at the R & D department of NIDQC. Results showed that all four samples had satisfactory silver content.

(Ngày nhận bài: 17/11/2017; Ngày phản biện: 14/12/2017; Ngày duyệt đăng: 20/12/2017)

NGHIÊN CỨU ĐỊNH LƯỢNG GABAPENTIN TRONG HUYẾT TƯƠNG NGƯỜI BẰNG PHƯƠNG PHÁP LC-MS/MS

TẠ MẠNH HÙNG, PHAN THỊ NGHĨA, HOÀNG VĂN ĐỨC
Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương

Từ khóa: Gabapentin, LC-MS/MS, định lượng, tương đương sinh học

1. Đặt vấn đề

Gabapentin ($C_9H_{17}NO_2$; KLPT: 171,24 g/mol) là thuốc chống động kinh và giảm đau do thần kinh. Ở mức liều khuyến nghị sử dụng 300 mg, nồng độ tối đa trong huyết tương người khoảng 2 $\mu\text{g/ml}$ [1]. Hiện nay, một số doanh nghiệp dược đã và đang nghiên cứu sản xuất các chế phẩm chứa gabapentin nên nhu cầu nghiên cứu tương đương sinh học là điều cần thiết và xuất phát từ thực tế. Dựa vào trang thiết bị hiện có và tham khảo một số phương pháp phân tích đã được các tác giả công bố [2],[3],[4] đồng thời dựa trên nguyên lý của phương pháp sắc ký lỏng - khối phổ, chúng tôi đã tiến hành nghiên cứu định lượng gabapentin trong huyết tương người bằng phương pháp LC-MS/MS.

2. Thực nghiệm

2.1. Nguyên vật liệu

- *Chất chuẩn của Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương:*

+ Gabapentin (GABA): Chuẩn phòng thí nghiệm, SKS: WS. 0106197, hàm lượng: 99,28%, độ ẩm: 0,08%.

+ Acyclovir: Chuẩn Dược điển Việt Nam, SKS: 0105137, hàm lượng: 98,87%, độ ẩm: 3,99%, được dùng làm chuẩn nội trong phương pháp phân tích.

- *Dung môi, hóa chất:* Acetonitril, acid formic đạt tiêu chuẩn tinh khiết dùng cho phân tích hoặc sắc ký.

- *Huyết tương trắng:* Không có GABA của Viện Huyết học và Truyền máu Trung ương.

2.2. Thiết bị và dụng cụ phân tích

2.2.1. Thiết bị

Các thiết bị được quản lý và hiệu chuẩn theo các quy định của ISO/IEC và GLP.

- Máy sắc ký lỏng khối phổ TSQ Quantum Vantage (Thermo Scientific - Mỹ);

- Cân phân tích Sartorius CP224S (Thụy Sĩ, độ chính xác $d = 0,1 \text{ mg}$);

- Tủ lạnh sâu $-35^\circ\text{C} \pm 5^\circ\text{C}$ (Sanyo - Nhật Bản);

- Máy ly tâm lạnh (Sigma 4-16K - Đức);

- Máy lọc nước...

2.2.2. *Dụng cụ:* Bình định mức, pipet loại A, ống ly tâm...

2.3. Điều kiện phân tích

2.3.1. Điều kiện sắc ký

- Cột sắc ký: C18; 150 x 4,6 mm; 5 μm . Nhiệt độ cột 40 $^\circ\text{C}$.

- Pha động: Acetonitril - acid formic 0,1% (tỷ lệ thích hợp).

- Tốc độ dòng: 0,2 ml/phút.

- Detector: TSQ Vantage.

- Thể tích tiêm: 10 μl .

- Nhiệt độ autosampler: 20 $^\circ\text{C}$.

2.3.2. Điều kiện khối phổ

Kiểu khối phổ hai lần (MS/MS), nguồn ion hóa ESI (+). Các thông số của thiết bị khối phổ để phát hiện GABA và acyclovir được trình bày ở bảng dưới:

Bảng 1. Các thông số của detector khối phổ dùng để định lượng GABA và acyclovir

<i>Chất phân tích</i> <i>Thông số</i>	<i>GABA</i>	<i>Acyclovir</i>
Chế độ ion	ESI (+)	ESI (+)
Thế ion hóa (V)	3500	3500
Áp suất khí mang (psi)	35	35
Áp suất khí hỗ trợ (psi)	5	5
Áp suất khí quét (psi)	2	2
Nhiệt độ mao quản ($^\circ\text{C}$)	360	360
Thế thấu kính hội tụ (V)	53	53
Năng lượng bắn phá (V)	17	14
Mảnh ion mẹ (Dalton)	$m/z = 172,3$	$m/z = 226,1$
Mảnh ion con (Dalton)	$m/z = 154,2$	$m/z = 152,1$

2.3.3. Phương pháp xử lý mẫu

Thêm 50 μl dung dịch chuẩn nội (nồng độ chính xác khoảng 1,25 $\mu\text{g/ml}$) vào 0,5 ml mẫu huyết tương (HT) đã đã đông ở nhiệt độ phòng. Thêm 2 ml acetonitril, lắc, ly tâm 6000 vòng/phút x 5 phút. Hút lớp dịch nổi, tiêm sắc ký.

2.3.4. Phương pháp tính kết quả

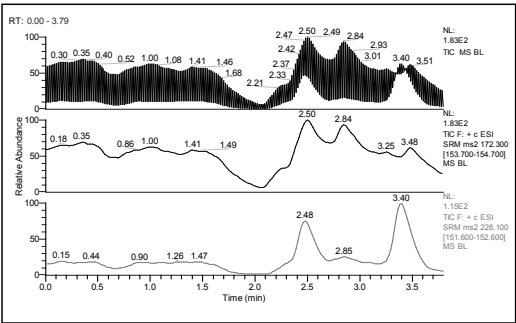
Xác định nồng độ GABA có trong các mẫu thử (chưa biết nồng độ) dựa vào tỷ lệ diện tích pic GABA/IS thu được từ sắc đồ của mẫu thử và đường chuẩn biểu thị mối tương quan giữa nồng độ GABA có trong các mẫu

chuẩn với tỷ lệ diện tích pic GABA/IS của mẫu chuẩn. Tiến hành thẩm định phương pháp phân tích theo quy định của US-FDA [5].

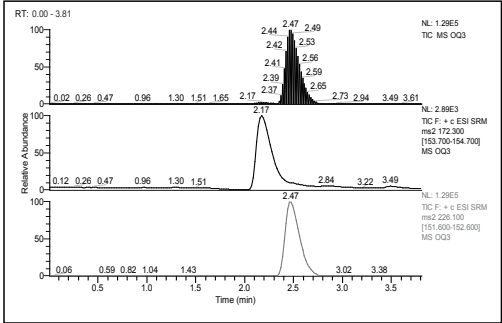
3. Kết quả và bàn luận

3.1. Độ đặc hiệu - chọn lọc của phương pháp

Phân tích các mẫu HT trắng, mẫu HT tự tạo chứa chuẩn nội và GABA nồng độ khoảng 50 ng/ml theo phương pháp đã xây dựng và ghi lại sắc ký đồ (Hình 1, 2).



Hình 1. SKĐ mẫu HT trắng



Hình 2. SKĐ mẫu HT trắng có IS và GABA nồng độ 50 ng/ml

Trên SKĐ của mẫu HT trắng (Hình 1), tại các thời điểm 2,17 và 2,47 phút (trùng với thời gian lưu của GABA và IS trong SKĐ của mẫu chuẩn - Hình 2) không xuất hiện các pic có các mảnh phổ khối m/z = 172→154 (GABA) và m/z = 226→152 (IS). Do vậy, phương pháp phân tích có độ đặc hiệu-chọn lọc với GABA và IS theo các quy định của phương pháp phân tích thuốc trong dịch sinh học [5].

3.2. Đường chuẩn và khoảng tuyến tính

Phân tích các mẫu HT chứa chuẩn nội và chuẩn GABA có nồng độ khoảng 50 ng/ml đến 5000 ng/ml theo quy trình đã xây dựng. Xác định sự tương quan giữa nồng độ GABA có trong mẫu và tỉ lệ diện tích pic GABA/IS thu được trên SKĐ bằng phương pháp hồi qui tuyến tính, sử dụng hệ số tỷ trọng 1/(nồng độ)².

Kết quả xác định mối tương quan này được trình bày ở Bảng 2.

Bảng 2. Kết quả thẩm định khoảng tuyến tính của phương pháp

Mẫu chuẩn	Độ đúng (%)				
Nồng độ (ng/ml)	Đường chuẩn 1	Đường chuẩn 2	Đường chuẩn 3	Đường chuẩn 4	Đường chuẩn 5
50,0	93,0	100,0	99,3	100,1	100,9
100,0	113,2	98,8	100,8	101,0	98,5
200,0	104,5	103,2	101,4	98,2	100,0
500,0	94,1	97,0	99,3	96,8	95,4
999,9	98,4	101,5	102,5	101,9	107,4
2499,9	99,0	97,8	101,1	100,2	99,5
3499,8	100,6	101,9	92,5	102,1	101,6
4999,7	97,2	99,8	103,2	99,7	96,8
Phương trình hồi quy * (y = a x + b)	y = 0,0005 x - 0,0093	y = 0,0005 x + 0,0008	y = 0,0005 x + 0,0021	y = 0,0005 x + 0,0029	y = 0,0005 x + 0,0006
Hệ số r	0,9972	0,9997	0,9993	0,9998	0,9991

(*) Ghi chú: x là nồng độ GABA (ng/ml) có trong mẫu; y là tỷ lệ diện tích pic GABA/IS

Kết quả thẩm định cho thấy trong khoảng nồng độ từ 50 ng/ml đến 5000 ng/ml có sự tương quan tuyến tính giữa nồng độ GABA và tỷ lệ diện tích pic GABA/IS với hệ số tương quan xấp xỉ bằng 1.

Nồng độ GABA xác định từ đường chuẩn so với nồng độ lý thuyết đều nằm trong giới hạn cho phép (80-120% đối với nồng độ thấp nhất, 85-115% đối với các nồng độ còn lại) theo quy định của phương pháp phân tích thuốc trong dịch sinh học [5].

3.3. Giới hạn định lượng dưới của phương pháp

Phân tích các mẫu HT trắng và mẫu HT chứa chuẩn nội và chuẩn GABA có nồng độ chính xác khoảng 50 ng/ml (mẫu LLOQ). Xác định nồng độ GABA có trong các mẫu LLOQ từ các đường chuẩn tiến hành làm song song trong cùng điều kiện.

Kết quả thẩm định giới hạn định lượng dưới của phương pháp được trình bày ở Bảng 3.

