

VIỆN KIỂM NGHIỆM THUỐC TRUNG ƯƠNG

ISSN 1859 - 0055

TẠP CHÍ

**KIỂM
NGHIỆM
thuốc**

JOURNAL OF DRUG QUALITY CONTROL

SỐ 1.2021

TẬP 19-SỐ 71

NATIONAL INSTITUTE OF DRUG QUALITY CONTROL

48 HAI BA TRUNG . HANOI - VIETNAM

TEL: 84.024.39363794 * FAX: 84.024.38256911 * E-MAIL: tapchiknt@yahoo.com.vn

ĐỊNH HƯỚNG CÔNG TÁC KIỂM TRA VÀ GIÁM SÁT CHẤT LƯỢNG THUỐC NĂM 2021

PGS. TS. ĐOÀN CAO SƠN

Viện trưởng Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương

Trong năm 2020, mặc dù bị ảnh hưởng của đại dịch Covid 19 tác động đến mọi mặt của đời sống - kinh tế - xã hội, Hệ thống kiểm nghiệm trên cả nước vẫn 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:

Hệ thống kiểm nghiệm Nhà nước đã bám sát chỉ tiêu kế hoạch được giao, khắc phục khó khăn, hợp tác với các phòng kiểm nghiệm của các doanh nghiệp, sự phối hợp chặt chẽ giữa Hệ thống kiểm nghiệm - Quản lý dược - Thanh tra dược nhằm tăng cường công tác kiểm tra giám sát chất lượng thuốc. Nhờ vậy, chất lượng thuốc trên thị trường vẫn ổn định và được kiểm soát tốt, tỷ lệ thuốc không đạt chất lượng vẫn duy trì ở mức thấp (0,86%), tỷ lệ thuốc giả thấp so với các nước trong khu vực (0,03%, không tính được liệu bị nhầm lẫn).

Hội đồng thi đua của Hệ thống kiểm nghiệm đã đề nghị Viện trưởng Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương tặng giấy khen cho 31 tập thể và 60 cá nhân đã có thành tích xuất sắc trong công tác kiểm tra, giám sát và đảm bảo chất lượng thuốc năm 2020. Các đơn vị gồm Viện Kiểm nghiệm thuốc Thành phố Hồ Chí Minh, TTKN Thừa Thiên – Huế, TTKN Bình Dương, TTKN Đà Nẵng, TTKN Quảng Ninh và TTKN Hà Tĩnh được đề nghị tặng Cờ thi đua của Bộ Y tế năm 2020.

Về năng lực của Hệ thống kiểm nghiệm: Đến nay toàn hệ thống đã có 16 đơn vị đạt tiêu chuẩn GLP và 55 đơn vị đạt tiêu chuẩn ISO/IEC-17025.

Hội thảo tổng kết công tác kiểm tra, giám sát chất lượng thuốc năm 2020 tại Thành phố Đà Nẵng vào ngày 24 tháng 3 năm 2021 đã nhất trí đề ra định hướng công tác và các nhiệm vụ trọng tâm cho Hệ thống kiểm nghiệm năm 2021.

1. Định hướng công tác

1.1. Tăng cường công tác kiểm tra giám sát chất lượng thuốc, mỹ phẩm trên địa bàn cả nước nhằm đảm bảo thuốc đến tay người dùng có chất lượng, hiệu lực và an toàn. Cần tăng cường kiểm tra chất lượng nguyên liệu đầu vào cũng như lấy mẫu thành phẩm cuối nguồn. Dựa trên số liệu báo cáo của các đơn vị, Viện Kiểm nghiệm

thuốc Trung ương đã tổng hợp danh mục các hoạt chất thường có vi phạm chất lượng cũng như danh sách các công ty trong/ngoài nước có vi phạm chất lượng trong năm 2020 để các đơn vị trong Hệ thống kiểm nghiệm có định hướng xây dựng kế hoạch lấy mẫu.

1.2. Tiếp tục duy trì quản lý phòng thí nghiệm theo tiêu chuẩn ISO/IEC-17025 và GLP đối với các đơn vị đã đạt các tiêu chuẩn này; tiếp tục xây dựng và cải tạo các Trung tâm kiểm nghiệm để các Trung tâm này đạt tiêu chuẩn ISO/IEC-17025 và GLP.

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

1.4. Củng cố và duy trì phần mềm Hệ thống kiểm nghiệm là địa chỉ để cung cấp tiêu chuẩn chất lượng sản phẩm thuốc cho các Trung tâm kiểm nghiệm.

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

- Đối với Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương và Viện Kiểm nghiệm thuốc Thành phố Hồ Chí Minh: ngoài các công việc kiểm nghiệm thường quy, cần tăng cường triển khai nghiên cứu đánh giá sinh khả dụng và tương đương sinh học của thuốc. Tập trung thực hiện kiểm nghiệm các thuốc Biệt dược gốc, thuốc đầu thầu tập trung, thuốc có nguồn gốc sinh học và enzym. Tiếp tục mở các lớp đào tạo, tư vấn kỹ thuật 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 thử nghiệm thành thạo bằng so sánh liên phòng thí nghiệm;

- 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.

- Thực hiện nghiêm công tác phòng chống dịch Covid-19 theo hướng dẫn và yêu cầu của Bộ Y tế và các cơ quan chức năng.

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

- Cùng cố và nâng cấp Trung tâm đánh giá tương đương sinh học ở hai Viện theo chuẩn mực Quốc tế và Khu vực;

- Tăng cường thiết lập 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

- 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;

- Cùng cố việc thực hiện chế độ báo cáo: Báo cáo kịp thời tình hình chất lượng thuốc, các mẫu không đạt chất lượng về Cục Quản lý Dược, Sở Y tế và hai Viện để có hướng giải quyết và xử lý; báo cáo định kỳ hàng năm về hoạt động của đơn vị và tình hình chất lượng thuốc ở địa phương cho Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương để tổng hợp báo cáo Bộ Y tế theo biểu mẫu đã gửi cho các đơn vị, thời gian chốt số liệu là 30/11 hàng năm, thời gian nộp báo cáo là trước 20/12 hàng năm.

2.3. Đối với các cơ sở sản xuất, kinh doanh

- Rà soát các tiêu chuẩn chất lượng thuốc cho phù hợp với Dược điển Việt Nam V và phiên bản mới của các Dược điển hiện hành;

- 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 và giả mạo.

NGHIÊN CỨU KHOA HỌC

XÂY DỰNG VÀ THẨM ĐỊNH QUY TRÌNH ĐỊNH LƯỢNG ĐỒNG THỜI GUAIFENESIN, BROMHEXIN HYDROCLORID VÀ KALI SORBAT TRONG SIRO HO BẰNG KỸ THUẬT SẮC KÝ LỎNG PHA ĐẢO

NGUYỄN THỊ HỒNG, NGUYỄN VĂN BÌNH, DƯƠNG MINH TÂN, LÊ QUANG THẢO

Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương

Từ khóa: Định lượng đồng thời, guaifenesin, bromhexin hydroclorid, kali sorbat, siro ho, RP-HPLC.

1. Đặt vấn đề

Thuốc điều trị ho, long đờm là thành phần không thể thiếu trong tủ thuốc gia đình những khi giao mùa, mùa đông lạnh, mùa xuân ẩm, đặc biệt là ở các gia đình có trẻ nhỏ. Các thuốc chống ho, giảm ho như codein, dextromethorphan, pseudoephedrin, theophyllin, ... thường được chỉ định trong trường hợp ho khan nhiều, kích thích gây mất ngủ ở người lớn, chống chỉ định cho trường hợp ho có đờm. Các thuốc long đờm, tiêu đờm như acetylcystein, ambroxol, bromhexin hydroclorid, guaifenesin giúp giảm ho được sử dụng phổ biến hơn ở dạng đơn thành phần hoặc phối hợp với các thuốc điều trị ho khác [2]. Nếu như acetylcystein, ambroxol chỉ khuyến cáo cho trẻ trên 2 tuổi thì bromhexin hydroclorid, guaifenesin được chỉ định cho cả trẻ dưới 2 tuổi [1].

Một dạng bào chế hay gặp là siro ho dành cho trẻ em, phối hợp 2 thành phần guaifenesin có tác dụng long đờm và bromhexin hydroclorid có tác dụng tiêu đờm và giảm tiết nhầy. Dạng bào chế này thường có thêm thành phần chất bảo quản như kali sorbat. Tuy nhiên, hiện nay trong các dược điển chưa thấy có chuyên luận riêng cho công thức thuốc chứa các thành phần này, các nghiên cứu cụ thể cho dạng thuốc chứa các thành phần này hiện vẫn còn rất hạn chế [2],[3],[4],[5].

Nhằm nâng cao công tác giám sát chất lượng thuốc phục vụ sức khỏe cộng đồng, nhóm nghiên cứu đã tiến hành xây dựng và thẩm định quy trình định lượng đồng thời guaifenesin, bromhexin hydroclorid và chất bảo quản kali sorbat trong siro ho bằng kỹ thuật HPLC.

2. Thực nghiệm

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

2.1.1. Thiết bị, dụng cụ

Các thiết bị, dụng cụ đã được hiệu chuẩn theo quy định của ISO/IEC 17025 và GLP.

- Máy sắc ký lỏng hiệu năng cao Shimadzu;
- Cột phân tích: C18 (250 x 4,6 mm; 5 μ m);
- Cân phân tích Mettler MS105 có độ chính xác 0,01 mg;
- Máy đo pH Metrohm;
- Các thiết bị, dụng cụ khác: máy lắc siêu âm, các dụng cụ thủy tinh chính xác class A.

2.1.2. Hóa chất, chất chuẩn

- Methanol (HPLC) của Merck;
- Dinatri hydrophosphat dihydrat (PA) của Scharlau;
- Natri dihydrophosphat dihydrat (PA) của Scharlau;
- Acid phosphoric (PA) của Scharlau;
- Nước RO của Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương.
- Chất chuẩn:
 - + Bromhexin hydroclorid chất chuẩn của Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương, hàm lượng: 99,32% (nguyên trạng), SKS: 0217273.02;
 - + Guaifenesin chất chuẩn của Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương, hàm lượng: 99,81% (nguyên trạng), SKS: WS.0212181.02;
 - + Kali sorbat chuẩn của USP, hàm lượng: 99,8% (theo khan), độ ẩm 0%, SKS: R030B0.

2.2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Đối tượng nghiên cứu

- Siro ho với công thức bào chế như sau: Guaifenesin 100,0 mg; bromhexin hydroclorid 4,0 mg; kali sorbat 10,0 mg; tá dược vừa đủ 5 ml.
- Mẫu placebo: Mẫu giả dược được chuẩn bị như một lô mẫu thử nhưng không có ba thành phần guaifenesin, bromhexin hydroclorid, kali sorbat. Mẫu placebo gồm glycerin, sorbitol 70%, acid tartric, natri saccharin, natri carboxymethyl cellulose, hương trái cây, red amaranth, nước tinh khiết.

2.2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.2.1. Điều kiện sắc ký

Hiện tại chưa tìm thấy nghiên cứu nào đã được công bố liên quan đến thuốc siro có 3 thành phần với tỷ lệ như trên, dựa vào việc tra cứu các thông số lý hóa (công

thức phân tử, giá trị pKa, độ tan, ...) và các trang thiết bị có sẵn, chúng tôi đã tiến hành khảo sát thành phần pha động, tỷ lệ pha động, cột sắc ký, tốc độ dòng, khảo sát bước sóng,... nhóm nghiên cứu đã lựa chọn được điều kiện sắc ký như sau:

- Cột: C18 (250 x 4,6 mm; 5 μ m), nhiệt độ cột 40°C;
- Phát hiện: Detector DAD, bước sóng 220 nm;
- Tốc độ dòng: 1,2 ml/phút;
- Thể tích tiêm: 20 μ l.
- Pha động:
 - + Pha A: Đệm phosphat pH 4,2: Hòa tan 5,04 g dinatri hydrophosphat và 3,01 g natri dihydrophosphat trong vừa đủ 1000 ml nước, điều chỉnh tới pH 4,2 bằng acid phosphoric đậm đặc.
 - + Pha B: Methanol.
- Dung môi pha mẫu: Methanol - Pha động A (45 : 55).
- Chương trình dung môi:

Thời gian (phút)	% Pha động A	% Pha động B
0 - 10	65	35
10 - 15	65 - 25	35 - 75
15 - 30	25	75

2.2.2.2. Phương pháp chuẩn bị mẫu

- *Dung dịch chuẩn gốc kali sorbat*: Pha dung dịch chuẩn gốc kali sorbat 1 mg/ml trong dung môi pha mẫu. Lọc qua màng lọc 0,45 μ m.
- *Dung dịch chuẩn gốc bromhexin hydroclorid*: Pha dung dịch chuẩn gốc bromhexin hydroclorid 0,4 mg/ml trong dung môi pha mẫu. Lọc qua màng lọc 0,45 μ m.
- *Dung dịch chuẩn hỗn hợp*: Cân chính xác 50,0 mg chất chuẩn guaifenesin vào bình định mức 50 ml, hút chính xác 5,0 ml dung dịch chuẩn gốc bromhexin hydroclorid 0,4 mg/ml và 5,0 ml dung dịch chuẩn gốc kali sorbat 1 mg/ml, thêm khoảng 30 ml dung môi pha mẫu, lắc siêu âm hòa tan trong khoảng 10 phút, để nguội về nhiệt độ phòng, thêm dung môi pha mẫu vừa đủ đến vạch, trộn đều. Lọc qua màng lọc 0,45 μ m.
- *Dung dịch thử*: Hút chính xác 5,0 ml chế phẩm, tương ứng với 4 mg bromhexin hydroclorid vào bình định mức 100 ml, thêm khoảng 70 ml dung môi pha mẫu, lắc siêu âm hòa tan trong khoảng 10 phút, để nguội về nhiệt độ phòng, thêm dung môi pha mẫu vừa đủ đến vạch, trộn đều. Lọc qua màng lọc 0,45 μ m.