Bảng 3. Kết quả xác định giá trị LLOQ của phương pháp

STT	Mẫu trắng	Mẫu chuẩn (50 ng/ml)			
	Diện tích pic	Diện tích pic GABA	Diện tích pic IS	Nồng độ GABA tìm thấy (ng/ml)	Độ đúng (%)
1	0	27101	1183346	46,2	92,4
2	0	27668	1108753	50,4	100,9
3	0	28038	1128025	50,2	100,5
4	0	27122	1135072	48,3	96,5
5	0	26989	1251608	43,4	86,8
6	0	28204	1164184	48,9	97,9
TB	0	27520			95,8
CV (%)					5,6
Đáp ứng trung bình của mẫu trắng /LLOQ				0	

Kết quả thẩm định cho thấy trong các mẫu trắng không xuất hiện pic tạp có cùng thời gian lưu của pic GABA trong các mẫu LLOQ. Tỷ lệ giữa nồng độ GABA xác định từ đường chuẩn so với nồng độ lý thuyết có trong các mẫu LLOQ nằm trong khoảng 86,8% - 100,9% (trung bình = 95,8% và CV = 5,6%), đáp ứng yêu cầu giới hạn định lượng dưới của phương pháp phân tích thuốc trong dịch sinh học [5].

3.4. Xác định độ đúng, độ lặp lại của phương pháp

Tiến hành thẩm định độ đúng, độ lặp lại trên 4 lô mẫu LLOQ, LQC, MQC, HQC chứa GABA có nồng độ tương ứng là 50 ng/ml; 150 ng/ml; 2000 ng/ml, 4000 ng/ml. Xác định hàm lượng GABA có trong các mẫu bằng đường chuẩn phân tích trong cùng điều kiện. Độ đúng của phương pháp là tỷ lệ % giữa nồng độ xác định được so với nồng độ lý thuyết. Độ lặp lại của phương pháp được biểu thị bằng giá trị CV%. Kết quả xác định độ đúng, độ lặp lại của phương pháp được trình bày ở Bảng 4.

Bảng 4. Kết quả thẩm định độ đúng, độ lặp lại trong ngày và khác ngày

Độ đúng, độ lặp lại	LLOQ (≈ 50 ng/ml)		LQC (≈ 150 ng/ml)		MQC (≈ 2000 ng/ml)		HQC (≈ 4000 ng/ml)	
	Độ đúng (%)	CV (%)	Độ đúng (%)	CV (%)	Độ đúng (%)	CV (%)	Độ đúng (%)	CV (%)
Trong ngày	95,8	5,6	94,8	4,1	99,2	4,1	100,3	3,3
Khác ngày	96,1	6,1	100,2	6,6	98,1	5,0	98,0	3,7

Kết quả thẩm định cho thấy ở các nồng độ thấp, trung bình và cao, phương pháp có độ đúng trong ngày và khác ngày đều xấp xỉ 100%; độ lặp lại trong ngày và khác ngày với giá trị CV nhỏ hơn 10%.

3.5. Nghiên cứu độ ổn định của hoạt chất trong huyết tương

Tiến hành nghiên cứu độ ổn định của GABA trong HT trên các lô mẫu LQC và HQC. Đánh giá độ ổn định của GABA trong HT bằng cách so sánh nồng độ GABA có trong các mẫu được bảo quản và các mẫu có nồng độ tương ứng được phân tích ngay sau khi hòa tan chuẩn GABA vào HT trắng. Kết quả nghiên cứu độ ổn định của GABA được trình bày trong Bảng 5.

Bảng 5. Kết quả nghiên cứu độ ổn định của GABA trong huyết tương

Độ ổn định	Mẫu	Nồng độ ban đầu (ng/ml; n = 5)	Nồng độ sau bảo quản (ng/ml; n = 5)	% Sai khác
3 chu kì đông - rã	LQC	143,6	145,0	0,9%
	HQC	3847,8	3660,3	- 4,9%
Độ ổn định thời gian ngắn (4 giờ, nhiệt độ phòng)	LQC	143,6	146,8	2,2%
	HQC	3847,8	3838,2	- 0,2%
Độ ổn định trong autosampler (18 giờ/20 °C)	LQC	141,1	149,8	6,2%
	HQC	3979,0	4205,5	5,7%
Độ ổn định dài ngày (- 35 °C ± 5 °C, 63 ngày)	LQC	143,6	150,2	4,6%
	HQC	3847,8	3996,3	3,9%

4. Kết luận

Nghiên cứu đã xây dựng được phương pháp định lượng Gabapentin trong huyết tương người bằng phương pháp LC-MS/MS. Kết quả thẩm định cho thấy, phương pháp có giá trị giới hạn định lượng dưới nhỏ (50 ng/ml); khoảng tuyến tính rộng (từ 50 ng/ml đến 5000 ng/ml); độ đúng dao động trong khoảng 94,8%-100,3%; độ lặp lại với giá trị CV% nhỏ (3,3% - 6,6%), thời gian phân tích ngắn (4,0 phút cho mỗi mẫu), đáp ứng yêu cầu đối với phương pháp phân tích thuốc trong dịch sinh học của US-FDA và EMA. Phương pháp đã xây dựng có thể ứng dụng trong các nghiên cứu đánh giá tương đương sinh học đối với chế phẩm chứa hoạt chất Gabapentin.

Tài liệu tham khảo

1. Bộ Y tế (2015), *Dược thư quốc gia Việt Nam*, Lần xuất bản thứ 2, Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật, trang 705-706.
2. Ji HY, Jeong DW, Kim YH, Kim HH, Yoon YS, Lee KC, Lee HS (2006), “Determination of gabapentin in human plasma using hydrophilic interaction liquid chromatography with tandem mass spectrometry”. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, Volume 20, Issue 14, pp. 2127-2132.
3. Triporn Wattananat, Wiyada Akarawut (2009), “Validated LC-MS-MS Method for the Determination of Gabapentin in Human Plasma: Application to a Bioequivalence Study”. *Journal of Chromatography Science*, Volume 47, Issue 10, pp. 868-871.
4. Das Binaya (2013), “Estimation of Gabapentin in human plasma using LC-MS/MS method”. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, Vol. 6, Suppl 3.
5. U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration (2013): *Guidance for Industry - Bioanalytical Method Validation*.

SUMMARY

A high throughput and specific method using ultra performance liquid chromatography tandem mass spectrometry was developed for determination of Gabapentin in human plasma. The Gabapentin and IS were precipitated from human plasma by acetonitrile. Analytes were chromatographed on a C18 column (150 x 4.6 mm; 5 µm) with isocratic elution using detector TSQ Vantage. The mobile phase consists of Acetonitrile and Formic acid solution with suitable ratio. The assay was linear over the concentration range of 50 - 5000 ng/ml. The LLOQ was 50 ng/ml. The intra-day and inter-day accuracy were within 94.8% - 100.3%. This method can be used for BE studies of Gabapentin preparations.

(Ngày nhận bài: 27/11/2017 ; Ngày phản biện: 23/3/2018 ; Ngày duyệt đăng: 05/4/2018)

XÂY DỰNG PHƯƠNG PHÁP ĐỊNH TÍNH, ĐỊNH LƯỢNG TẠP CHẤT B CỦA TERAZOSIN

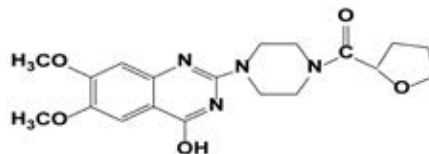
ĐỖ THỊ THANH THỦY, NGUYỄN HẢI NAM
Trường Đại học Dược Hà Nội

PHẠM VĂN QUANG, ĐOÀN CAO SON
Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương

Từ khóa: Tạp chất B, terazosin, định tính tạp B, định lượng tạp B

1. Đặt vấn đề

Terazosin là chất ức chế α 1-adrenergic thuộc nhóm -zosin thường được chỉ định điều trị phì đại lành tính tiền liệt tuyến đặc biệt là những trường hợp có kèm theo tăng huyết áp [2],[5],[8],[9]. Để kiểm tra chất lượng nguyên liệu và thành phẩm terazosin theo một số được điển [3],[4],[6],[7], cần phải sử dụng đến tạp chuẩn B của terazosin (IBT: 1-(4-hydroxy-6,7-dimethoxy-2-quinazolinyl)-4-[(tetrahydro-2-furanyl) carbonyl] piperazin, Hình 1) nhưng tạp chuẩn này không có sẵn trong nước mà phải đặt mua của nước ngoài với giá thành cao. Nhóm nghiên cứu là những người đầu tiên ở Việt nam đã nghiên cứu tổng hợp thành công nguyên liệu IBT để thiết lập tạp chuẩn IBT dùng trong kiểm nghiệm [1]. Để đánh giá chất lượng nguyên liệu tổng hợp được, chúng tôi cần có phương pháp định tính và định lượng IBT. Một số tài liệu đã tham khảo ([4],[7]) mới chỉ đưa ra phương pháp xác định giới hạn tạp IBT có trong nguyên liệu và thành phẩm terazosin bằng HPLC ở mức nồng độ rất thấp chứ không có phương pháp định tính, định lượng IBT. Vì vậy, việc nghiên cứu đưa ra phương pháp định tính và định lượng IBT đã tính chế sau tổng hợp là cần thiết khi thiết lập tạp chuẩn IBT mà chúng tôi nghiên cứu đã tổng hợp được. Trong đó, phương pháp định tính bằng TLC chưa được công bố trong bất cứ tài liệu nào và là một trong số các phương pháp định tính chúng tôi xây dựng cho tiêu chuẩn chất lượng tạp chất B của terazosin, còn phương pháp HPLC mà chúng tôi xây dựng trên cơ sở có tham khảo được điển nhưng đã khảo sát, lựa chọn các điều kiện phù hợp với phương pháp định lượng như: dung môi pha mẫu, nồng độ định lượng, bước sóng định lượng, tỷ lệ pha động... Đặc biệt là cả 2 phương pháp TLC và HPLC đều đã đánh giá độ đặc hiệu bằng cách đưa ra các yêu cầu đối với dung dịch phân giải chứa các chất dùng để tổng hợp IBT hoặc có thể sinh ra trong quá trình tổng hợp IBT để khẳng định tính đặc hiệu của phương pháp được xây dựng.



Hình 1. Công thức cấu tạo tạp chất B của terazosin theo USP

2. Thực nghiệm

2.1. Thiết bị, hoá chất, chất chuẩn, mẫu nghiên cứu

2.1.1. Thiết bị và dụng cụ

Đã được hiệu chuẩn theo ISO/IEC17025 và GLP.