- *Dung dịch placebo*: Hút chính xác 5,0 ml placebo vào bình định mức 100 ml, thêm khoảng 70 ml dung môi pha mẫu, lắc siêu âm hòa tan trong khoảng 10 phút,

để nguội về nhiệt độ phòng, thêm dung môi pha mẫu vừa đủ đến vạch, trộn đều. Lọc qua màng lọc 0,45 μm .

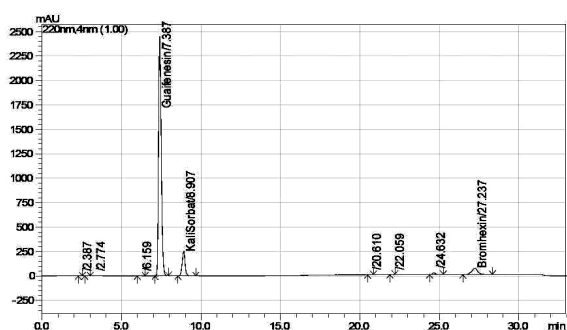
Kiểm tra tính thích hợp của hệ thống: Tiến hành sắc ký với dung dịch chuẩn hỗn hợp, thứ tự rửa giải của ba pic lần lượt là guaifenesin, kali sorbat, bromhexin hydroclorid; hệ số đối xứng của cả 3 pic không được lớn hơn 2,0; hệ số phân giải giữa pic guaifenesin và pic kali sorbat, pic kali sorbat và pic bromhexin không được nhỏ hơn 2,0 và độ lệch chuẩn tương đối của các diện tích pic

đáp ứng từ 6 lần tiêm lặp lại dung dịch chuẩn hỗn hợp không được lớn hơn 2,0%.

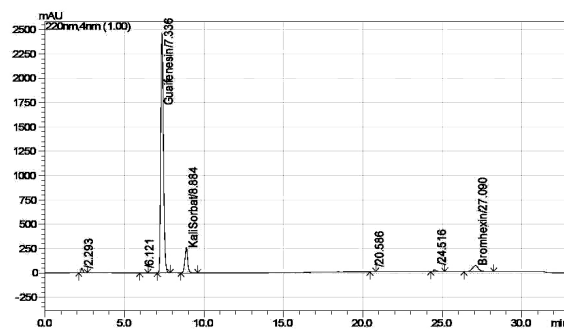
Tiêm 20 μl dung dịch placebo, dung dịch chuẩn hỗn hợp và dung dịch thử vào hệ thống sắc ký. Ghi lại sắc ký đồ và đáp ứng của pic chính trong dung dịch chuẩn hỗn hợp và dung dịch thử.

3. Kết quả và bàn luận

3.1. Lựa chọn điều kiện sắc ký



Hình 1. Sắc ký đồ của dung dịch chuẩn hỗn hợp



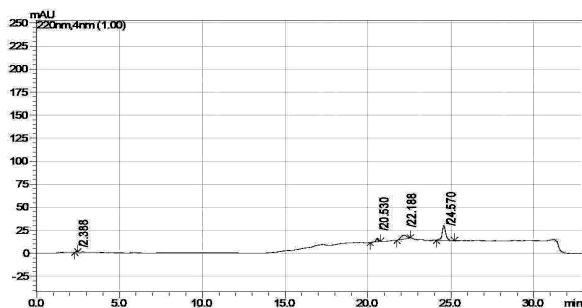
Hình 2. Sắc ký đồ của dung dịch thử

Tiến hành sắc ký dung dịch chuẩn hỗn hợp và dung dịch thử với điều kiện sắc ký đã được xây dựng theo mục 2.2.2.1; sắc ký đồ thu được thể hiện ở Hình 1 và Hình 2. Thứ tự rửa giải của 3 pic được xác định bằng cách tiêm dung dịch chuẩn đơn của từng chất (với nồng độ tương ứng như trong dung dịch chuẩn hỗn hợp), lần lượt là guaifenesin, kali sorbat, bromhexin hydroclorid; sắc ký đồ cho thấy các pic tách rõ ràng, đối xứng và gọn. Như vậy việc lựa chọn các điều kiện sắc ký là phù hợp.

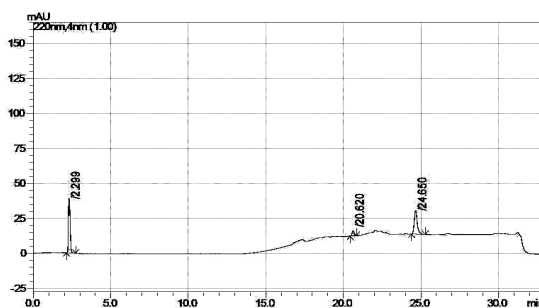
3.2. Đánh giá phương pháp

3.2.1. Khảo sát tính đặc hiệu

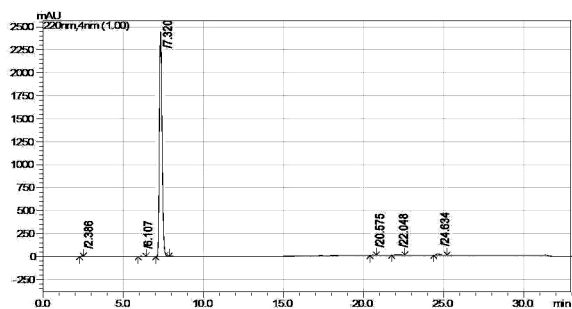
Tiêm lần lượt các dung dịch như sau: dung môi pha mẫu, dung dịch placebo, dung dịch chuẩn guaifenesin, dung dịch chuẩn kali sorbat, dung dịch chuẩn bromhexin hydroclorid, dung dịch chuẩn hỗn hợp và dung dịch thử vào hệ thống sắc ký. Trên sắc ký đồ thu được từ chương trình sắc ký, dung môi pha mẫu không có pic đáp ứng, dung dịch placebo không có pic đáp ứng nào có thời gian lưu tương ứng với các pic guaifenesin (khoảng 7,3 phút), kali sorbat (khoảng 8,9 phút) và bromhexin hydroclorid (khoảng 27,1 phút) (Hình 3, 4, 5, 6, 7 và 8). Quét phổ hấp thụ tử ngoại khả kiến của các dung dịch chuẩn và dung dịch thử với detector DAD cho thấy quang phổ hấp thụ tử ngoại khả kiến của các hoạt chất thu được từ dung dịch thử phù hợp với quang phổ hấp thụ tử ngoại khả kiến của pic chính thu được từ các dung dịch chuẩn tương ứng, hệ số chồng phổ giữa chuẩn và thử đều xấp xỉ bằng 1,0 (Hình 9, 10 và 11).



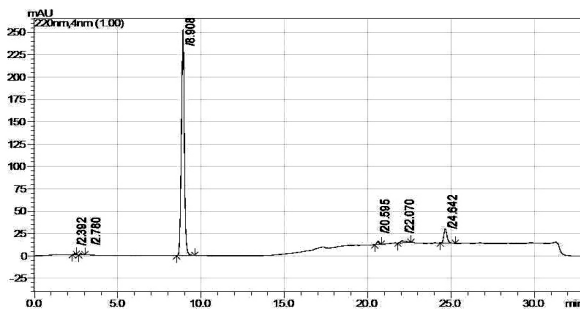
Hình 3. Sắc ký đồ dung môi pha mẫu



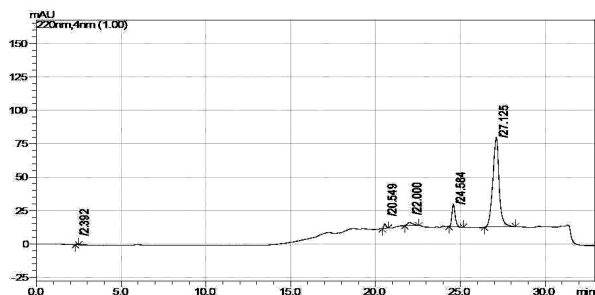
Hình 4. Sắc ký đồ dung dịch placebo



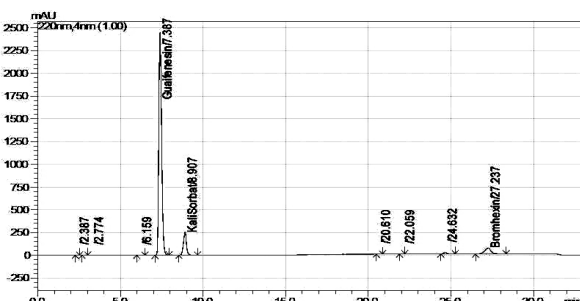
Hình 5. Sắc ký đồ dung dịch chuẩn guaifenesin



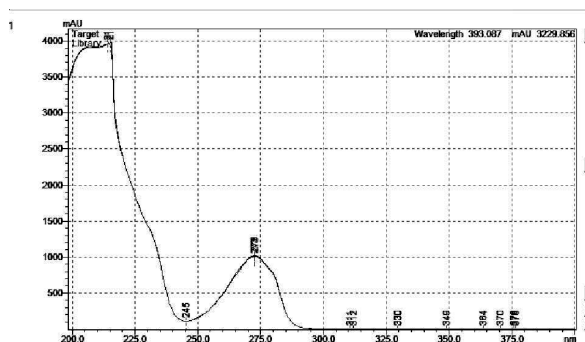
Hình 6. Sắc ký đồ dung dịch chuẩn kali sorbat



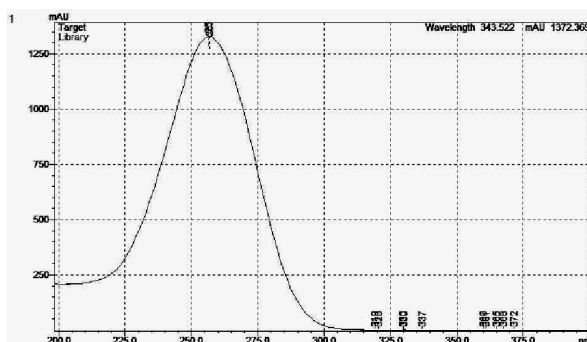
Hình 7. Sắc ký đồ dung dịch chuẩn bromhexin hydroclorid



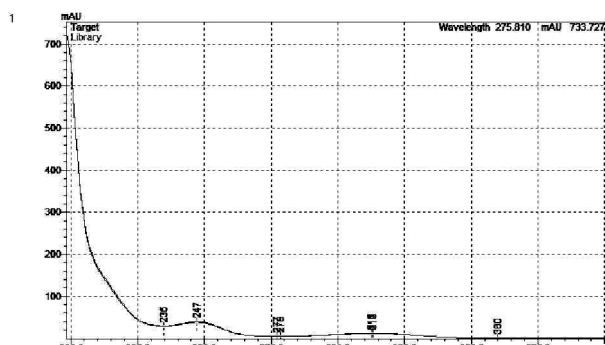
Hình 8. Sắc ký đồ dung dịch chuẩn hỗn hợp



Hình 9. Hình ảnh chồng phổ UV – VIS của pic guaifenesin



Hình 10. Hình ảnh chồng phổ UV – VIS của pic kali sorbat



Hình 11. Hình ảnh chồng phổ UV – VIS của pic bromhexin hydroclorid

Với các điều kiện sắc ký như trên và từ các kết quả thu được đã chứng tỏ phương pháp đặc hiệu để định tính và định lượng các hoạt chất guaifenesin, kali sorbat và bromhexin hydroclorid trong chế phẩm siro ho.

3.2.2. Tính thích hợp của hệ thống sắc ký

Tính thích hợp của hệ thống sắc ký được xác định bằng cách tiêm lặp lại 6 lần dung dịch chuẩn hỗn hợp có nồng độ guaifenesin khoảng 1,0 mg/ml; kali sorbat khoảng 0,1 mg/ml; bromhexin hydroclorid khoảng 0,04 mg/ml. Ghi lại các giá trị về thời gian lưu, diện tích pic, độ cân xứng pic (T) và độ phân giải giữa 3 pic (R).

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

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

STT	Guaifenesin		Kali sorbat		Bromhexin. HCl	
	Thời gian lưu (phút)	Diện tích pic (mAU.s)	Thời gian lưu (phút)	Diện tích pic (mAU.s)	Thời gian lưu (phút)	Diện tích pic (mAU.s)
1	7,387	30552894	8,907	3143317	27,237	1713020
2	7,400	30553974	8,922	3141262	27,250	1714126
3	7,396	30603609	8,916	3144491	27,249	1714075
4	7,394	30637410	8,916	3142521	27,227	1714023
5	7,394	30670271	8,918	3141938	27,200	1718047
6	7,411	30617223	8,941	3142900	27,165	1715832
Trung bình	7,397	30605897	8,920	3142738	27,221	1714854
RSD (%)	0,11	0,15	0,13	0,04	0,12	0,11
Hệ số đối xứng (T)	1,34		1,01		1,02	
Độ phân giải (R)			4,5 (So với guaifenesin)		36,1 (So với kali sorbat)	

Các số liệu thu được cho thấy hệ thống sắc ký trên phù hợp cho việc phân tích định tính, định lượng đồng thời guaifenesin, kali sorbat và bromhexin hydroclorid trong chế phẩm ($RSD \leq 2,0\%$, hệ số bất đối $T \leq 2,0$; hệ số phân giải $R \geq 2,0$).

3.2.3. Khảo sát khoảng tuyến tính

Khảo sát trên 5 dung dịch chuẩn hỗn hợp gồm guaifenesin, kali sorbat và bromhexin hydroclorid ở 5 mức nồng độ khác nhau. Kết quả được ghi trong Bảng 2.

Bảng 2. Kết quả khảo sát khoảng tuyến tính của guaifenesin, kali sorbat và bromhexin hydroclorid

STT	Guaifenesin		Kali sorbat		Bromhexin hydroclorid	
	Nồng độ (mg/ml)	Diện tích pic (mAU.s)	Nồng độ (mg/ml)	Diện tích pic (mAU.s)	Nồng độ (mg/ml)	Diện tích pic (mAU.s)
1	0,5050	15313205	0,0504	1581768	0,02007	864790
2	0,8081	25912016	0,0807	2519080	0,03212	1392076
3	1,0101	30861285	0,1008	3144006	0,04015	1735425
4	1,2121	36777348	0,1210	3767273	0,04817	2090743
5	1,5151	45698607	0,1513	4698497	0,06022	2615628
	Phương trình hồi quy: $y = 29642109x + 971591$ $r = 0,9986$		Phương trình hồi quy: $y = 30912800x + 24878$ $r = 1,0000$		Phương trình hồi quy: $y = 43598368x - 10530$ $r = 1,0000$	

Nhận xét: Với điều kiện sắc ký đã chọn, trong khoảng nồng độ đã khảo sát, các chất guaifenesin, kali sorbat, bromhexin hydroclorid có sự tương quan tuyến tính chặt chẽ giữa nồng độ và diện tích pic đáp ứng với hệ số tương quan $r \sim 1,0$.

3.2.4. Khảo sát độ chính xác của phương pháp

3.2.4.1. Khảo sát độ lặp lại

Tiến hành khảo sát trên chế phẩm siro ho với các điều kiện sắc ký và phương pháp chuẩn bị mẫu như ghi ở mục 2.2.2.1 và 2.2.2.2, lặp lại thí nghiệm với 6 mẫu thử. Kết quả được trình bày trong Bảng 3.

Bảng 3. Kết quả khảo sát độ lặp lại của phương pháp

Mẫu thử		Guaifenesin		Kali sorbat		Bromhexin hydroclorid	
STT	Thể tích (ml)	Diện tích pic (mAU.s)	Hàm lượng (%)	Diện tích pic (mAU.s)	Hàm lượng (%)	Diện tích pic (mAU.s)	Hàm lượng (%)
1	5,0	30259225	99,94	3097145	99,22	1663080	97,15
2	5,0	30239506	99,88	3099818	99,30	1661732	97,07
3	5,0	30313735	100,12	3105108	99,47	1668952	97,49
4	5,0	30177742	99,67	3094749	99,14	1662170	97,10
5	5,0	30331929	100,18	3113563	99,74	1673554	97,76
6	5,0	30230456	99,85	3106909	99,53	1667338	97,40
Trung bình		99,94%; n = 6; RSD = 0,19%		99,40%; n = 6; RSD = 0,22%		97,33%; n = 6; RSD = 0,28%	

Với điều kiện sắc ký đã chọn, kết quả ở Bảng 3 cho thấy phương pháp có độ lặp lại tốt đối với cả 3 chất (RSD < 2,0%), có thể áp dụng để định lượng các mẫu thành phẩm.

3.2.4.2. Khảo sát độ chính xác trung gian

Xác định độ chính xác trung gian bằng cách xác định hàm lượng các hoạt chất trong mẫu thử bởi kiểm nghiệm viên khác, tiến hành thử nghiệm với điều kiện thực nghiệm tại thời điểm khác với các điều kiện sắc ký và cách xử lý mẫu như mô tả ở mục 2.2.2.1 và 2.2.2.2, lặp lại thí nghiệm với 6 mẫu thử. Kết quả của kiểm nghiệm viên thứ 2 và kết quả xác định độ chính xác trung gian của 2 kiểm nghiệm viên được thể hiện trong Bảng 4.

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

Mẫu thử (5 ml)	Guaifenesin		Kali sorbat		Bromhexin hydroclorid	
	Diện tích pic (mAU.s)	Hàm lượng (%)	Diện tích pic (mAU.s)	Hàm lượng (%)	Diện tích pic (mAU.s)	Hàm lượng (%)
1	30434137	101,83	3123253	99,93	1649331	96,39
2	30457827	101,91	3113611	99,62	1657738	96,88
3	30405764	101,74	3110755	99,53	1649678	96,41
4	30377688	101,65	3103755	99,31	1652908	96,60
5	30439146	101,85	3121892	99,89	1655588	96,76
6	30648046	102,55	3171121	101,46	1675838	97,94
Trung bình	101,92%; n = 6; RSD = 0,32%		99,96%; n = 6; RSD = 0,77%		96,83%; n = 6; RSD = 0,60%	
2 KNV (n = 12)	RSD = 1,05%		RSD = 0,62%		RSD = 0,52%	

Kết quả ở Bảng 4 cho thấy, phương pháp có độ lặp lại và độ chính xác trung gian tốt, RSD với 12 mẫu thử của 2 kiểm nghiệm viên đều nhỏ hơn 2,0%. Như vậy, phương pháp có thể áp dụng để định lượng các mẫu thành phẩm.

3.2.5. Khảo sát độ đúng

Chuẩn bị 3 mẫu tự tạo ở 3 nồng độ khác nhau (70%, 100% và 130%) bằng cách thêm vào một lượng chính xác mỗi chất chuẩn guaifenesin, kali sorbat và bromhexin hydroclorid vào mẫu placebo. Mỗi mức nồng độ tiến hành 3 lần. Tiến hành sắc ký theo điều kiện đã ghi ở mục 2.2.2.1 và tính lượng hoạt chất thu hồi, kết quả được thể hiện ở Bảng 5.

Bảng 5. Kết quả khảo sát độ đúng của phương pháp

STT	% Thêm vào so với hàm lượng ghi trên nhãn	% Thu hồi guaifenesin	% Thu hồi kali sorbat	% Thu hồi bromhexin. HCl
1	70%	98,89	99,07	98,75
2	70%	99,55	99,27	98,27
3	70%	98,75	98,99	98,88
4	100%	99,22	98,59	98,80
5	100%	98,94	98,49	99,30
6	100%	99,50	98,90	99,27
7	130%	100,91	99,33	98,70
8	130%	99,03	98,71	98,96
9	130%	98,86	98,63	99,41
Trung bình (n = 9)		99,29%	98,89%	98,93%
RSD (%)		0,67%	0,30%	0,36%

Kết quả khảo sát ở Bảng 5 cho thấy phương pháp có độ đúng cao (tỷ lệ tìm lại được lần lượt là 99,29% đối với guaifenesin; 98,89% đối với kali sorbat và 98,93% đối với bromhexin hydroclorid), các kết quả này đều nằm trong khoảng từ 98,0 - 102,0%, như vậy đảm bảo tốt cho việc định lượng đồng thời ba thành phần guaifenesin, kali sorbat và bromhexin hydroclorid trong chế phẩm.

3.2.6. Khoảng xác định

Từ kết quả khảo sát độ đúng và độ tuyến tính, suy ra khoảng xác định của quy trình định lượng đã xây dựng là từ 70% đến 130% so với hàm lượng ghi trên nhãn.

4. Kết luận

Qua khảo sát thực nghiệm, chúng tôi đã xây dựng được một hệ sắc ký lỏng hiệu năng cao để định lượng đồng thời ba thành phần guaifenesin, bromhexin hydroclorid và kali sorbat trong chế phẩm siro ho. Phương pháp đã xây dựng có sự tương quan tuyến tính chặt chẽ giữa diện tích pic đáp ứng và nồng độ hoạt chất, độ lặp lại, độ chính xác trung gian và độ đúng cao với các điều kiện trang thiết bị, hóa chất thuốc thử phù hợp với đa số các phòng thí nghiệm. Với các kết quả thu được, chúng tôi đề nghị có thể áp dụng phương pháp định lượng đã nghiên cứu cho chế phẩm siro ho có 3 thành phần guaifenesin, bromhexin hydroclorid và kali sorbat.

Tài liệu tham khảo

1. Bộ Y tế (2015), *Dược thư quốc gia Việt Nam*, Lần xuất bản thứ hai, tr.807-811, Nhà xuất bản Y học
2. Bộ Y tế (2017), *Dược điển Việt Nam*, Lần xuất bản thứ năm, Nhà xuất bản Y học.
3. The British Pharmacopoeia Commission (2017), *British Pharmacopoeia*.
4. The United States Pharmacopoeial Convention (2017), *United states Pharmacopoeia* 40.
5. Prayas Acharya¹, T. Prasanth Kumar¹, Immanuel Agasteen¹, Sreerama Rajasekhar¹, G. Neelima^{1*}, “A Review on Analytical Methods for Determination of Guaifenesin Alone and In Combination with Other Drugs in Pharmaceutical Formulations”, *Saudi Journal of Medical and Pharmaceutical Sciences*, DOI: 10.21276/sjmps.2017.3.3.7 ISSN 2413-4910.

SUMMARY

A Reversed-phase HPLC method for simultaneous dertermination of Guaifenesin, Bromhexine hydrochloride and Potassium sorbate in cough syrup was introduced:

- The mobile phase was prepared as follows:

Phase A: Phosphate buffer pH 4.2: Dissolve 5.04 g of Disodium hydrogen phosphate and 3.01 g of Sodium dihydrogen phosphate in 1000 ml of Water, adjust with Phosphoric acid to a pH 4.2.

Phase B: Methanol.

Time (minute)	% Phase A	% Phase B
0 - 10	65	35
10 - 15	65 - 25	35 - 75
15 - 30	25	75

- Dilute solution: Methanol – Phosphate buffer pH 4.2 (45 : 55)

- Detection: Detector DAD at 220 nm

- Column: RP C18 (250 x 4.6 mm; 5 μ m)

- Flow rate: 1.2 ml/min

- Injection volume: 20 μ l

The method was validated about the specificity, system suitability, linear range, precision, accuracy and validation results proved that the method was suitable for simultaneous determination of Guaifenesin, Bromhexine hydrochloride and Potassium sorbate in cough syrup.