- Máy sắc ký lỏng hiệu năng cao SHIMADZU diode array UV-VIS SPD-M20A (Nhật);
- Cân phân tích METTLER TOLEDO XPE26 có độ chính xác 0,001 mg (Thụy Sĩ);
- Máy lắc siêu âm ELMASONIC S180 H (Đức);
- Máy đo pH Metrohm 780 (Thụy Sĩ);
- Máy quang phổ UV-VIS Hitachi U-3900H (Nhật);
- Các dụng cụ thủy tinh cần thiết cho quá trình thực nghiệm.

2.1.2. Hoá chất và chất chuẩn

- Bân mỏng Silica gel 60 F 254 (Merck);
- Acetonitril dùng cho HPLC;
- Các hóa chất dung môi: Natri citrat, acid citric, acetonitril, cloroform, *n*-hexan, methanol, dung dịch amoniac 25% đạt tiêu chuẩn tinh khiết phân tích;
- Tạp chuẩn B của terazosin (IBT chuẩn) của USP, lô F0C218, hàm lượng 100,0%;
- Tạp chuẩn A của terazosin (IAT chuẩn) của USP, lô F0C245, hàm lượng 90,0%;
- Chất chuẩn terazosin của USP, lô G0F290, hàm lượng 91,9%.

2.1.3. Mẫu nghiên cứu

Sản phẩm IBT tổng hợp tại Việt Nam (Đây là sản phẩm chúng tôi thu được khi thực hiện đề tài “Nghiên cứu tổng hợp tạp chất B của terazosin và bước đầu đánh giá giới hạn tạp chất của sản phẩm” [1].

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Phương pháp TLC

Phương pháp sắc ký lớp mỏng (TLC), sử dụng bản mỏng silica gel 60 F₂₅₄ (Merck) với hệ dung môi khai triển gồm acetonitril, cloroform, *n*-hexan, methanol và dung dịch amoniac 25% , tỷ lệ 20:16:4:4:1. Phát hiện vết sắc ký bằng soi dưới đèn UV ở bước sóng 254 nm.

2.2.2. Phương pháp HPLC

* Điều kiện sắc ký:

- Cột sắc ký Supelco C8 (250 x 4,6 mm; 5 μ m), đặt ở nhiệt độ: 30 °C;

- Pha động là hỗn hợp của Acetonitril và dung dịch đệm citrat pH 3,2 (84 : 16); Cách pha dung dịch đệm citrat pH 3,2: Hòa tan 6,0 g natri citrat dihydrat và 14,25 g acid citric khan trong 950 ml nước, điều chỉnh tới pH 3,2 $\pm$ 0,1 bằng natri citrat hoặc acid citric nếu cần. Pha loãng với nước thành 1000 ml và lọc qua màng lọc 0,45 μ m);

- Tốc độ dòng 1,0 ml/phút;

- Detector UV đặt tại bước sóng 245 nm;

- Thể tích tiêm mẫu: 20 μ l

* Chuẩn bị các dung dịch tiêm sắc ký:

- Dung dịch tạp chuẩn IBT: Cân chính xác khoảng 5,000 mg tạp chuẩn IBT vào bình định mức dung tích 100 ml. Hòa tan và pha loãng bằng pha động vừa đủ đến vạch, lắc đều, lọc qua màng lọc 0,45 μ m.

- Dung dịch thử: Cân chính xác khoảng 5,000 mg chế phẩm IBT tổng hợp được vào bình định mức dung tích 100 ml. Hòa tan và pha loãng bằng pha động vừa đủ đến vạch, lắc đều, lọc qua màng lọc 0,45 μ m.

- Dung dịch phân giải: Dung dịch có chứa khoảng 15 μ g/ml tạp chuẩn IAT, 50 μ g/ml terazosin hydroclorid và 50 μ g/ml tạp chuẩn IBT trong pha động, lọc qua màng lọc 0,45 μ m.

* Yêu cầu của hệ thống sắc ký: Độ phân giải giữa 2 pic terazosin và tạp IAT không nhỏ hơn 10,0; độ phân giải giữa 2 pic terazosin và tạp IBT không nhỏ hơn 5,0. Số đĩa lý thuyết của tạp IBT không được nhỏ hơn 5000, hệ số đối xứng của pic tạp IBT không được lớn hơn 2,0 và độ lệch chuẩn tương đối của diện tích pic tạp IBT không được quá 2,0%.

3. Kết quả và bàn luận

3.1. Xây dựng và thẩm định phương pháp định tính IBT bằng TLC

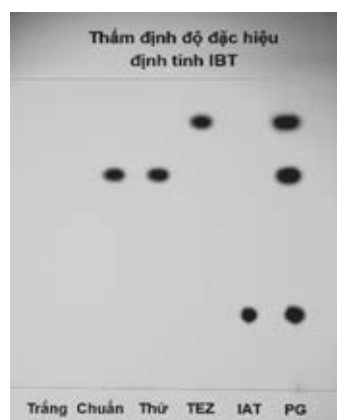
- Qua quá trình khảo sát, chúng tôi xây dựng phương pháp định tính IBT bằng TLC với các điều kiện sắc ký và cách phát hiện vết như đã nêu ở mục 2.2.1. Phương pháp TLC với các dung dịch chấm sắc ký pha trong

methanol gồm: dung dịch tạp chuẩn IBT nồng độ 1 mg/ml, dung dịch thử IBT nồng độ 1 mg/ml, dung dịch tạp chuẩn IAT nồng độ 1 mg/ml, dung dịch terazosin chuẩn nồng độ 0,5 mg/ml và dung dịch phân giải là hỗn hợp gồm tạp IAT, tạp IBT và terazosin nồng độ lần lượt là 1 mg/ml, 1 mg/ml và 0,5 mg/ml.

- Thẩm định độ đặc hiệu của phương pháp định tính bằng TLC:

Chấm riêng biệt 10 μ l mỗi dung dịch mẫu trắng (methanol), dung dịch tạp chuẩn IBT, dung dịch thử IBT, dung dịch terazosin chuẩn, dung dịch tạp chuẩn IAT và dung dịch phân giải lên bản mỏng rồi triển khai sắc ký.

Kết quả: Trên sắc ký đồ thu được, dung dịch mẫu trắng không cho vết sắc ký, dung dịch thử IBT cho vết có vị trí và màu sắc tương tự vết chuẩn IBT, dung dịch phân giải cho 3 vết tách khỏi nhau hoàn toàn trong đó 1 vết có vị trí và màu sắc tương tự vết IAT, 1 vết có vị trí và màu sắc tương tự vết IBT, 1 vết có vị trí và màu sắc tương tự vết terazosin. Như vậy phương pháp TLC để định tính IBT là đặc hiệu (Hình 2).



Hình 2. Sắc ký đồ thẩm định độ đặc hiệu của phương pháp định tính bằng TLC

3.2. Xây dựng và thẩm định phương pháp định tính IBT bằng HPLC

- Xét thời gian lưu của pic sắc ký: Dung dịch thử cho pic có thời gian lưu tương tự thời gian lưu của pic thu được từ dung dịch tạp chuẩn IBT .

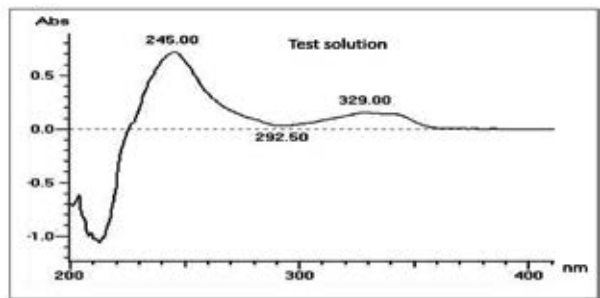
- Thẩm định độ đặc hiệu: Như phần thẩm định độ đặc hiệu của phương pháp định lượng.

3.3. Xây dựng và thẩm định phương pháp định lượng IBT bằng HPLC

3.3.1. Xây dựng phương pháp định lượng IBT

Tham khảo một số tài liệu [4],[7], chúng tôi xây dựng phương pháp định lượng IBT bằng HPLC như đã nêu ở mục 2.2.2 trong đó, bước sóng định lượng là bước sóng hấp thụ cực đại của IBT tại 245 nm được xác định

bằng cách quét phổ UV của dung dịch IBT trong pha động (Hình 3). Tính kết quả hàm lượng IBT trong mẫu thử dựa trên diện tích pic của dung dịch chuẩn và dung dịch thử, lượng cân, độ pha loãng của mẫu thử và mẫu chuẩn.



Hình 3. Phổ UV của dung dịch IBT

3.3.2. Thẩm định phương pháp định lượng IBT

3.3.2.1. Tính thích hợp của hệ thống sắc ký

Tiêm 6 lần dung dịch chuẩn IBT đã chuẩn bị ở mục 2.2.2 vào hệ thống HPLC và tiến hành sắc ký theo điều kiện đã chọn ở trên. Kết quả được trình bày ở Bảng 1.

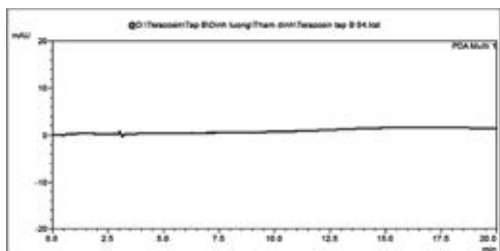
Bảng 1. Kết quả khảo sát tính thích hợp của hệ thống sắc ký

<i>TT</i>	<i>Thời gian lưu (phút)</i>	<i>Diện tích pic (mAU.s)</i>	<i>Số đĩa lý thuyết</i>	<i>Hệ số bất đối</i>
1	15,341	6168506	12572	1,304
2	15,347	6157885	12603	1,302
3	15,350	6170850	12636	1,304
4	15,345	6169083	12638	1,306
5	15,342	6163140	12632	1,306
6	15,340	6156656	12674	1,303
Trung bình	15,344	6164353	12626	
RSD (%)	0,03	0,10		

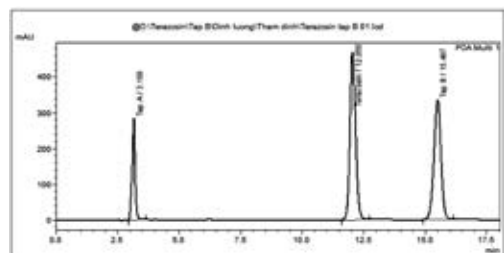
Kết quả khảo sát cho thấy độ lệch chuẩn tương đối (RSD) của thời gian lưu là 0,03% và của diện tích pic là 0,10% đều nhỏ hơn 2%; các giá trị của hệ số bất đối dao động từ 1,302 đến 1,306 thể hiện pic khá cân đối; số đĩa lý thuyết trung bình là 12626. Ngoài ra, kết quả đánh giá tính thích hợp của hệ thống sắc ký cũng được khẳng định qua hệ số phân giải của các pic sắc ký trong dung dịch phân giải ở phần thẩm định độ đặc hiệu, mục 3.3.2.2. Như vậy chứng tỏ rằng hệ thống HPLC mà chúng tôi khảo sát, lựa chọn là thích hợp để định tính, định lượng IBT tổng hợp được.