(Ngày nhận bài: 30/12/2019 ; Ngày phản biện: 08/04/2020 ; Ngày duyệt đăng: 30/03/2021)

XÂY DỰNG QUY TRÌNH XÁC ĐỊNH GIỚI HẠN TẠP CHẤT LIÊN QUAN TRONG NGUYÊN LIỆU POLYPHYLLIN D PHÂN LẬP ĐƯỢC TỪ CÂY BẢY LÁ MỘT HOA BẰNG PHƯƠNG PHÁP HPLC

THÁI NGUYỄN HÙNG THU
Trường Đại học Dược Hà Nội

ĐỖ THỊ HÀ
Viện Dược liệu

CAO NGỌC ANH, HOÀNG THỊ THANH THẢO
Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương

Từ khóa: Polyphyllin D, tạp chất liên quan, HPLC, Bảy lá một hoa.

1. Đặt vấn đề

Bảy lá một hoa (*Paris polyphylla* Sm.) là một dược liệu có nhiều tác dụng dược lý như: ức chế enzym tyrosinase, chữa bệnh do Leishmania [1], cầm máu trong bệnh chảy máu bất thường ở tử cung, kháng khuẩn, ức chế tổn thương ở dạ dày,... đặc biệt là tác dụng chống ung thư và ức chế sự phát triển của khối u [2],[3].

Polyphyllin D (polyphyllin I hay paris saponin I) có tên khoa học là diosgenin-3-O- α -L-arabinofuranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)-[α -L-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)]- β -D-glucopyranosid là một chất đánh dấu để kiểm nghiệm dược liệu Bảy lá một hoa theo Dược điển Trung Quốc 2015 [4]. Polyphyllin D có tác dụng ức chế một số dòng tế bào ung thư như ung thư gan HepG2, ung thư gan kháng thuốc R-HepG2, ung thư vú [5], ung thư phổi [6], ung thư máu MOLT-4, u ác tính M14, ung thư trực tràng, ung thư đại tràng SW-620 [7]. Vì vậy cần thiết lập chất chuẩn Polyphyllin D phục vụ công tác kiểm tra, đánh giá chất lượng dược liệu và các sản phẩm từ cây Bảy lá một hoa.

Để thiết lập chất chuẩn cần xây dựng được tiêu chuẩn chất lượng cho nguyên liệu và sử dụng để kiểm tra

chất lượng nguyên liệu, đánh giá đồng nhất, đánh giá liên phòng và theo dõi độ ổn định của chất chuẩn đã thiết lập được. Trong tiêu chuẩn chất lượng của mỗi chất chuẩn cần có chỉ tiêu về tạp chất liên quan. Trong nghiên cứu này, chúng tôi xây dựng và thẩm định phương pháp HPLC để xác định giới hạn tạp chất liên quan trong nguyên liệu polyphyllin D dùng để thiết lập chất chuẩn.

2. Thực nghiệm

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

2.1.1. Thiết bị, dụng cụ

Các thiết bị và dụng cụ phân tích đã được hiệu chuẩn, đáp ứng yêu cầu của ISO/IEC 17025 và GLP, bao gồm:

- Cân phân tích MS105 độ chính xác 0,01 mg (Mettler, Thụy Sĩ);

- Hệ thống máy sắc ký lỏng hiệu năng cao Water ARC;
- Cột Phenomenex Luna RP 18 (250 $\times$ 4,6 mm; 5 μ m);

- Các dụng cụ thủy tinh có độ chính xác phù hợp: bình định mức, pipet,...

2.1.2. Hóa chất và dung môi

Dung môi tinh khiết HPLC: Acetonitril (Merck), methanol (Merck), nước RO (Viện KNTTW).

2.1.3. Chất chuẩn

- Chất chuẩn polyphyllin D được cung cấp bởi Chengdu Herbpurify Co., Ltd., Trung Quốc (SKS: C-036-181216; Hàm lượng: 98,72%; Độ ẩm: 1,64%);

- Chất chuẩn dioscin được cung cấp bởi Chengdu Herbpurify Co., Ltd., Trung Quốc (SKS: S-048-180530; Hàm lượng: 98,03%; Độ ẩm: 1,45%).

2.2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Đối tượng nghiên cứu

Mẫu thử là nguyên liệu thiết lập chất chuẩn polyphyllin D chiết xuất, phân lập và tinh chế được từ thân rễ cây Bảy lá một hoa (*Paris polyphylla* Sm.), SKS: PD.012020EC.

2.2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.2.1. Phương pháp phân tích

Sử dụng sắc ký lỏng pha đảo với cột sắc ký C18; 250 x 4,6 mm; 5 μ m và hệ pha động acetonitril - nước.

2.2.2.2. Phương pháp chuẩn bị mẫu

- Dung môi pha mẫu: Methanol.

- *Dung dịch thử*: Cân và hòa tan chính xác một lượng mẫu thử polyphyllin D trong methanol để thu được dung dịch có nồng độ khoảng 1 mg/ml, trộn đều.

- *Dung dịch đối chiếu*: Pha loãng 1,0 ml dung dịch thử với methanol vừa đủ 100,0 ml, trộn đều.

- *Dung dịch kiểm tra độ phân giải*: Hòa tan một lượng chất chuẩn polyphyllin D và dioscin trong methanol để thu được dung dịch có nồng độ khoảng 1 mg/ml với polyphyllin D và 0,01 mg/ml với dioscin.

Trong quá trình phân lập và tinh chế polyphyllin D, giai đoạn cuối cần phải dùng HPLC điều chế để tách nguyên liệu này khỏi hỗn hợp polyphyllin D và dioscin (tỷ lệ khoảng 2:1) [8] nên rất có thể dioscin sẽ là một trong các tạp chất liên quan có trong nguyên liệu phân lập tinh chế được. Do vậy, cần kiểm tra quá trình tách của 2 chất này với mức nồng độ dioscin ở giới hạn tạp cho phép (1%).

2.2.2.3. Tiến hành

- Tiến hành sắc ký với dung dịch kiểm tra độ phân giải. Độ phân giải giữa pic polyphyllin D và pic dioscin không nhỏ hơn 1,5.

- Tiến hành sắc ký với dung dịch đối chiếu. Phép thử chỉ có giá trị khi độ lệch chuẩn tương đối của diện tích pic

polyphyllin D trong 6 lần tiêm lặp lại không quá 5,0%.

- Tiến hành sắc ký với mẫu trắng (methanol), dung dịch thử và dung dịch đối chiếu. Thời gian chạy sắc ký của dung dịch thử ít nhất bằng 2 lần thời gian lưu của pic chính.

2.2.2.4. Yêu cầu về giới hạn tạp chất

- Trên sắc ký đồ thu được từ dung dịch thử, diện tích của bất kỳ pic phụ nào ngoài pic chính không được lớn hơn diện tích của pic polyphyllin D trên sắc ký đồ thu được từ dung dịch đối chiếu (1,0%).

- Tổng diện tích của các pic phụ ngoài pic chính không được lớn hơn 1,5 lần diện tích của pic polyphyllin D trên sắc ký đồ thu được từ dung dịch đối chiếu (1,5%).

Bỏ qua những pic của dung môi và những pic có diện tích nhỏ hơn 0,05 lần diện tích của pic polyphyllin D trên sắc ký đồ thu được từ dung dịch đối chiếu (0,05%).

2.2.2.5. Thẩm định phương pháp phân tích

Thẩm định phương pháp xác định giới hạn tạp chất theo hướng dẫn “Validation of analytical procedures: Text and methodology Q2(R1)” của ICH 2005 với các tiêu chí: Độ thích hợp của hệ thống, độ đặc hiệu, giới hạn phát hiện, độ tuyến tính [9].

3. Kết quả và bàn luận

3.1. Lựa chọn điều kiện sắc ký

Sau khi khảo sát một số điều kiện như: Thay đổi cột, tốc độ dòng, pha động, tỷ lệ pha động, chúng tôi đã lựa chọn được điều kiện sắc ký như sau:

- Cột sắc ký: C18; 250 x 4,6 mm; 5 μ m

- Pha động: Acetonitril - nước (55:45)

- Nhiệt độ cột: 35°C

- Detector UV: 203 nm

- Tốc độ dòng: 1,0 ml/min

- Thể tích tiêm: 20 μ l

Với điều kiện sắc ký như trên, pic polyphyllin D thu được nhọn, cân đối, có thời gian lưu khoảng 9,2 phút; pic polyphyllin D được tách ra hoàn toàn khỏi pic dioscin (có thời gian lưu khoảng 8,3 phút).

3.2. Thẩm định phương pháp phân tích

3.2.1. Độ đặc hiệu

Chuẩn bị các dung dịch tiêm sắc ký:

- *Dung dịch chuẩn*: Cân 5,32 mg chuẩn polyphyllin D vào bình định mức 5 ml, hòa tan và pha loãng với methanol vừa đủ đến vạch, lắc đều, lọc qua màng lọc 0,45 μ m.

- *Dung dịch phân giải*: Cân 5,01 mg chất chuẩn dioscin vào bình định mức 5 ml, hòa tan và pha loãng với methanol vừa đủ đến vạch, lắc đều. Hút 0,1 ml dung dịch này vào bình định mức 10 ml đã có sẵn 10,03 mg polyphyllin D chuẩn, hòa tan và pha loãng với methanol vừa đủ đến vạch, lắc đều. Lọc qua màng lọc 0,45 μ m.

- *Dung dịch thử*: Cân 5,21 mg mẫu thử polyphyllin D vào bình định mức 5 ml, hòa tan và pha loãng với methanol vừa đủ đến vạch, lắc đều, lọc qua màng lọc 0,45 μ m.

- *Dung dịch đối chiếu*: Pha loãng 1,0 ml dung dịch thử với methanol vừa đủ 100,0 ml, trộn đều.

- *Dung dịch A (phân hủy trong acid)*: Cân 5,08 mg mẫu thử polyphyllin D vào bình định mức 5 ml, thêm vào 0,5 ml acid hydrocloric 10%. Đặt bình trong tủ sấy ở nhiệt độ 80°C trong 4 giờ. Để nguội, hòa tan và thêm vừa đủ thể tích với methanol, lọc qua màng lọc 0,45 μ m.

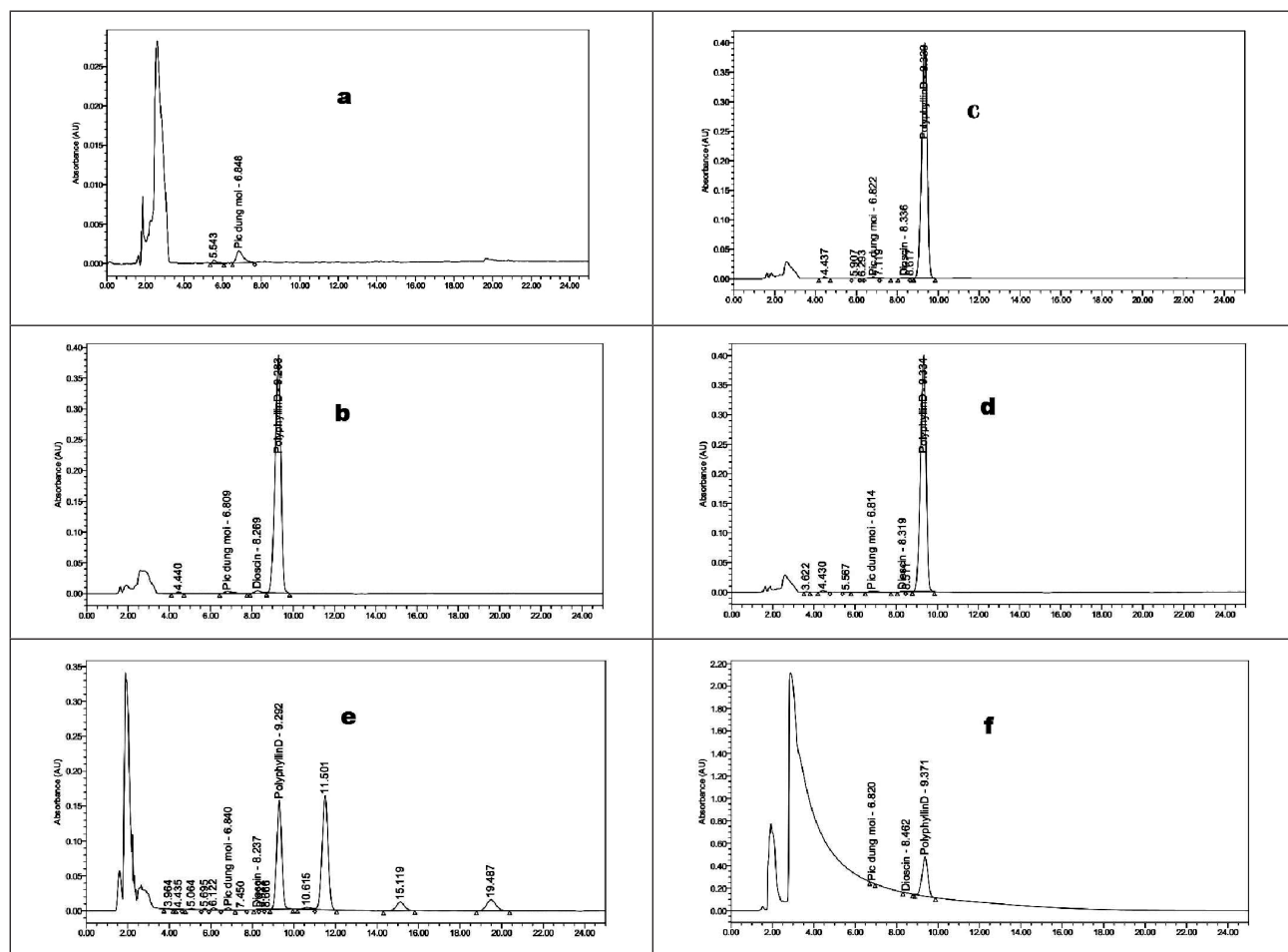
- *Dung dịch K (phân hủy trong kiềm)*: Cân 5,04 mg mẫu thử polyphyllin D vào bình định mức 5 ml,