3.3.2.2. Độ đặc hiệu

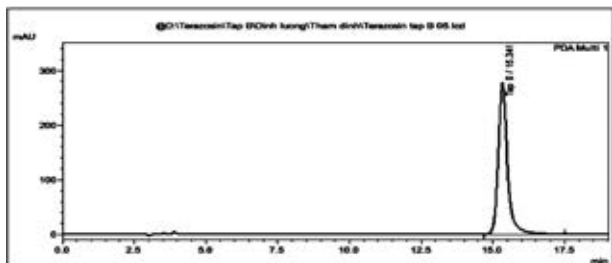
Tiến hành sắc ký dung dịch thử, dung dịch chuẩn, mẫu trắng và dung dịch phân giải theo phương pháp đã xây dựng ở trên. Kết quả cho thấy: Sắc ký đồ của dung dịch thử cho 1 pic với thời gian lưu (t_R = 15,614 phút) tương tự thời gian lưu của pic IBT ở sắc ký đồ của dung dịch chuẩn (t_R = 15,341 phút). Trên sắc ký đồ của mẫu trắng, không có pic nào xuất hiện ở khoảng thời gian lưu của pic IBT. Dung dịch phân giải cho các pic tách khỏi nhau hoàn toàn với hệ số phân giải của pic terazosin và pic tạp A là 26,60; hệ số phân giải giữa pic tạp IBT và terazosin là 7,05 (Hình 4). Ngoài ra, kết quả đánh giá độ tinh khiết của pic IBT trong dung dịch chuẩn là 0,998990 và dung dịch thử là 0,999888.



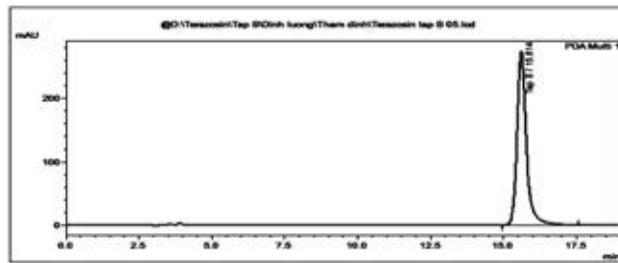
4a). Mẫu trắng



4b). Dung dịch phân giải



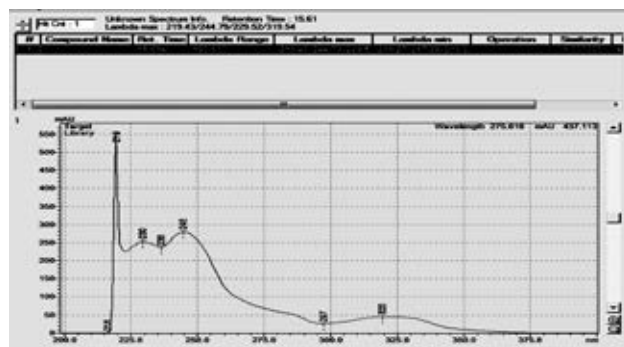
4c). Dung dịch chuẩn



4d). Dung dịch thử

Hình 4. Sắc ký đồ HPLC của mẫu trắng, dung dịch phân giải, dung dịch chuẩn và dung dịch thử

Tiến hành chồng phổ UV của pic tạp chuẩn IBT và pic thu được từ dung dịch thử, kết quả chỉ ra hệ số chồng phổ bằng 1,000000 (Hình 5).



Hình 5. Kết quả chồng phổ pic IBT chuẩn và pic thử

Kết quả thực nghiệm cho thấy phương pháp định lượng IBT đã xây dựng có độ đặc hiệu cao.

3.3.2.3. Độ lặp lại và độ chính xác trung gian

Độ lặp lại được xác định trên 6 lần cân riêng biệt mẫu thử, tiến hành theo các điều kiện sắc ký đã lựa chọn. Độ chính xác trung gian được tiến hành giống “Độ lặp lại” nhưng khác ngày, khác người phân tích, khác thiết bị và dùng cùng loại cột nhưng của hãng khác. Kết quả được trình bày ở Bảng 2.

Bảng 2. Kết quả xác định độ lặp lại và độ chính xác trung gian

TT	Cột: Supelco (C8, 250 x 4,6 mm, 5 μm) Máy HPLC: Shimadzu 20A Lượng cân chuẩn: 5,072 mg DT pic chuẩn: 6164353 mAU.s (n = 6, RSD = 0,10%)			Cột: Luna (C8, 250 x 4,6 mm, 5 μm) Máy HPLC: Agilent 1200 Lượng cân chuẩn 1: 4,945 mg DT pic chuẩn: 8518,14 mAU.s (n = 6, RSD = 0,09%)		
	Khối lượng (mg)	Diện tích pic (mAU.s)	Hàm lượng (%)	Khối lượng (mg)	Diện tích pic (mAU.s)	Hàm lượng (%)
1	5,061	6085549	98,94	5,070	8576,80	98,21
2	5,164	6213860	99,01	5,011	8482,09	98,27
3	5,168	6213864	98,93	4,994	8498,21	98,79
4	5,073	6109649	99,09	5,074	8598,97	98,38
5	4,850	5778010	98,02	4,943	8436,87	99,09
6	5,109	6139120	98,87	4,999	8487,54	98,56
Trung bình = 98,81%; n = 6; RSD = 0,40%				Trung bình: 98,55%; n = 6; RSD = 0,34%		
Trung bình = 98,68%; n = 12; RSD = 0,38%						

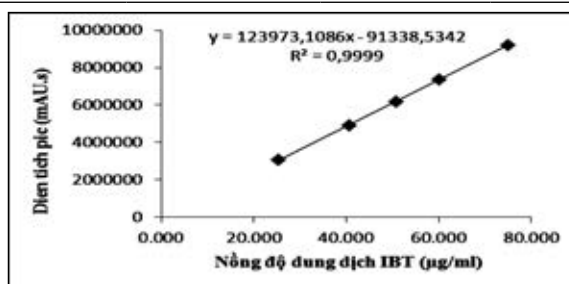
Kết quả thực nghiệm cho thấy với phương pháp định lượng bằng HPLC đã xây dựng có độ lặp lại và độ chính xác trung gian phù hợp với yêu cầu.

3.3.2.4. Độ tuyến tính

Chuẩn bị một dãy chuẩn IBT pha trong pha động có nồng độ biến thiên trong khoảng từ 25,36 µg/ml đến 75,04 µg/ml (từ 50 đến 150% nồng độ định lượng). Tiến hành sắc ký theo điều kiện đã lựa chọn. Ghi các giá trị diện tích pic đo được tương ứng với các giá trị nồng độ trên. Kết quả khảo sát khoảng tuyến tính được trình bày ở Bảng 3 và Hình 6.

Bảng 3. Kết quả khảo sát khoảng tuyến tính

Dung dịch chuẩn IBT	1	2	3	4	5
Nồng độ (µg/ml)	25,360	40,576	50,720	60,032	75,040
Diện tích pic (mAU.s)	3073138	4915519	6168118	7383120	9210915
Phương trình hồi qui	$y = 123973,1086x - 91338,5342$				
Hệ số tương quan	$r = 0,99995$				



Hình 6. Đồ thị biểu diễn sự phụ thuộc giữa nồng độ và diện tích pic IBT

Kết quả khảo sát cho thấy trong khoảng nồng độ IBT từ 25,36 đến 75,04 µg/ml (khoảng 50 đến 150% so với nồng độ định lượng), có sự tương quan tuyến tính chặt chẽ giữa nồng độ và diện tích pic với hệ số tương quan $r = 0,99995$.

3.3.2.5. Độ đúng

Chuẩn bị các dung dịch thử có nồng độ khoảng 80%, 100% và 120% so với nồng độ định lượng pha từ tạp chuẩn IBT của USP đã biết hàm lượng. Mỗi mức nồng độ chuẩn bị 3 dung dịch thử. Tiến hành định lượng các mẫu thử theo các điều kiện sắc ký đã lựa chọn. Tính lượng IBT tìm lại trong các mẫu thử, bằng cách so với dung dịch chuẩn ở phần đánh giá tính thích hợp của hệ thống sắc ký, từ đó tính ra % tìm lại IBT so với lượng IBT theo lý thuyết. Kết quả khảo sát độ đúng của phương pháp được trình bày ở Bảng 4.

Bảng 4. Kết quả khảo sát độ đúng của phương pháp

TT	Mẫu	Lượng chuẩn IBT theo lý thuyết (mg)	Lượng IBT tìm lại (mg)	% Tìm lại
1	Thử 1	4,012	4,090	101,94
2	Thử 2	3,998	4,020	100,56
3	Thử 3	4,022	4,044	100,54
4	Thử 4	5,015	5,049	100,68
5	Thử 5	5,009	5,056	100,93
6	Thử 6	4,900	4,803	98,02
7	Thử 7	6,001	6,023	100,37
8	Thử 8	6,061	6,180	101,96
9	Thử 9	5,852	5,746	98,19

Kết quả khảo sát độ đúng cho thấy khả năng tìm lại từ 98,02% đến 101,96% nằm trong khoảng từ 98% đến 102%. Vậy phương pháp đạt yêu cầu về độ đúng trong khoảng khảo sát.

3.3.2.6. Độ ổn định của dung dịch phân tích

Phân tích dung dịch chuẩn IBT và dung dịch thử IBT có nồng độ 50 µg/ml trong khoảng thời gian từ 0 đến 24 giờ, bảo quản mẫu phân tích ở nhiệt độ phòng thí nghiệm. Kết quả RSD của thời gian lưu lần lượt là 0,12% và 0,14%, RSD của diện tích pic là 0,14% (Bảng 5). Như vậy, các dung dịch phân tích ổn định trong vòng 24 giờ.