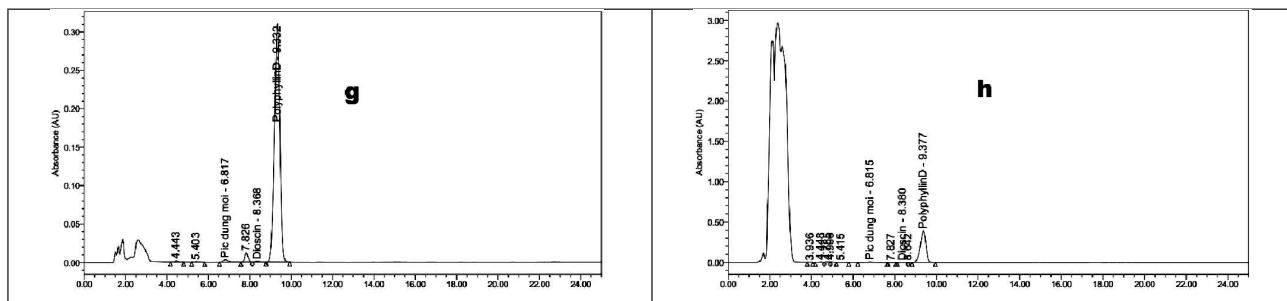
thêm vào 0,5 ml dung dịch natri hydroxyd 10%. Đặt bình trong tủ sấy ở nhiệt độ 80°C trong 4 giờ. Để nguội, hòa tan và thêm vừa đủ thể tích với methanol, lọc qua màng lọc 0,45 μ m.

- *Dung dịch O (phân hủy dưới tác nhân oxy hóa)*: Cân 5,15 mg mẫu thử polyphyllin D vào bình định mức 5 ml. Thêm 0,5 ml dung dịch H₂O₂ 10%. Đặt bình trong tủ sấy ở nhiệt độ 80°C trong 4 giờ. Để nguội, hòa tan và thêm vừa đủ thể tích với methanol, lọc qua màng lọc 0,45 μ m.

- *Dung dịch T (phân hủy bởi nhiệt)*: Cân 4,95 mg mẫu thử polyphyllin D vào bình định mức 5 ml. Đặt bình trong tủ sấy ở nhiệt độ 80°C trong 4 giờ. Để nguội về nhiệt độ phòng, thêm methanol vừa đủ đến vạch, lắc đều, lọc qua màng lọc 0,45 μ m.

Tiến hành sắc ký lần lượt với mẫu trắng (methanol), dung dịch chuẩn, dung dịch kiểm tra độ phân giải, dung dịch đối chiếu và các dung dịch thử. Sắc ký đồ thu được như trình bày trong Hình 1.





Hình 1. Sắc ký đồ các mẫu: Mẫu trắng (a), mẫu đánh giá độ phân giải (b), mẫu chuẩn (c), mẫu thử (d), mẫu phân hủy trong acid (e), mẫu phân hủy trong kiềm (f), mẫu phân hủy bởi nhiệt (g), mẫu phân hủy dưới tác nhân oxy hóa (h).

Kết quả cho thấy:

- Trên sắc ký đồ của dung dịch mẫu trắng không xuất hiện pic có thời gian lưu tương ứng với thời gian lưu của pic polyphyllin D trên sắc ký đồ của dung dịch chuẩn.

- Sắc ký đồ của dung dịch thử cho pic có thời gian lưu (ở 9,334 phút) và phổ UV tương ứng với thời gian lưu và phổ UV của pic polyphyllin D thu được trên sắc ký đồ dung dịch chuẩn (ở 9,339 phút).

- Mẫu thử phân hủy trong môi trường acid: Trừ các pic của mẫu trắng, trên sắc ký đồ của dung dịch thử xuất hiện 13 pic tạp có thời gian lưu tương đối so với pic polyphyllin D lần lượt là 0,43; 0,48; 0,54; 0,61; 0,66; 0,80; 0,89; 0,91; 0,93; 1,14; 1,24; 1,63 và 2,10. Các pic này tách hoàn toàn ra khỏi pic polyphyllin D. Pic của polyphyllin D đạt yêu cầu về độ tinh khiết.

- Mẫu thử phân hủy trong môi trường kiềm: Trừ các pic của mẫu trắng, trên sắc ký đồ của dung dịch thử xuất hiện 01 pic tạp có thời gian lưu tương đối so với pic polyphyllin D là 0,90. Pic này tách hoàn toàn ra khỏi

pic polyphyllin D. Pic polyphyllin D đạt yêu cầu về độ tinh khiết.

- Mẫu thử phân hủy do tác nhân oxy hóa: Trừ các pic của mẫu trắng, trên sắc ký đồ của dung dịch thử xuất hiện 08 pic tạp có thời gian lưu tương đối so với pic polyphyllin D lần lượt là 0,42; 0,47; 0,51; 0,52; 0,58; 0,83; 0,89 và 0,92. Các pic này tách hoàn toàn ra khỏi pic polyphyllin D. Pic polyphyllin D đạt yêu cầu về độ tinh khiết.

- Mẫu thử phân hủy bởi nhiệt: Trừ các pic của mẫu trắng, trên sắc ký đồ của dung dịch thử xuất hiện 04 pic tạp có thời gian lưu tương đối so với pic polyphyllin D lần lượt là 0,05; 0,58; 0,84 và 0,90. Các pic này tách hoàn toàn ra khỏi pic polyphyllin D. Pic polyphyllin D đạt yêu cầu về độ tinh khiết.

Kết quả cho thấy phương pháp đạt yêu cầu về độ đặc hiệu.

3.2.2. Độ thích hợp của hệ thống sắc ký

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

STT	Yêu cầu	Thời gian lưu (phút)	Diện tích pic (mAU.s)
1		9,157	68331
2		9,158	67173
3		9,180	67083
4		9,181	70096
5		9,185	66472
6		9,190	64865
Trung bình		9,175	67337
RSD (%)		0,15	2,62
Số đĩa lý thuyết (N)	≥ 3000		4840
Hệ số bất đối xứng (T)	$0,8 \leq T \leq 1,5$		0,88
Độ phân giải (Rs)	$Rs \geq 1,5$		2,0

Sử dụng dung dịch đối chiếu và dung dịch kiểm tra độ phân giải ở phân độ đặc hiệu.

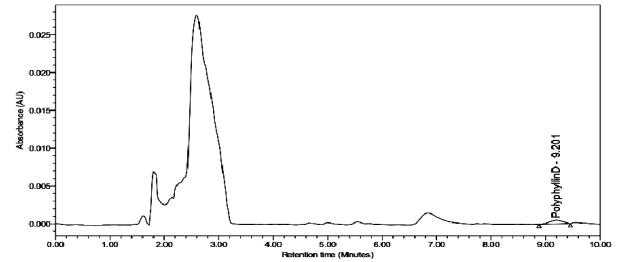
Tiêm dung dịch đối chiếu lặp lại 6 lần và dung dịch kiểm tra độ phân giải, ghi lại các sắc ký đồ và xác định giá trị thời gian lưu, diện tích pic polyphyllin D, độ phân giải (Rs), hệ số bất đối xứng (T). Kết quả được thể hiện ở Bảng 1.

Kết quả ở Bảng 1 cho thấy giá trị RSD của thời gian lưu của pic polyphyllin D là 0,15% (< 1,0%) và RSD của diện tích pic polyphyllin D là 2,62% (< 5,0%), số đĩa lý thuyết $N = 4840 > 3000$, hệ số bất đối xứng $0,8 < T = 0,88 < 1,5$; độ phân giải $R_s = 2,0 > 1,5$ đều đạt yêu cầu. Quy trình thử đạt yêu cầu về độ thích hợp của hệ thống sắc ký.

3.2.3. Giới hạn phát hiện (LOD)

Giới hạn phát hiện được xác định bằng cách pha loãng dần dung dịch đối chiếu đến khi tỷ lệ tín hiệu thu được gấp khoảng 3 lần độ nhiễu đường nền.

- Tại dung dịch đối chiếu pha loãng có nồng độ 1 µg/ml cho đáp ứng pic gấp khoảng 3 lần độ nhiễu đường nền (Hình 2).



Hình 2. Sắc ký đồ của dung dịch polyphyllin tại nồng độ LOD

- Kết quả độ lặp lại của diện tích pic của dung dịch có nồng độ ở mức giới hạn phát hiện được ghi trong Bảng 2.

Bảng 2. Kết quả thẩm định LOD

STT	Thời gian lưu (phút)	Diện tích pic (mAU.s)	S/N
1	9,203	9876	4,13
2	9,201	8159	3,33
3	9,200	10159	6,80
4	9,210	9557	2,31
5	9,199	9946	5,64
6	9,214	10132	4,01
Trung bình	9,205	9638	4,37
RSD (%)	0,07	7,85	

Tại nồng độ 1 µg/ml của polyphyllin D, S/N = 4,37; RSD của diện tích pic polyphyllin D ở nồng độ LOD là 7,85% (< 10,0%). Vậy quy trình phân tích có giới hạn phát hiện LOD = 1 µg/ml và giới hạn định lượng LOQ = 3,3 x LOD = 3,3 µg/ml.

3.2.4. Độ tuyến tính

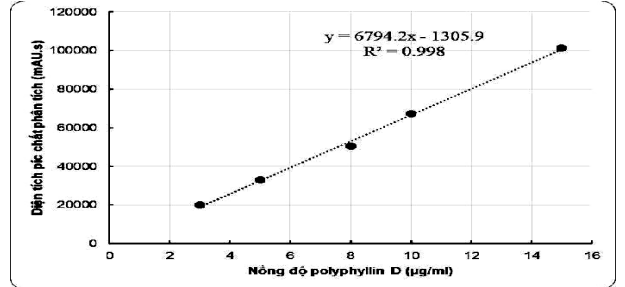
Từ dung dịch chuẩn gốc có nồng độ polyphyllin D 1000 µg/ml (1 mg/ml), chuẩn bị dãy dung dịch chuẩn polyphyllin D. Với giới hạn cho phép của từng tạp chất là 1,0% (tương ứng với nồng độ 10 µg/ml), các nồng độ dãy chuẩn được chuẩn bị với các mức: mức LOQ (3 µg/ml), 50% (5 µg/ml), 80% (8 µg/ml), 100% (10 µg/ml), 150% (15 µg/ml).

Tiến hành chạy sắc ký các dung dịch trong dãy chuẩn, ghi lại sắc ký đồ. Kết quả thể hiện ở Bảng 3 và Hình 3.

Bảng 3. Kết quả đánh giá độ tuyến tính của phương pháp

STT	Nồng độ (µg/ml)	Thể tích dung dịch chuẩn gốc (ml)	Bình định mức (ml)	Diện tích pic polyphyllin D (mAU.s)
1	3	3	100	20009
2	5	1	20	32968
3	8	2	25	50515
4	10	2	20	67337
5	15	3	20	101202

Phương trình hồi quy: $y = 6794,2x - 1305,9$
Hệ số tương quan tuyến tính: $r = 0,9989$
Phần trăm hệ số chẵn tại nồng độ 100%: $Y = 1,94\%$.



Hình 3. Đồ thị biểu diễn mối tương quan tuyến tính giữa nồng độ polyphyllin D và diện tích pic

Kết quả cho thấy trong khoảng nồng độ từ 3 µg/ml (tại LOQ) đến 15 µg/ml (150% so với nồng độ giới hạn tạp) có sự tương quan tuyến tính chặt chẽ giữa nồng độ và diện tích pic, hệ số tương quan $r = 0,9989$, phần trăm hệ số chẵn tại nồng độ 100% là $1,94\% < 2,0\%$.

3.3. Áp dụng phương pháp đã xây dựng để phân tích tạp chất trong nguyên liệu polyphyllin D dùng để thiết lập chất chuẩn

Phương pháp đã xây dựng có thể được áp dụng để phân tích tạp chất liên quan trong nguyên liệu polyphyllin D dùng để thiết lập chất chuẩn và theo dõi độ ổn định của các lọ chất chuẩn sau đóng gói trong quá trình bảo quản. Kết quả phân tích tạp chất liên quan của nguyên liệu thiết lập chất chuẩn polyphyllin D lô PD.012020EC thu được như ở Bảng 4.

Bảng 4. Kết quả phân tích tạp chất liên quan của polyphyllin D lô PD.012020EC

<i>Pic sắc ký</i>	<i>Thời gian lưu (phút)</i>	<i>Thời gian lưu tương đối</i>	<i>Diện tích pic (mAU.s)</i>	<i>%</i>	<i>Độ tinh khiết pic</i>
Polyphyllin D	9,334	1,00	-		Đạt
Tạp 1	4,430	0,47	27889	0,41	
Tạp 2	8,319	0,89	15748	0,23	
Tạp 3	8,511	0,91	8927	0,13	
Tổng tạp			52564	0,77	

Kết quả phân tích cho thấy lô nguyên liệu polyphyllin D PD.012020EC xuất hiện 03 tạp, trong đó tạp 2 có thời gian lưu phù hợp với thời gian lưu của dioscin, tạp 1 và tạp 3 có thời gian lưu khác với thời gian lưu của các tạp phân hủy trong các điều kiện nghiên cứu. Tuy nhiên, tạp 1 và tạp 3 là các tạp liên quan của chất nghiên cứu nên có thời gian lưu khác với thời gian lưu của các tạp phân hủy là hợp lý. Các tạp xác định được có hàm lượng từng tạp đều < 1,0%, tổng các tạp < 1,5%. Lô nguyên liệu đã phân lập, tinh chế được đáp ứng yêu cầu về giới hạn tạp chất liên quan đã xây dựng.

4. Kết luận

Nhóm nghiên cứu đã xây dựng được quy trình xác định giới hạn tạp chất liên quan của nguyên liệu polyphyllin D bằng kỹ thuật sắc ký lỏng hiệu năng cao

trên cột pha đảo với pha động là hỗn hợp của acetonitril - nước (55:45). Phương pháp sử dụng cột RP 18 (250 x 4,6 mm; 5 µm), nhiệt độ cột duy trì ở 35°C; tốc độ dòng 1,0 ml/phút; thể tích tiêm 20 µl; detector 203 nm. Qui trình phân tích đã được thẩm định và đáp ứng yêu cầu về độ đặc hiệu, độ thích hợp của hệ thống sắc ký, LOD, độ tuyến tính. Kết quả đánh giá cho thấy phương pháp đã xây dựng phù hợp để xác định giới hạn tạp chất liên quan trong nguyên liệu polyphyllin D. Phương pháp đã được sử dụng để phân tích tạp trong lô nguyên liệu polyphyllin D PD.012020EC dùng để thiết lập chất chuẩn. Kết quả đã xác định được tổng tạp chiếm 0,77% với 3 tạp đều nhỏ hơn 1,0% đáp ứng yêu cầu về giới hạn của tạp chất liên quan trong nguyên liệu polyphyllin D để có thể đưa vào đóng lọ chuẩn.

Tài liệu tham khảo

1. Devkota K. P., Khan M. T. H., Ranjit R., Meli L. A., Samreen, Iqbal C. M. (2007), "Tyrosinase inhibitory and antileishmanial constituents from the rhizomes of *Paris polyphylla*", *Natural Product Research*, 21, pp. 321-327.
2. Lee M. S. (2005), "Effects of polyphyllin D, a steroidal saponin in *Paris polyphylla*, in growth inhibition of human breast cancer cells and in xenograft", *Cancer Biology & Therapy*, 4(11), pp.1248-1254.
3. Wang Y., Zhang Y. J., Gao W. Y., Yan L.L. (2007), "Anti-tumor constituents from *Paris polyphylla* var. *yunnanensis*", *China Journal of Chinese Materia Medica*, 32(14), pp. 1425-1428.
4. The Chinese Pharmacopoeia Commission (2015), *Pharmacopoeia of the people's republic of China*, 1A, pp. 327-328.
5. Cheung J. Y. N., Ong R. C. Y., Suen Y. K., Ooi V. C., Wong H. N. C., Mak T. C. W., Fung K. P., Yu B., Kong S. K. (2005), "Polyphyllin D is a potent apoptosis inducer in drug-resistant HepG2 cells", *Cancer Letters*, 217(2), pp.203-211.
6. Jiang H., Zhao P. J., Feng J. G., Su D., Ma S. L. (2014), "Effect of paris saponin I on radiosensitivity in a gefitinib-resistant lung adenocarcinoma cell line", *Oncology letters*, 7(6), pp.2059-2064.

7. Mimaki Y., Kuroda M., Obata Y., Sashida Y., M. Kitahara, Yasuda A., Naoi N., Xu Z. W., Li M. R., Lao A. N. (2000), "Steroidal Saponins from the rhizomes of *Paris polyphylla* var. *chinensis* and their cytotoxic activity on HL-60 Cells", *Natural Product Letters*, 14(5), pp.357-364.
8. Cao Ngọc Anh, Nguyễn Thị Phương Lan, Đỗ Thị Hà, Thái Nguyễn Hùng Thu (2021), "Chiết xuất, phân lập, tinh chế và thiết lập chất chuẩn polyphyllin D từ thân rễ cây Bảy lá một hoa (*Paris polyphylla* Sm. var. *chinensis* (Franch.) H. Hara)", *Tạp chí Y Dược học*, 2/2021 (15), 48 - 54.
9. ICH (2005), "Validation of analytical procedures: Text and methodology Q2(R1)", *ICH Harmonized Tripartite guidelines*, 1-13.

SUMMARY

A simple HPLC method using UV-Vis detector was developed and validated for determination of the related substances limit of polyphyllin D in isolated products from *Paris polyphylla* Sm. The chromatographic separation was done in a Phenomenex Luna C18 250 x 4.6 mm, 5 μ m column using mixture of Acetonitrile - Water (55:45) as mobile phase. Flow rate of mobile phase was maintained at 1.0 ml per minute, detection set at 203 nm, injection volume was 20 μ l. The method was fully validated and proved as suitable for intended use. The method has been used to analyze related substances in polyphyllin D material lot. PD.012020EC using to establish reference standard. The results showed that the total impurities is 0.77% with 3 related substances having contents less than 1.0%, meeting the requirement of related substances.

(Ngày nhận bài: 28/03/2021 ; Ngày phản biện: 02/04/2021 ; Ngày duyệt đăng: 07/04/2021)

XÂY DỰNG PHƯƠNG PHÁP PHÁT HIỆN ĐỒNG THỜI 13 CORTICOID DÙNG TRÁI PHÉP TRONG MỸ PHẨM BẰNG SẮC KÝ LÔNG KẾT NỐI KHỐI PHỔ (LC-MS/MS)

DƯƠNG THỊ KHÁNH HUYỀN, LÊ ĐÌNH CHI

Trường Đại học Dược Hà Nội

NGÔ THỊ DUYÊN, NGUYỄN VĂN HÀ,
NGUYỄN VĂN BÌNH, TẠ MẠNH HÙNG

Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương

Từ khóa: Corticoid, mỹ phẩm, sắc ký lỏng khối phổ, phát hiện đồng thời.

1. Đặt vấn đề

Corticoid là một nhóm hoạt chất có nhiều tác dụng dược lý quan trọng như chống viêm, ức chế miễn dịch, ... và được sử dụng cho nhiều chỉ định y khoa khác nhau. Theo Hiệp định hệ thống hòa hợp ASEAN về quản lý mỹ phẩm, corticoid thuộc danh mục các chất, nhóm chất không được phép dùng cho các sản phẩm mỹ phẩm [3]. Tuy nhiên, do có tác dụng chống viêm, làm trắng da, nên corticoid vẫn bị lạm dụng trái phép trong các sản phẩm này. Bởi vậy, xây dựng phương pháp phân tích để phát hiện các chất cấm, bị sử dụng trái phép trong mỹ phẩm như corticoid là yêu cầu thực tiễn đặt ra trong công tác kiểm nghiệm mỹ phẩm. Để có thể phát hiện sự có mặt của nhiều corticoid khác nhau trong mỹ phẩm, đã có các phương pháp phân tích được xây dựng dựa trên các kỹ thuật sắc ký như sắc ký lớp mỏng [2],[4], sắc ký lỏng hiệu năng cao với detector UV-Vis [1],[4].

Kỹ thuật sắc ký lớp mỏng thường sử dụng thiết bị đơn giản, chi phí thấp nhưng giới hạn phát hiện cao [7]. Kỹ thuật HPLC-DAD có hạn chế về khả năng định tính do độ đặc hiệu thấp của phổ hấp thụ UV-Vis nói chung và của glucocorticoid nói riêng. Như vậy, với nền mẫu mỹ phẩm phức tạp có thể dẫn đến kết quả dương tính giả, âm tính giả trong phân tích. Những hạn chế trên cho thấy sự cần thiết cần phải nghiên cứu xây dựng một phương pháp có độ đặc hiệu cao hơn, đảm bảo kết quả tin cậy hơn để kiểm tra sự có mặt của các glucocorticoid trong mỹ phẩm. So với HPLC-DAD, LC-MS/MS cung cấp nhiều thông tin đặc hiệu cho đối tượng phân tích hơn, cho phép cải thiện độ tin cậy khi kết luận định tính sự có mặt của glucocorticoid trong mẫu [5],[6]. Với mục đích áp dụng kỹ thuật sắc ký lỏng kết nối khối phổ (LC-MS/MS) vào kiểm nghiệm mỹ phẩm, nghiên cứu này được triển khai nhằm xây dựng phương pháp phát

hiện đồng thời nhiều corticoid có mặt trái phép trong mỹ phẩm sử dụng kỹ thuật LC-MS/MS.

2. Thực nghiệm

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

2.1.1. Thiết bị, dụng cụ

- Cột sắc ký Acquity UPLC BEH C18 (50 x 2,1 mm; 1,7 μ m);
- Máy sắc ký lỏng khối phổ trang bị detector khối phổ kết nối ba tứ cực Xevo TQD của Waters (Mỹ);
- Các thiết bị hỗ trợ: Cân phân tích chính xác tới 0,01 mg; thiết bị lọc nước trao đổi ion;
- Dụng cụ thủy tinh chính xác loại A (bình định mức, pipet...), màng lọc có đường kính lỗ lọc 0,2 μ m.

2.1.2. Hóa chất, chất chuẩn

- Chất đối chiếu của Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương: Prednison (Lô: WS.0217235.02), Dexamethason (Lô: WS.0217025.02), Prednison acetat (Lô: 102149), Cortison acetat (Lô: 103092), Hydrocortison acetat (Lô: 198038), Triamcinolon acetonid (WS.0116086.01), Dexamethason acetat (Lô: 200014), Fluocinolon acetonid (Lô: 299049), Clobetasol propionat (Lô: WS.0212170.02 (07.12)), Betamethason valerat (Lô: 103125), Betamethason dipropionat (Lô: 107216), Prednisolon (Lô: 0218024.02).
- Chất đối chiếu của USP: Mometason furoat (Lô: IOL395).
- Hóa chất tinh khiết phân tích: Acid formic (Fisher, Mỹ).
- Dung môi tinh khiết sắc ký: Methanol (Merck, Đức).
- Dung dịch acid formic 0,1% (tt/tt) được chuẩn bị bằng cách pha loãng 0,5 ml acid formic bằng nước trao đổi ion vừa đủ 500 ml.