Bảng 5. Số liệu độ ổn định của dung dịch phân tích

Thời gian (giờ)	Dung dịch chuẩn		Dung dịch thử	
	<i>Thời gian lưu (phút)</i>	<i>Diện tích pic (mAU.s)</i>	<i>Thời gian lưu (phút)</i>	<i>Diện tích pic (mAU.s)</i>
0	16,34	6353019	16,18	6414353
1	16,37	6352449	16,25	6397687
2	16,39	6363517	16,22	6416327
6	16,40	6350336	16,23	6421927
12	16,39	6357133	16,21	6405054
24	16,38	6336412	16,23	6414321
TB	16,38	6352144	16,22	6411612
RSD (%)	0,12	0,14	0,14	0,14

4. Kết luận

Các kết quả thực nghiệm cho thấy phương pháp định tính bằng TLC và HPLC có độ đặc hiệu cao. Phương pháp HPLC để định lượng nguyên liệu IBT có độ đặc hiệu, độ chính xác và độ đúng cao, có sự tương quan tuyến tính chặt chẽ giữa nồng độ và diện tích pic trong khoảng nồng độ khảo sát. Các phương pháp định tính, định lượng tiến hành đơn giản và có thể thực hiện được ở hầu hết các phòng thí nghiệm.

Tài liệu tham khảo

1. Đỗ Thị Thanh Thủy, Phạm Văn Quang, Nguyễn Hải Nam, Đoàn Cao Sơn (2017), “Nghiên cứu tổng hợp tạp chất B của terazosin và bước đầu đánh giá giới hạn tạp chất của sản phẩm”, *Tạp chí dược học*, số 500, tr.40-43.
2. Abraham D. J., (2003), *Burger's medicinal chemistry drug discovery*, 6, pp.15-16.
3. Council of Europe (2008), *European pharmacopoeia 6.0*, vol.2
4. Korean pharmacopoeia X (2012), vol. 1, pp. 1140-1143.
5. Sharma R., Ahuja V. M. (2004), “Effect of alpha-1 adrenergic receptor antagonist, terazosin, on cardiovascular functions in anaesthetized dogs”, *Indian journal of experimental Biology*, 42, pp.1195-1199.
6. The British medicines commission (2014), *British pharmacopoeia*, vol. 2, pp. 982-985.
7. The United States Pharmacopoeial Convention (2014), *USP 37*, vol. 3, pp. 4871-4874.
8. Wilt T. J., Howe R. W., Rutks I. R., et al., (2002), “Terazosin improves urologic symptoms in benign prostatic hyperplasia”, *ACP journal club*, 138(3), p.74.
9. Zheng M., Zeng M., Jiang C., et al. (2014), “Plasma kinetic resection of prostate combined terazosin for treatment of BPH patient with coexisting hypertension”, *Open Journal of Urology*, 4, pp.57-62.

SUMMARY

A TLC and an HPLC method were proposed to identify and assay IBT. The TLC method using silica gel 60 F254 and a mixture of acetonitrile, chloroform, n-hexane, Methanol and solution of 25% of Ammoniac at rate 20:16:4:4:1 was used as the mobile phase. The HPLC method with the chromatographic conditions as follows: A new Supelco/Luna column (250 x 4.6 mm; 5.0 μ m) packed with Octylsilyl Silica gel for chromatography was used as stationary phase, the column temperature was maintained at about 30 °C, a mixture of 16 volumes of acetonitrile and 84 volumes of citrate buffer solution pH 3.2 was used as the mobile phase with a flow rate of 1.0 ml per minute, a detection wavelength of 245 nm, injection volume is 20 μ l. The experimental results proved that the proposed TLC is specific, the HPLC method is rapid, specific, precise, accurate and at the concentration range from 50 to 150% of assay concentration (25.36 to 75.04 μ g/ml) the data of peak area versus concentration of IBT was treated by linear regression analysis.

(Ngày nhận bài: 14/11/2017 ; Ngày phản biện: 28/2/2018 ; Ngày duyệt đăng: 05/4/2018)

ĐÁNH GIÁ ĐỘC TÍNH CẤP VÀ BÁN TRƯỜNG DIỄN CỦA VIÊN KHỚP TÂM BÌNH TRÊN ĐỘNG VẬT THÍ NGHIỆM

NGUYỄN THỊ LIÊN, NGUYỄN THỊ HẰNG
Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương

Từ khóa: Độc tính cấp, độc tính bán trường diễn, viên khớp Tâm Bình, động vật thí nghiệm

1. Đặt vấn đề

Với khí hậu nhiệt đới gió mùa, địa lý, địa hình và đất đai thuận lợi nên nguồn tài nguyên thực vật nói chung, nguồn tài nguyên dược liệu nói riêng ở Việt Nam rất phong phú và đa dạng. Đó là một điều kiện thuận lợi cho các công ty dược phẩm trong nước sử dụng để sản xuất thuốc cũng như các sản phẩm hỗ trợ điều trị có nguồn gốc từ thảo dược. Tuy nhiên phần lớn các thuốc và sản phẩm hỗ trợ điều trị có nguồn gốc thảo dược trên thị trường hiện nay đều chưa được thử nghiệm, hoặc thử nghiệm chưa đầy đủ về tác dụng, đặc biệt là tính an toàn, trong đó thử nghiệm độc tính cấp và độc tính bán trường diễn là những chỉ tiêu căn bản cần đánh giá. Trong nghiên cứu này chúng tôi tiến hành đánh giá độc tính cấp và độc tính bán trường diễn của sản phẩm có nguồn gốc dược liệu được phân phối rộng rãi trên thị trường đó là thực phẩm chức năng “Viên khớp Tâm Bình” do Công ty TNHH SX & TM Dược phẩm Tâm Bình sản xuất.

2. Thực nghiệm

2.1. Thiết bị, dụng cụ, hóa chất

Các thiết bị đã được hiệu chuẩn theo ISO/IEC 17025 và GLP.

- Máy xét nghiệm sinh hóa (Beckman Coulter AU 680, Mỹ);
- Máy xét nghiệm huyết học (Sysmex XS-1000I, Nhật Bản);

- Máy li tâm lạnh (Eppendorf 5804 R, Đức);
- Máy cắt vi thể Microm HM315, Đức;
- Kính hiển vi quang học gắn camera kết nối máy tính (Nikon, Nhật Bản);
- Kim cong cho uống;
- Xy lanh, găng cao su, cốc thủy tinh, chày cối sứ;
- Bộ kit định lượng các chỉ số huyết học và sinh hóa (của Stromatolyser và Beckman Coulter);
- Các hóa chất khác.

2.2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Động vật thí nghiệm

Chuột nhắt trắng giống Swiss, cả 2 giống, trọng lượng 18 - 20 g, đạt tiêu chuẩn thí nghiệm do Trung tâm Chăn nuôi động vật thí nghiệm CIMAD - Viện Vệ sinh Dịch tễ Trung ương cung cấp.

Thỏ khỏe mạnh, cả 2 giống, cân nặng 2,0 - 2,5 kg, đạt tiêu chuẩn thí nghiệm do Khoa Dược lý - Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương cung cấp.

Tất cả các quy trình thực hiện trên động vật thí nghiệm đều được chuẩn hóa theo các quy định của GLP và ISO/IEC 17025 và tuân thủ các quy định đạo đức trong nghiên cứu y sinh học.

2.2.2. Đối tượng nghiên cứu

Thực phẩm chức năng “Viên khớp Tâm Bình” do Công ty TNHH SX & TM Dược phẩm Tâm Bình sản

xuất, thành phần: Đường quy, Đỗ trọng, Tục đoạn, Câu tích, Độc hoạt, Ba kích, Ngưu tất, cao Quy bản, Thương truật, Mã tiền chế, phụ liệu khác.

Lô sản xuất: 02012016; ngày sản xuất: 02/01/2016; hạn dùng: 02/12/2019

2.2.3. Phương pháp nghiên cứu.

2.2.3.1. Thử độc tính cấp [1]

Chuột nhắt trắng được nuôi trong điều kiện chuồng thoáng mát, đảm bảo vệ sinh, chế độ ăn uống theo nhu cầu của chuột. Chuột được nhịn ăn 15 giờ trước khi thí nghiệm, nước uống theo nhu cầu. Kiểm tra cân nặng trước khi thử nghiệm. Chuột đạt các yêu cầu về cân nặng được đưa vào thử nghiệm.

Đường dùng thuốc: đường uống. Cho chuột uống bằng cách dùng bơm tiêm kim cong đầu tù để đưa thẳng thuốc vào dạ dày chuột.

Mẫu thử: Cân chính xác một lượng bột thuốc trong nang. Nghiền kỹ trong cối sứ, cho nước cất từ từ vào, khuấy trộn thành hỗn dịch đồng nhất, sau đó thêm nước vừa đủ để thu được hỗn dịch chứa 0,4 g mẫu thử/ml nước (hỗn dịch thử).

Chia chuột nhắt trắng thành các lô, mỗi lô 10 con. Tiến hành thử nghiệm sơ bộ xác định mức liều LD_0 (không làm chết chuột) và LD_{100} (làm chết 100% số chuột thí nghiệm). Thử nghiệm chính thức được tiến hành trên 5 nhóm chuột với 3 liều trung gian giữa các liều LD_0 và LD_{100} . Tính liều LD_{50} theo phương pháp Behrens [2].

Theo dõi biểu hiện của chuột sau khi uống trong 24 giờ đầu và theo dõi hoạt động của chuột trong thời gian 7 ngày sau khi uống.

2.2.3.2. Thử độc tính bán trường diễn [4],[5]

Nghiên cứu độc tính bán trường diễn được tiến hành trên 3 nhóm thỏ gồm 1 nhóm chứng và 2 nhóm thử, mỗi nhóm 7 con.

Hai nhóm thử được cho uống mẫu thử với liều 0,372 viên/kg thỏ (5 ml hỗn dịch B/kg thỏ) và liều 1,116 viên/kg thỏ (5 ml hỗn dịch A/kg thỏ). Thời gian uống liên tục 28 ngày.

Mẫu thử: Chuẩn bị 2 hỗn dịch có nồng độ khác nhau. Hỗn dịch A: Nghiền 37 viên khớp Tâm Bình với nước để thu được 166 ml hỗn dịch có nồng độ 0,223 viên/ml. Hỗn dịch B: Lấy 40 ml hỗn dịch A thêm 80 ml nước để thu được hỗn dịch có nồng độ 0,074 viên/ml.

Nhóm chứng: Dùng để tham chiếu, cho uống nước cất hàng ngày.

Thỏ được nuôi trong cùng điều kiện môi trường và cùng chế độ dinh dưỡng cân bằng, được cho ăn và uống nước đầy đủ trong suốt quá trình thử nghiệm.