2.2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Đối tượng nghiên cứu

Các mẫu mỹ phẩm dạng kem và dạng phấn.

2.2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.2.1. Chuẩn bị mẫu

a. Mẫu thử:

+ *Mẫu kem*: Cân chính xác khoảng 0,2 g mẫu kem vào cốc có mỏ 20 ml, thêm khoảng 5 ml hỗn hợp methanol - nước (9:1), dùng thìa thủy tinh phân tán đều kem trong cốc. Đặt trên cách thủy ở 60°C trong 10 phút, thỉnh thoảng khuấy. Chuyển hỗn hợp vào bình định mức 20 ml, tráng rửa cốc với hỗn hợp methanol - nước (9:1).

Để nguội, thêm hỗn hợp methanol - nước (9:1) vừa đủ đến vạch, lắc đều, để trong nước đá 30 phút, ly tâm ở 10000 vòng trong 10 phút. Lọc lớp dịch trong qua màng lọc 0,2 μ m.

+ *Mẫu phấn*: Cân chính xác khoảng 0,2 g mẫu phấn vào bình định mức 20 ml, thêm khoảng 15 ml hỗn hợp methanol - nước (9:1), lắc siêu âm 10 phút. Để nguội, thêm hỗn hợp methanol - nước (9:1) vừa đủ đến vạch, lắc đều, ly tâm ở 10000 vòng trong 10 phút. Lọc lớp dịch trong qua màng lọc 0,2 μ m.

b. Mẫu chuẩn:

+ *Dung dịch chuẩn hỗn hợp gốc*: Cân chính xác khoảng 10 mg mỗi chất chuẩn Glucocorticoid (GC) vào mỗi bình định mức 100 ml. Hòa tan và thêm vừa đủ methanol để thu được các dung dịch chuẩn gốc của mỗi GC trong methanol với nồng độ chính xác khoảng 100 μ g/ml. Từ các dung dịch chuẩn gốc, tiến hành pha loãng với hệ số thích hợp bằng methanol cho mỗi GC để thu được dung dịch chuẩn hỗn hợp gốc có nồng độ các chất GC như sau: cortison acetat 200ng/ml, betamethason valerat 300ng/ml, betamethason dipropionat 400 ng/ml, clobetasol propionat 600 ng/ml, prednison, prednisolon, dexamethason, prednison acetat, hydrocortison acetat, triamcinolon acetonid, fluocinolon acetonid 1000 ng/ml, dexamethason acetat 1500 ng/ml, mometason furoat 3000 ng/ml.

+ *Chuẩn bị dung dịch chuẩn hỗn hợp*: Hút chính xác 1,0 ml dung dịch chuẩn hỗn hợp gốc vào bình định mức 20 ml, thêm hỗn hợp methanol - nước (9:1) vừa đủ đến vạch.

c. Mẫu nền:

+ *Mẫu kem*: Cân khoảng 0,2 g mẫu kem mỹ phẩm không chứa corticoid, tiến hành xử lý như mẫu thử cho tới khi thu được dịch lọc.

+ *Mẫu phấn*: Cân khoảng 0,2 g mẫu phấn không chứa corticoid, tiến hành xử lý như mẫu thử cho tới khi thu được dịch lọc.

2.2.2.2. Điều kiện sắc ký

Để xây dựng quy trình phân tích corticoid, các điều kiện dưới đây được sử dụng:

- Cột Acquity UPLC BEH C18 (50 x 2,1 mm; 1,7 μ m) duy trì ở 40°C.
- Máy sắc ký lỏng khối phổ trang bị detector khối phổ kết nối ba tứ cực Xevo TQD của Waters (Mỹ) với điều kiện trong Bảng 1.
- Thể tích tiêm mẫu: 5 μ l.
- Pha động: Methanol - dung dịch acid formic 0,1%, theo chương trình gradient dung môi (Bảng 2).
- Tốc độ dòng: 0,2 ml/phút.

Bảng 1. Điều kiện detector khối phổ

<i>Thông số Hoạt chất</i>	<i>Chế độ ion</i>	<i>Thế ion hóa (kV)</i>	<i>Nhiệt độ hóa hơi (°C)</i>	<i>Tốc độ khí hóa hơi (l/h)</i>	<i>Thế tập trung ion (V)</i>	<i>Ion mẹ, m/z</i>	<i>Năng lượng bắn phá (V)</i>	<i>Ion con, m/z</i>
Prednison	ESI(+)	2,75	500	900	34	359,16	24 24	147,02 171,01
Dexamethason	ESI(+)	2,75	500	900	28	393,16	8 9	373,20 355,17
Prednison acetat	ESI(+)	2,75	500	900	34	401,15	13 14	313,14 295,12
Cortison acetat	ESI(+)	2,75	500	900	46	403,14	27 18	163,06 343,14
Hydrocortison acetat	ESI(+)	2,75	500	900	46	405,17	15 15	327,13 309,19
Triamcinolon acetonid	ESI(+)	2,75	500	900	24	435,11	14 15	339,09 321,15
Dexamethason acetat	ESI(+)	2,75	500	900	24	435,18	12 12	337,13 319,20
Fluocinolon acetonid	ESI(+)	2,75	500	900	35	453,09	10 35	413,18 120,96
Clobetasol propionat	ESI(+)	2,75	500	900	25	467,15	10 10	373,10 355,14
Betamethason valerat	ESI(+)	2,75	500	900	24	477,24	10 10	355,14 337,13
Betamethason dipropionat	ESI(+)	2,75	500	900	24	505,25	9 11	411,22 337,13
Mometason furoat	ESI(+)	2,75	500	900	38	521,08	15 10	355,14 503,18
Prednisolon	ESI(+)	2,75	500	900	25	361,11	10 8	307,13 325,15

Bảng 2. Chương trình gradient dung môi

<i>Thời gian (phút)</i>	<i>Methanol (%)</i>	<i>Dung dịch acid formic 0,1% (%)</i>
0,0	20	80
1,0	72	28
6,5	72	28
7,0	90	10
7,1	20	80
10,0	20	80

3. Kết quả và bàn luận

3.1. Thiết lập phương pháp phát hiện 13 corticoid trong mỹ phẩm

3.1.1. Điều kiện detector khối phổ

Qua khảo sát tín hiệu các ion tạo thành khi ghi phổ khối một lần của các chất chuẩn corticoid, với mỗi corticoid, một ion sơ cấp có cường độ cao và ổn định

được chọn làm ion mẹ. Các ion mẹ này được bắn phá lần hai để phát hiện các ion con, và lựa chọn 2 ion con có cường độ tương đối cao và ổn định để theo dõi trong phân tích thường quy. Từ kết quả khảo sát sơ bộ (Hình 1), các ion mẹ và ion con có giá trị m/z được ghi rõ đã được chọn để theo dõi trong kỹ thuật MRM (*Multi reaction monitoring* – theo dõi đa phản ứng) nhằm phát hiện corticoid trong mẫu (Bảng 1 và

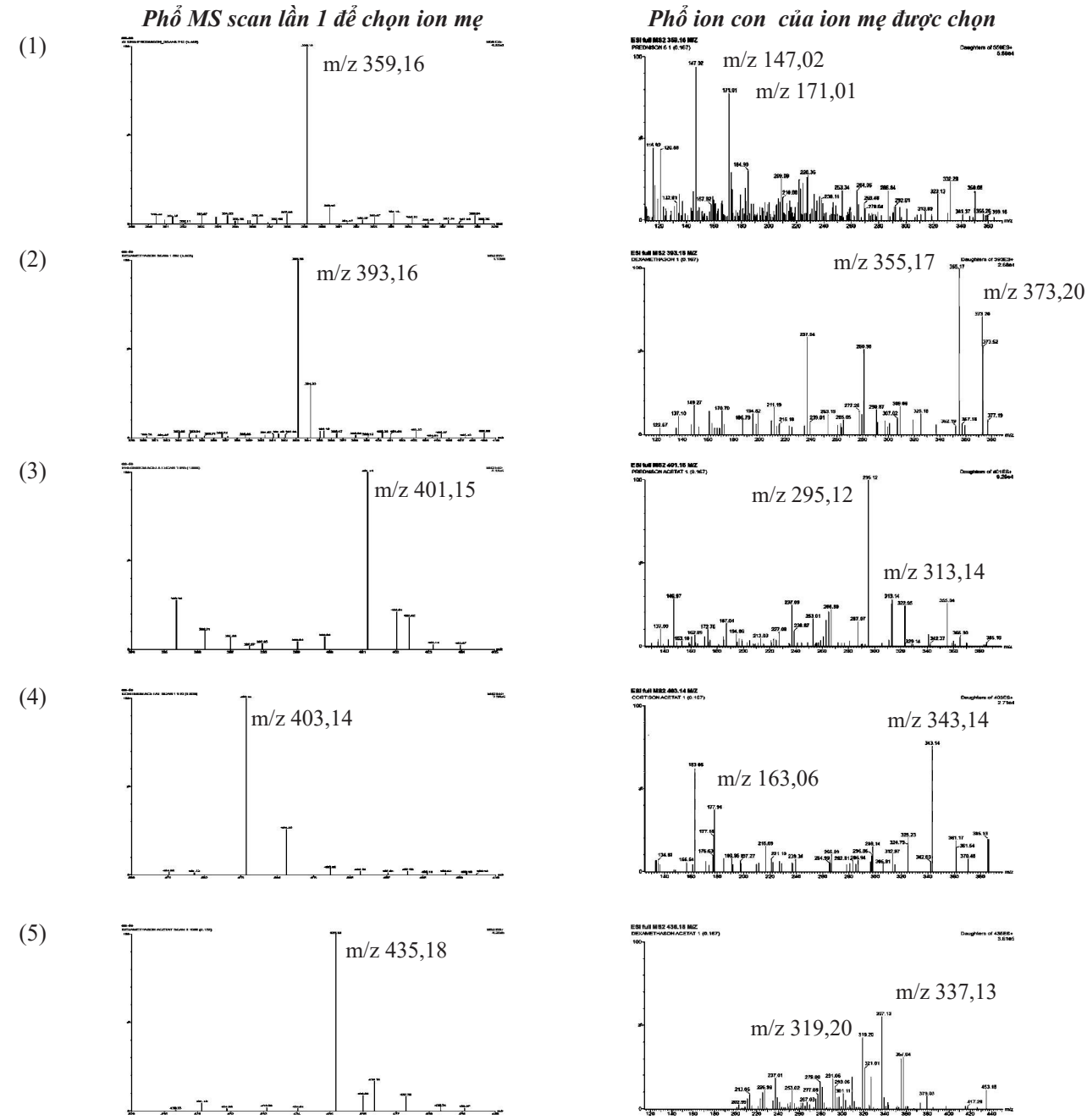
Hình 1). Sau khi lựa chọn được ion mẹ và ion con, tiến hành khảo sát, tối ưu hóa các điều kiện khối phổ để tín hiệu thu được cao và ổn định, kết quả được ghi trong Bảng 1.