Theo dõi thỏ hàng ngày về mức độ tiêu thụ thức ăn, khả năng hoạt động, tình trạng phân, lông. Trước thí nghiệm, xác định cân nặng của thỏ, các dấu hiệu toàn thân, lấy máu xét nghiệm đánh giá các chỉ số huyết học (số lượng hồng cầu, bạch cầu, tiểu cầu, hemoglobin, hematocrit), các chỉ số sinh hóa (GOT, GPT, creatinin, urea, protein toàn phần). Theo dõi cân nặng của thỏ hàng tuần. Sau 14 và 28 ngày uống thuốc lấy máu để làm các xét nghiệm như trên. So sánh kết quả của nhóm thử và nhóm chứng theo phương pháp thống kê. Quan sát đại thể và vi thể một số tổ chức (gan và thận) của thỏ sau khi kết thúc thí nghiệm.

3. Kết quả và bàn luận

3.1. Độc tính cấp

Trước tiên chúng tôi tiến hành nghiên cứu sơ bộ để tìm mức liều không làm chết chuột thí nghiệm và mức liều làm chết 100% số chuột thí nghiệm. Qua thử nghiệm này, chúng tôi đã tìm được liều không gây chết chuột là 4,0 g mẫu thử/kg chuột, liều gây chết 100% số chuột thử nghiệm là 12,0 g mẫu thử/kg chuột

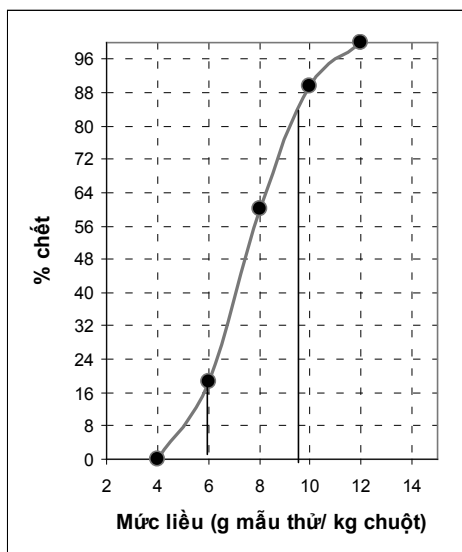
Tiếp đó ở thử nghiệm chính thức, chúng tôi cho chuột uống với 5 mức liều tăng dần như ở Bảng 1.

Bảng 1. Số liệu thử độc tính cấp của viên khớp Tâm Bình

Mức liều	Liều thử (g mẫu thử/kg chuột)	Số chuột chết/ sống thực tế	Số chuột chết/ sống kỳ vọng	% Chết
1	4,0	0/10	0/23	0
2	6,0	3/7	3/13	18,75
3	8,0	6/4	9/6	60,00
4	10,0	8/2	17/2	89,47
5	12,0	10/0	27/0	100

Sau khi uống thuốc, chuột có các biểu hiện ngộ độc tùy theo mức liều uống. Ở mức liều thấp (4,0 g/kg chuột) không nhận thấy có biểu hiện ngộ độc, ở mức liều trong khoảng từ 6,0 g đến 12,0 g mẫu thử/kg chuột, chuột có biểu hiện tăng hoạt động, số chuột chết có biểu hiện co giật. Số chuột không chết ở các mức liều trên có biểu hiện giảm hoạt động, mệt mỏi. Sau 24 giờ, số chuột không chết ăn uống hoạt động bình thường trở lại.

Đồ thị số liệu độc tính cấp thực nghiệm của viên khớp Tâm Bình được trình bày ở Hình 1.



Hình 1. Đồ thị số liệu độc tính cấp

LD_{50} được tính theo phương pháp Behrens [2] theo công thức:

$$LD_{50} = A + (50 - a) \times d / (b - a)$$

Trong đó: A : Liều gây chết a % ĐVTN

a : % ĐVTN chết sát dưới 50% sao cho $a < 50\%$

b : % ĐVTN chết sát trên 50% sao cho $b > 50\%$

d : khoảng cách giữa các liều (g)

Dựa trên bảng số liệu ta có:

$$a = 18,75\%$$

$$b = 60,00\%$$

$$A = 6,0 \text{ (g/kg chuột)} \quad d = 2,0 \text{ (g/kg chuột)}$$

Như vậy:

$$LD_{50} = 6,0 + (50 - 18,75) \times 2,0 / (60,0 - 18,75)$$

$$LD_{50} = 7,515 \text{ g mẫu thử/kg chuột.}$$

Tiếp đó chúng tôi tính sai số chuẩn theo công thức $(Es_{LD50})^2 = ksd/n$

Trong đó: k : Hệ số Behrens = 0,66

n : Số chuột trong mỗi nhóm,

s : Phân phối chuẩn có giá trị bằng $(LD_{84} - LD_{16})/2$

Với LD_{84} và LD_{16} là các mức liều gây chết 84% và 16% động vật thí nghiệm trên đồ thị số liệu độc tính cấp.

Theo đồ thị, ta có: $LD_{16} = 5,8$ g mẫu thử/kg chuột, $LD_{84} = 9,5$ g mẫu thử/kg chuột.

Giá trị $s = (9,5 - 5,8)/2 = 1,85$ g mẫu thử/kg chuột.

Sai số chuẩn: $(Es_{LD50})^2 = ksd/n = 0,66 \times 1,85 \times 2,0/10$ nên $S_{LD50} = 0,494$ g mẫu thử/kg chuột

Vậy $LD_{50} = (7,515 \pm 0,494)$ g mẫu thử/kg chuột.

3.2. Độc tính bán trường diễn

Trước tiên chúng tôi lựa chọn mức liều thử nghiệm cho nghiên cứu thử độc tính bán trường diễn của sản phẩm viên khớp Tâm Bình. Dựa trên liều sử dụng tối đa trên người của sản phẩm là 6 viên/người/ngày và sử dụng hệ số chuyển đổi liều giữa thỏ và người là 3,1 [5] chúng tôi đã lựa chọn 2 mức liều thử nghiệm cho nghiên cứu là 0,372 viên/kg thỏ (tương ứng với mức liều dự kiến cho người là 6 viên/người 50 kg/ngày) và 1,116 viên/kg thỏ (cao gấp 3 lần liều dự kiến cho người).

3.2.1. Kết quả theo dõi cân nặng thỏ

Trong thời gian thí nghiệm, tất cả thỏ ở nhóm chứng hoạt động bình thường, ăn uống tốt, phân khô, lông mượt. Không có hiện tượng rụng lông hoặc lông bị khô cứng. Kết quả theo dõi cân nặng được trình bày ở Bảng 2. Thỏ tăng cân ở nhóm chứng và hai nhóm thử, có sự khác biệt khi so sánh với trước thử nghiệm trong mỗi nhóm ($p < 0,05$). Trước thử nghiệm và sau thử nghiệm cân nặng trung bình của thỏ ở các nhóm thử không có sự khác biệt so với nhóm chứng ($P_{\text{trước}} (T1-C)$ và $P_{\text{trước}} (T2-C) > 0,05$), ($P_{\text{sau}} (T1-C)$ và $P_{\text{sau}} (T2-C) > 0,05$).

Bảng 2. Số liệu cân nặng thỏ (Trung bình $\pm$ SD)

Nhóm (n = 7)	Kết quả cân nặng (kg)					P
	Trước TN (m_0)	Sau 1 tuần (m_1)	Sau 2 tuần (m_2)	Sau 3 tuần (m_3)	Sau 4 tuần (m_4)	
Chứng (C)	2,12 $\pm$ 0,27	2,23 $\pm$ 0,22	2,29 $\pm$ 0,19	2,36 $\pm$ 0,12	2,40 $\pm$ 0,13	$P_{\text{trước-sau}} = 0,014$
% so với trước thử nghiệm		105,8%	108,8%	112,7%	114,8%	
Thử 1 (T1)	2,10 $\pm$ 0,10	2,19 $\pm$ 0,09	2,23 $\pm$ 0,17	2,33 $\pm$ 0,13	2,43 $\pm$ 0,12	$P_{\text{trước-sau}} = 0,000$ $P_{\text{trước (T1-C)}} = 0,871$ $P_{\text{sau (T1-C)}} = 0,714$
% so với trước thử nghiệm		104,7%	106,4%	111,2%	115,8%	
Thử 2 (T2)	2,14 $\pm$ 0,14	2,29 $\pm$ 0,08	2,41 $\pm$ 0,13	2,46 $\pm$ 0,13	2,53 $\pm$ 0,14	$P_{\text{trước-sau}} = 0,000$ $P_{\text{trước (T2-C)}} = 0,866$ $P_{\text{sau (T2-C)}} = 0,094$
% so với trước thử nghiệm		107,6%	112,9%	115,2%	118,8%	

3.2.2. Kết quả theo dõi các chỉ số huyết học

Trước, giữa và sau khi thử nghiệm, thỏ được kiểm tra các chỉ số về huyết học, số liệu được trình bày ở Bảng 3. Kết quả so sánh thống kê theo t-test cho thấy: trước, giữa và sau thí nghiệm không có sự khác biệt có ý nghĩa giữa nhóm chứng và 2 nhóm thí nghiệm ($P_{C-T \text{ trước}} > 0,05$; $P_{C-T \text{ giữa}} > 0,05$; $P_{C-T \text{ sau}} > 0,05$) (Bảng 4).

Bảng 3. Kết quả theo dõi các chỉ số huyết học thỏ của các nhóm thử nghiệm (Trung bình $\pm$ SD)

Nhóm \ Chỉ số		Hồng cầu ($\times 10^{12}/\text{lít}$)	Bạch cầu ($\times 10^9/\text{lít}$)	Tiểu cầu ($\times 10^9/\text{lít}$)	Hematocrit (%)	Hemoglobin (g/dl)
Chứng (n = 7)	Trước TN	5,5 $\pm$ 0,8	9,0 $\pm$ 2,1	462,7 $\pm$ 145,5	37,8 $\pm$ 5,4	11,3 $\pm$ 1,6
	Giữa TN	5,6 $\pm$ 0,4	10,6 $\pm$ 1,0	419,9 $\pm$ 69,2	39,6 $\pm$ 2,0	11,6 $\pm$ 0,9
	Sau TN	6,1 $\pm$ 0,4	9,6 $\pm$ 2,2	420,7 $\pm$ 50,3	42,1 $\pm$ 1,6	12,7 $\pm$ 0,6
Thử 1 (n = 7)	Trước TN	5,3 $\pm$ 0,8	8,7 $\pm$ 0,8	555,1 $\pm$ 101,9	38,4 $\pm$ 3,1	11,6 $\pm$ 1,0
	Giữa TN	5,7 $\pm$ 0,5	9,6 $\pm$ 1,3	460,9 $\pm$ 89,6	38,3 $\pm$ 2,7	11,5 $\pm$ 0,9
	Sau TN	5,7 $\pm$ 0,5	10,6 $\pm$ 0,8	530,3 $\pm$ 130,8	40,0 $\pm$ 7,7	12,2 $\pm$ 0,7
Thử 2 (n = 7)	Trước TN	5,4 $\pm$ 0,4	9,0 $\pm$ 2,9	559,0 $\pm$ 168,4	36,3 $\pm$ 2,0	11,0 $\pm$ 0,6
	Giữa TN	6,0 $\pm$ 0,9	9,4 $\pm$ 1,5	506,4 $\pm$ 91,4	38,6 $\pm$ 7,3	11,9 $\pm$ 0,7
	Sau TN	5,8 $\pm$ 0,4	10,8 $\pm$ 2,6	499,4 $\pm$ 109,6	40,2 $\pm$ 3,3	12,2 $\pm$ 0,5

Bảng 4. Kết quả so sánh thống kê theo t-test các chỉ số huyết học thỏ của các nhóm thử nghiệm

Trị số p \ Chỉ số		Hồng cầu	Bạch cầu	Tiểu cầu	Hematocrit	Hemoglobin
Trước TN	P_{C-T1}	0,622	0,747	0,194	0,808	0,655
	P_{C-T2}	0,706	0,976	0,275	0,510	0,668
Giữa TN	P_{C-T1}	0,735	0,136	0,357	0,320	0,865
	P_{C-T2}	0,286	0,110	0,069	0,715	0,507
Sau TN	P_{C-T1}	0,170	0,289	0,074	0,513	0,121
	P_{C-T2}	0,181	0,383	0,110	0,212	0,102

3.2.3. Kết quả theo dõi các chỉ số sinh hóa (thuộc chức năng gan và thận)

Qua kết quả xét nghiệm chỉ số sinh hóa trước, giữa và sau thí nghiệm hầu hết các chỉ số đều không có sự khác biệt giữa nhóm chứng và 2 nhóm thử ($P_{C-T} > 0,05$) (Bảng 5-6).

Bảng 5. Kết quả theo dõi các chỉ số sinh hóa (gan, thận) của thỏ ở các nhóm thử nghiệm (Trung bình $\pm$ SD)

Nhóm \ Chỉ số		AST (U/lit)	ALT (U/lit)	Bilirubin toàn phần (μ mol/lit)	Protein toàn phần (g/lit)	Cholesterol (mmol/l)	Creatinin (μ mol/l)	Urea (mmol/l)
Chứng (n = 7)	Trước TN	29,9 $\pm$ 14,0	59,9 $\pm$ 20,6	0,9 $\pm$ 0,4	56,7 $\pm$ 2,4	1,6 $\pm$ 0,6	72,6 $\pm$ 5,5	4,9 $\pm$ 0,5
	Giữa TN	35,4 $\pm$ 12,1	61,4 $\pm$ 6,4	1,2 $\pm$ 0,4	61,2 $\pm$ 5,6	1,5 $\pm$ 0,5	72,7 $\pm$ 16,4	4,9 $\pm$ 0,9
	Sau TN	23,9 $\pm$ 6,7	47,9 $\pm$ 17,5	1,2 $\pm$ 0,8	57,9 $\pm$ 4,9	1,4 $\pm$ 0,6	90,1 $\pm$ 12,2	5,4 $\pm$ 0,9
Thử 1 (n = 7)	Trước TN	27,4 $\pm$ 5,0	63,6 $\pm$ 13,6	0,9 $\pm$ 0,2	53,1 $\pm$ 4,9	2,0 $\pm$ 0,4	74,9 $\pm$ 9,6	5,5 $\pm$ 1,0
	Giữa TN	33,7 $\pm$ 6,8	60,7 $\pm$ 13,4	1,9 $\pm$ 0,7	59,5 $\pm$ 9,5	1,9 $\pm$ 0,4	75,9 $\pm$ 13,6	5,3 $\pm$ 0,5
	Sau TN	31,4 $\pm$ 7,1	61,6 $\pm$ 10,9	1,6 $\pm$ 0,9	56,3 $\pm$ 5,0	1,9 $\pm$ 0,7	87,3 $\pm$ 10,6	5,8 $\pm$ 0,9
Thử 2 (n = 7)	Trước TN	28,7 $\pm$ 8,5	54,1 $\pm$ 10,0	1,1 $\pm$ 0,2	57,1 $\pm$ 5,4	2,1 $\pm$ 0,3	81,1 $\pm$ 11,6	5,7 $\pm$ 1,3
	Giữa TN	31,4 $\pm$ 9,3	54,0 $\pm$ 10,5	1,9 $\pm$ 0,8	62,1 $\pm$ 4,5	1,2 $\pm$ 0,3	79,9 $\pm$ 15,5	5,1 $\pm$ 0,8
	Sau TN	38,1 $\pm$ 18,8	60,4 $\pm$ 16,4	2,0 $\pm$ 1,1	59,6 $\pm$ 2,4	1,9 $\pm$ 0,4	92,0 $\pm$ 11,4	6,4 $\pm$ 1,2

Bảng 6. Kết quả so sánh thống kê theo t-test các chỉ số sinh hóa thỏ của các nhóm thử nghiệm

Trị số p \ Chỉ số		AST	ALT	Bilirubin toàn phần	Protein toàn phần	Cholesterol	Creatinin	Urea
Trước TN	P_{C-T1}	0,661	0,696	0,775	0,109	0,170	0,582	0,192
	P_{C-T2}	0,846	0,521	0,404	0,871	0,079	0,103	0,188
Giữa TN	P_{C-T1}	0,750	0,900	0,064	0,701	0,100	0,703	0,284
	P_{C-T2}	0,502	0,134	0,074	0,721	0,178	0,419	0,617
Sau TN	P_{C-T1}	0,062	0,104	0,438	0,566	0,132	0,649	0,410
	P_{C-T2}	0,097	0,191	0,162	0,425	0,070	0,774	0,117

3.2.4. Quan sát đại thể

Không có biểu hiện khác thường về hình dạng bên ngoài, màu sắc các tổ chức tim, gan, thận, phổi, dạ dày, ruột của các thỏ nhóm thử so với nhóm chứng sau thí nghiệm.

3.2.5. Quan sát vi thể

Lấy mẫu tiêu bản gan, thận trên 3 thỏ ngẫu nhiên trong từng nhóm thí nghiệm và nhóm chứng, quan sát vi thể. Tiêu bản gan và thận được cố định bằng Formalin 10%, nhuộm bằng dung dịch nhuộm Hematoxylin eosin (He) và Perioric acid Schiff (PAS) và quan sát dưới kính hiển vi điện tử độ phóng đại 100 và 400. Các thỏ thử nghiệm đều có

gan và thận không bị tổn thương, hình ảnh cấu trúc trong giới hạn bình thường. Không có các triệu chứng bất thường liên quan đến mẫu thử với 2 mức liều khác nhau so với nhóm chứng.

Cấu trúc gan không bị đảo lộn, nhận rõ các tiểu thùy với tĩnh mạch trung tâm và các bề gan sắp xếp hướng tâm. Các tế bào gan hình tròn hay đa diện, có nhân nhỏ, đều nhau, không thấy hoại tử, không thấy xâm nhập viêm. Một số tế bào gan thoái hóa có khả năng hồi phục (bao gồm thoái hóa nước và thoái hóa hạt), một số tế bào lắng đọng glycogen trong bào tương. Các khoảng cửa không tăng sinh xơ, không tăng sinh ống mật, không thấy xâm nhập tế bào viêm.

Các cầu thận và ống thận có hình thái, cấu trúc trong giới hạn bình thường. Cầu thận không bị xơ hóa, không tăng sinh các tế bào cuộn mạch, tế bào có chân; khoang Bowman rõ, màng đáy cầu thận không dày. Các tế bào ống thận không thoái hóa, không hoại tử. Mô kẽ không tăng sinh xơ, không xâm nhập viêm. Các tế bào ống thận không lắng đọng glycogen, màng đáy ống thận không dày.

4. Kết luận

Kết quả thử nghiệm độc tính cấp theo phương pháp Behrens đã chỉ ra viên khớp Tâm Bình có $LD_{50} = (7,515 \pm 0,494)$ g mẫu thử/kg chuột. Theo phân loại độc tính của GHS [3], mẫu thử viên khớp Tâm Bình có độc tính thấp dưới ngưỡng phân loại.

Khi cho thỏ uống mẫu thử với 2 mức liều là 0,372 viên/kg thỏ/ngày (tương ứng với mức liều tối đa dùng cho người là 6 viên/người/ngày) và mức liều 1,116 viên/kg thỏ/ngày (cao gấp 3 lần so với liều tối đa dùng cho người), trong 28 ngày không thấy có ảnh hưởng có ý nghĩa thống kê đến thể trạng, chức năng tạo máu và mô bệnh học gan thận trong suốt quá trình uống.

Không nhận thấy sự bất thường và khác nhau về hình dạng bên ngoài, màu sắc của các tổ chức tim, gan, thận, phổi và hệ tiêu hóa khi quan sát đại thể cũng như cấu trúc của gan, thận khi quan sát vi thể của thỏ giữa nhóm chứng và 2 nhóm thử.

Các kết quả thực nghiệm ban đầu cho thấy viên khớp Tâm Bình có độc tính thấp trên chuột nhắt trắng và không ảnh hưởng có hại với thỏ khi dùng thuốc liên tục trong 28 ngày.

Tài liệu tham khảo

1. Đỗ Trung Đàm (2014), *Phương pháp xác định độc tính cấp của thuốc*, NXB. Y học, Hà Nội.
2. Behrens B. and Kaber G. (1983), *Mathematics for Naturalists and Agriculturalists*, PWN, Warszawa, p.218.
3. GHS 6th revised Edition (2015), *Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS)*, United Nations, p.113
4. OECD guidelines for testing of chemical (2008), *Repeated dose 28 - days Oral Toxicity study in Rodents*, OECD 407.
5. Sharma V. and McNeill J. H. (2009), To scale or not to scale: The principles of dose extrapolation, *British Journal of Pharmacology*, 157: 907-921.

SUMMARY

“Viên khớp Tâm Bình” capsules manufactured by Tam Binh Pharmaceutical Trading Production Company Limited, was evaluated for acute and repeated dose toxicity in mice and rabbits, respectively. The acute toxicity results indicated that LD_{50} of “Viên khớp Tâm Bình” in mice according to the method of Behrens is (7.515 ± 0.494) g/kg body weight for single dose oral administration (equivalent to 61 capsules/50 kg body weight human/day). In the repeated- dose toxicity study, rabbits were administered “Viên khớp Tâm Bình” with the doses of 0.372 capsules and 1.116 capsule /kg once daily for 28 days (equivalent to the dose using on human and the dose of 3 times more than one using on human). Blood sample were taken on day 0, day 14 and day 28 of experiment for hematological, biochemical exams. Liver and kidney samples were taken on day 28 for histopathological determinations. The repeated dose toxicity results revealed that there were no significant differences in hematological and serum biochemical values between control and treatment animals. Furthermore, no histopathological changes in the liver and kidney of rabbits treated with “Viên khớp Tâm Bình” were observed.

(Ngày nhận bài: 30/11/2017 ; Ngày phản biện: 18/5/2017 ; Ngày duyệt đăng: 26/12/2017)

HOẠT ĐỘNG HIỆU CHUẨN THIẾT BỊ PHÂN TÍCH CỦA VIỆN KIỂM NGHIỆM THUỐC TRUNG ƯƠNG

BÙI VIỆT PHƯƠNG
Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương

Để đảm bảo kết quả phân tích, kiểm nghiệm chính xác, tin cậy thì việc hiệu chuẩn, thẩm định, kiểm tra thiết bị trước khi tiến hành phân tích, kiểm nghiệm là hết sức quan trọng. Chính vì vậy, Ban Hiệu chuẩn thiết bị - Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương đã được thành lập từ những năm 2000 với thành phần là những cán bộ có kinh nghiệm trong phân tích kiểm nghiệm, hiểu biết sâu về các loại thiết bị phân tích. Cán bộ trong Ban được cử đi đào tạo tại các cơ sở hiệu chuẩn có uy tín trong và ngoài nước, các chuyên gia về lĩnh vực hiệu chuẩn cũng được mời tới Viện để trao đổi, truyền đạt kinh nghiệm. Kết hợp từ kiến thức học được; các tài liệu của các tổ chức đo lường hiệu chuẩn trên thế giới như NATA, OIML, EDQM...; các qui định về kiểm tra, hiệu chuẩn thiết bị của các Dược điển Anh, Mỹ...; các tài liệu của các hãng thiết bị; các tài liệu quản lý ISO/IEC 17025, GLP..., chúng tôi từng bước thiết lập các qui trình hiệu chuẩn, thẩm định, kiểm tra cho các thiết bị và tiến hành thẩm định qui trình đầy đủ. Trải qua thời gian, các qui trình luôn được cập nhật, sửa đổi cho phù hợp; các trang thiết bị chuẩn được bổ sung, mua mới và nối chuẩn hàng năm. Cán bộ hiệu chuẩn thường xuyên được học tập nâng cao trình độ. Bắt đầu từ năm 2015, lĩnh vực đo lường hiệu chuẩn của Viện đã được Văn phòng Công nhận Chất lượng (BoA) đánh giá và công nhận (số hiệu VILAS 087), bao gồm các thiết bị nhiệt, khối lượng và hóa lý. Danh sách các thiết bị Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương cung cấp dịch vụ hiệu chuẩn, thẩm định, kiểm tra được trình bày trong Bảng sau:

TT	Tên thiết bị	Ký hiệu quy trình hiệu chuẩn/thẩm định/kiểm tra
Hiệu chuẩn		
1	Cân phân tích, cân kỹ thuật	VKN/QTHC/20.02
2	Máy sắc ký lỏng hiệu năng cao HPLC	VKN/QTHC/20.03
3	Máy sắc ký khí GC	VKN/QTHC/20.04
4	Máy quang phổ hồng ngoại	VKN/QTHC/20.05
5	Máy quang phổ tử ngoại khả kiến UV-VIS	VKN/QTHC/20.06
6	Máy chuẩn độ đo thể	VKN/QTHC/20.07
7	Máy quang phổ hấp thụ nguyên tử AAS	VKN/QTHC/20.08
8	Phân cực kế	VKN/QTHC/20.09
9	Máy đo điểm chảy	VKN/QTHC/20.10
10	Máy thử độ hòa tan	VKN/QTHC/20.11

11	Máy thử độ rắn viên nén - viên nang	VKN/QTHC/20.12
12	Máy đo pH	VKN/QTHC/20.15
13	Các loại tủ nhiệt, bể cách thủy, tủ vi khí hậu	VKN/QTHC/20.19
14	Nhiệt ẩm kế	VKN/QTHC/20.20
15	Máy thử độ mài mòn	VKN/QTHC/20.21
16	Máy chuẩn độ karl-fischer	VKN/QTHC/20.22
17	Thiết bị tiệt trùng: Nồi hấp tiệt trùng, tủ hấp tiệt trùng	VKN/QTHC/20.23
18	Máy thử độ rắn thuốc đạn - thuốc trứng	VKN/QTHC/20.13
Thẩm định		
19	Thẩm định nồi hấp, tủ nhiệt	VKN/QTTĐ/20.17
Kiểm tra		
20	Kiểm tra tủ an toàn sinh học cấp II	VKN/QTKT/20.18

Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương từ lâu đã cung cấp dịch vụ hiệu chuẩn, thẩm định, kiểm tra thiết bị cho các công ty, trung tâm kiểm nghiệm dược phẩm và chúng tôi sẽ tiếp tục cung cấp dịch vụ này tới quý khách hàng với tiêu chí:

- Quy trình hiệu chuẩn, thẩm định, kiểm tra tin cậy, được thẩm định và cập nhật thường xuyên.
- Đội ngũ hiệu chuẩn viên được đào tạo bài bản, có kinh nghiệm và trách nhiệm, sau khi hiệu chuẩn, hiệu chuẩn viên sẽ trao đổi với khách hàng về tình trạng thiết bị. Ngoài ra chúng tôi sẵn sàng trao đổi với khách hàng các vấn đề hay gặp phải khi sử dụng thiết bị cũng như những kinh nghiệm trong công tác kiểm tra, kiểm nghiệm thuốc và mỹ phẩm.
- Các thiết bị chuẩn đầy đủ, được bổ sung mới và nối chuẩn hàng năm.
- Thiết bị sau khi hiệu chuẩn được dán tem và cấp giấy chứng nhận hiệu chuẩn.

Quý khách có nhu cầu hiệu chuẩn thiết bị vui lòng điền các thông tin vào **phiếu cung cấp thông tin thiết bị cần hiệu chuẩn** được đăng tải trên website <http://www.nidqc.org.vn> và gửi về **Ban Hiệu chuẩn, Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương Số 48 - Hai Bà Trưng, Hà Nội** hoặc có thể gửi bản mềm qua địa chỉ email buivietphuong240284@gmail.com.

Chúng tôi hân hạnh được phục vụ quý khách.

Mọi chi tiết xin liên hệ:

ThS. Bùi Việt Phương

Ban Hiệu chuẩn, Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương

Số 48 - Hai Bà Trưng Hà Nội

ĐT: 0914849326

Email: buivietphuong240284@gmail.com

MỤC LỤC

	<i>Trang</i>
● Quản lý - Trao đổi nghiệp vụ - Định hướng công tác kiểm tra và giám sát chất lượng thuốc năm 2018. <i>PGS. TS. ĐOÀN CAO SƠN - VIỆN TRƯỞNG VIỆN KIỂM NGHIỆM THUỐC TW</i>	1
● Nghiên cứu khoa học - Nghiên cứu định lượng Curcuminoids trong chế phẩm bằng phương pháp HPLC với detector PDA. <i>NGUYỄN THỊ THANH PHƯƠNG, NGUYỄN THÀNH ĐẠT, DƯƠNG THỊ VÂN, CHU THỊ THÚY, NGUYỄN THỊ HỒNG HẠNH, ĐÀM THỊ THU</i> - Xây dựng phương pháp định lượng Bạc bằng quang phổ hấp thụ nguyên tử (AAS) và kiểm nghiệm hình dạng, kích thước tiểu phân nano Bạc. <i>LÊ THỊ HUỖNG HOA, TRẦN VIỆT HÙNG, VÕ VIỆT HÙNG, THÁI NGUYỄN HÙNG THU</i> - Nghiên cứu định lượng Gabapentin trong huyết tương người bằng phương pháp LC-MS/MS. <i>TẠ MẠNH HÙNG, PHAN THỊ NGHĨA, HOÀNG VĂN ĐỨC</i> - Xây dựng phương pháp định tính, định lượng tạp chất B của Tetrazosin. <i>ĐỖ THỊ THANH THỦY, PHẠM VĂN QUANG, NGUYỄN HẢI NAM, ĐOÀN CAO SƠN</i> - Đánh giá độc tính cấp và bán trường diễn của viên khớp Tâm Bình trên động vật thí nghiệm. <i>NGUYỄN THỊ LIÊN, NGUYỄN THỊ HẰNG</i>	2 6 14 18 24
● Thông tin khoa học - Tin tức - Hoạt động hiệu chuẩn thiết bị phân tích của Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương. <i>BÙI VIỆT PHƯƠNG</i>	30

CONTENTS

	<i>Page</i>
● Management - Professional exchange - Objectives and activities of the drug quality control and monitoring for the year 2018. <i>Associate Prof. ĐOÀN CAO SƠN, Ph.D., Director of NIDQC</i>	1
● Scientific researches - Study on determination of Curcuminoids in preparations by HPLC method with PDA detector. <i>NGUYỄN THỊ THANH PHƯƠNG, NGUYỄN THÀNH ĐẠT, DƯƠNG THỊ VÂN, CHU THỊ THÚY, NGUYỄN THỊ HỒNG HẠNH, ĐÀM THỊ THU</i> - Development of Atomic Absorption Spectroscopy (AAS) method for determination of Silver content and testing the shape, size of Silver nanoparticle. <i>LÊ THỊ HUỖNG HOA, TRẦN VIỆT HÙNG, VÕ VIỆT HÙNG, THÁI NGUYỄN HÙNG THU</i> - Study on determination of Gabapentin in human plasma by LC-MS/MS method. <i>TẠ MẠNH HÙNG, PHAN THỊ NGHĨA, HOÀNG VĂN ĐỨC</i> - Development of method for identification and determination of Terazosin Related Compound B. <i>ĐỖ THỊ THANH THỦY, PHẠM VĂN QUANG, NGUYỄN HẢI NAM, ĐOÀN CAO SƠN</i> - Evaluation of acute and repeated dose toxicity of “Viên khớp Tam Bình” on experimental animals. <i>NGUYỄN THỊ LIÊN, NGUYỄN THỊ HẰNG</i>	2 6 14 18 24
● Technical information - News - Calibration activity of analysis equipments in National Institute of Drug Quality Control. <i>BÙI VIỆT PHƯƠNG</i>	30