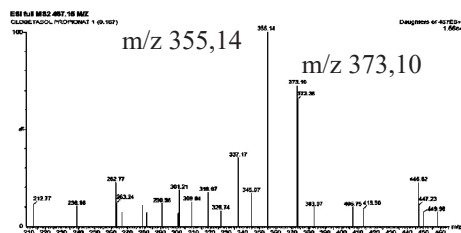
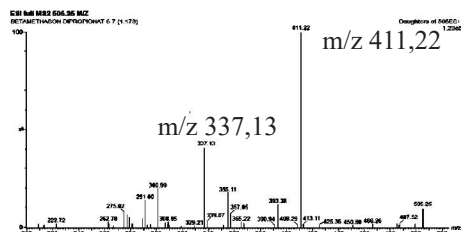
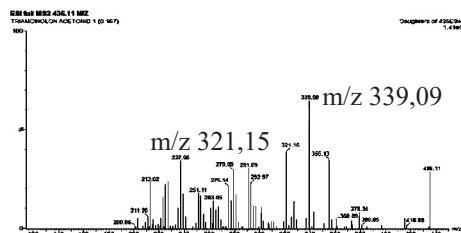
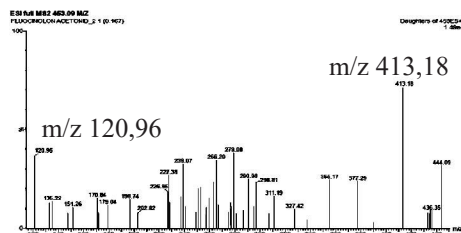
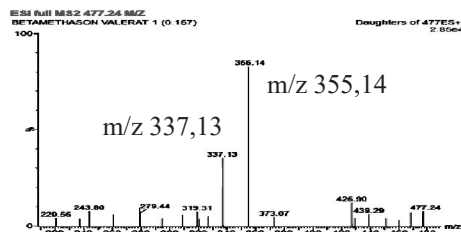
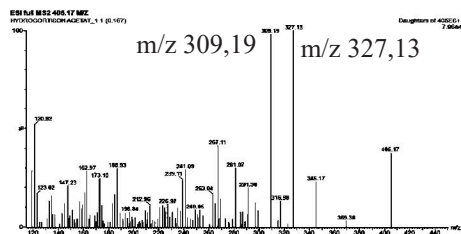
3.1.2. Tiến hành phân tích để phát hiện corticoid

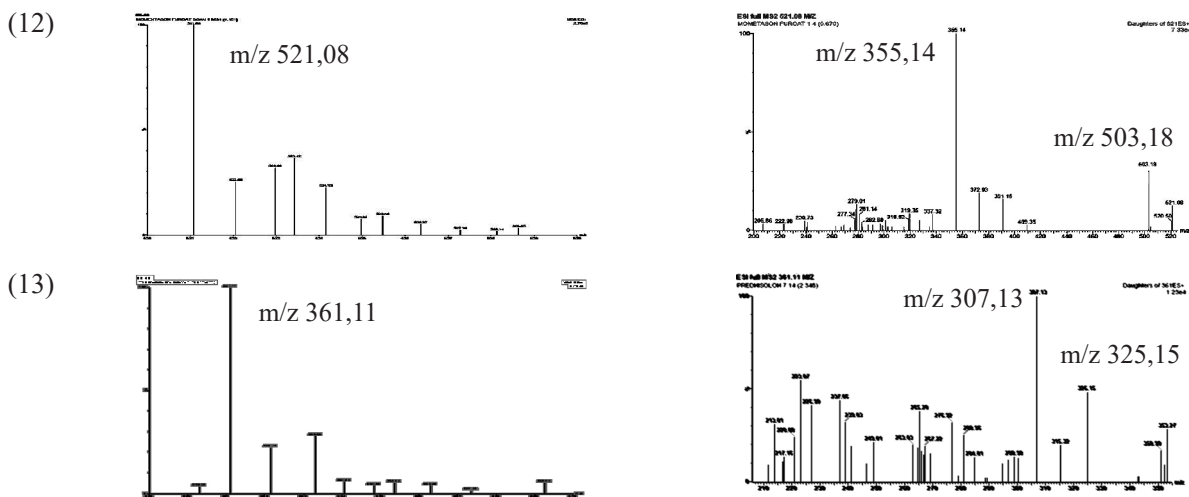
Tiêm lặp lại 6 lần dung dịch chuẩn hỗn hợp, sử dụng kỹ thuật MRM và ghi lại sắc ký đồ. Yêu cầu: giá trị độ lệch chuẩn tương đối của thời gian lưu không được quá 1,0%, của diện tích pic và tỷ lệ cường độ ion không được quá 10,0% [6].

Phân tích mẫu thử và khẳng định sự có mặt của corticoid trong mẫu dựa trên các tiêu chí:

- Xuất hiện pic tại cùng thời gian lưu với chuẩn corticoid tương ứng (chênh lệch thời gian lưu không quá 5%) [5].
- Xuất hiện đồng thời tín hiệu của cả ion mẹ và 2 ion con theo dõi MRM.
- Tỷ lệ cường độ ion (Ion ratio) của mẫu thử phải trong khoảng $\pm 10\%$ (tuyệt đối) so với tỷ lệ cường độ ion tương ứng của mẫu chuẩn tiến hành trong cùng điều kiện [5].







Hình 1. Kết quả diễn hình khảo sát phổ khối 1 lần và 2 lần để chọn ion mẹ và ion con định tính các corticoid: (1)-Prednison, (2)-Dexamethason, (3)-Prednison acetat, (4)-Cortison acetat, (5)-Dexamethason acetat, (6)-Hydrocortison acetat, (7)-Betamethason valerat, (8)-Fluocinolon acetonid, (9)-Triamcinolon acetonid, (10)-Betamethason dipropionat, (11)-Clobetasol propionat, (12)-Mometason furoat, (13)-Prednisolon.

3.2. Thẩm định phương pháp

3.2.1. Độ thích hợp của hệ thống sắc ký lỏng kết nối khối phổ

Độ thích hợp của hệ thống sắc ký lỏng khối phổ được đánh giá trên chuẩn hỗn hợp có nồng độ của các corticoid khoảng: cortison acetat 10 ng/ml; betamethason valerat 15 ng/ml; betamethason dipropionat 20 ng/ml; clobetasol propionat 30 ng/ml; prednison, prednisolon, dexamethason, prednison acetat, hydrocortison acetat, triamcinolon acetonid và fluocinolon acetonid 50 ng/ml; dexamethason acetat 75 ng/ml; mometason furoat 150 ng/ml. Kết quả cho thấy với cả 13 corticoid phân tích, độ lặp lại về thời gian lưu (RSD đều nhỏ hơn 1%), diện tích pic của từng ion theo dõi (RSD đều nhỏ hơn 5%) phù hợp với yêu cầu về độ lặp lại tín hiệu theo FDA [6]. Kết quả tóm tắt thể hiện trong Bảng 3.

Bảng 3. Đánh giá độ thích hợp của hệ thống sắc ký lỏng kết nối khối phổ

<i>Hoạt chất</i>	<i>Dao động thời gian lưu (RSD (%), n = 6)</i>	<i>Dao động diện tích pic của từng ion theo dõi (RSD (%), n = 6)</i>	<i>Tỷ lệ cường độ giữa 2 ion con khi đánh giá trên chuẩn (TB ± SD, n = 6)</i>
Prednison	0,1	2,1 - 2,9	0,585 ± 0,01
Dexamethason	0,1	2,2 - 3,2	0,509 ± 0,01
Prednison acetat	0,1	2,1 - 3,5	0,662 ± 0,02
Cortison acetat	0,1	2,2 - 3,7	0,423 ± 0,02
Hydrocortison acetat	0,1	2,8 - 4,2	0,938 ± 0,02
Triamcinolon acetonid	0,1	1,9 - 2,5	0,571 ± 0,01
Dexamethason acetat	0,1	1,9 - 2,7	0,722 ± 0,02
Fluocinolon acetonid	0,1	1,9 - 2,8	0,357 ± 0,01
Clobetasol propionat	0,1	2,9 - 4,3	0,741 ± 0,03
Betamethason valerat	0,1	2,8 - 4,0	0,330 ± 0,01
Betamethason dipropionat	0,1	1,8 - 1,9	0,739 ± 0,01
Mometason furoat	0,1	2,6 - 3,0	0,673 ± 0,02
Prednisolon	0,1	3,4 - 3,9	0,826 ± 0,02

Như vậy, phương pháp đạt yêu cầu về độ thích hợp của hệ thống sắc ký lỏng khối phổ để phân tích 13 corticoid.

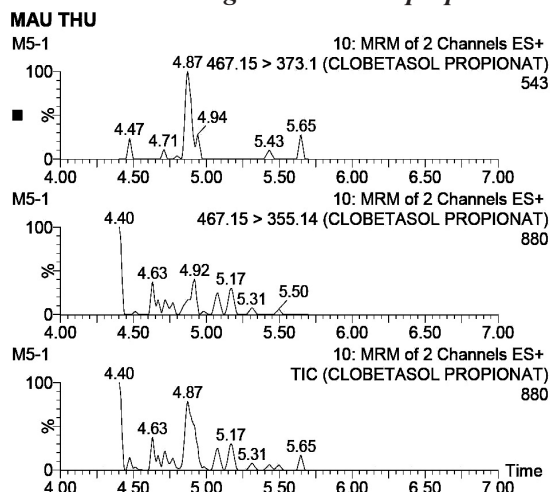
3.2.2. Độ đặc hiệu

Để đánh giá độ đặc hiệu của phương pháp, các dung dịch chuẩn hỗn hợp corticoid, mẫu mỹ phẩm không chứa corticoid, mẫu mỹ phẩm không chứa corticoid được thêm chuẩn corticoid và mẫu mỹ phẩm phát hiện có chứa corticoid đã được sử dụng

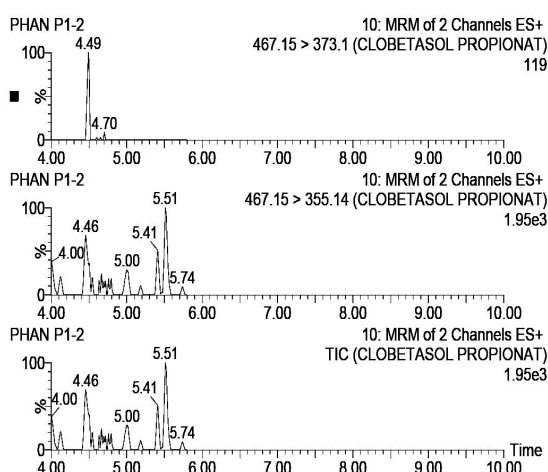
Kết quả thực nghiệm cho thấy trên sắc ký đồ của các mẫu thử không có corticoid đã được thêm chuẩn, đều xuất hiện pic được tách riêng khỏi các corticoid khác phân tích đồng thời cũng như các thành phần nền mẫu với cả 3 ion theo dõi ở chế độ MRM cho mỗi corticoid

(với giá trị m/z tại Bảng 1) và thời gian lưu cũng như tỷ lệ cường độ các ion con của mỗi pic corticoid tương ứng với thời gian lưu của pic corticoid chuẩn và nằm trong khoảng giá trị dao động tỷ lệ cường độ ion con thu được trên sắc ký đồ của chuẩn hỗn hợp 13 corticoid. Trong khi đó, trên mẫu thử phát hiện corticoid xuất hiện pic ở cả 3 ion theo dõi tại cùng thời gian lưu với pic corticoid chuẩn tương ứng và tỷ lệ cường độ đáp ứng của 2 ion con nằm trong khoảng giá trị dao động tỷ lệ cường độ ion con thu được trên sắc ký đồ của chuẩn corticoid tương ứng. Sắc ký đồ của mẫu mỹ phẩm không có corticoid không xuất hiện pic tại cùng thời điểm với pic chuẩn corticoid tương ứng trên cả 3 ion theo dõi (Hình 2). Như vậy, phương pháp đã xây dựng cho phép phát hiện một cách đặc hiệu sự có mặt của corticoid trong mỹ phẩm.

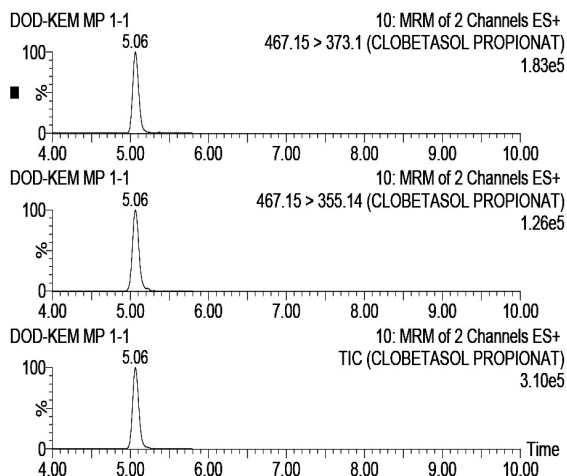
Mẫu kem không có Clobetasol propionat



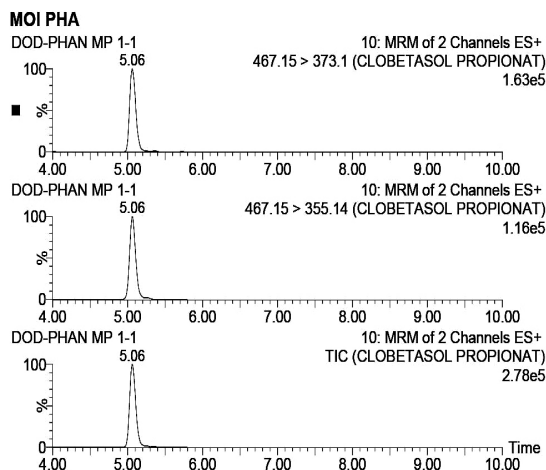
Mẫu phân không có Clobetasol propionat

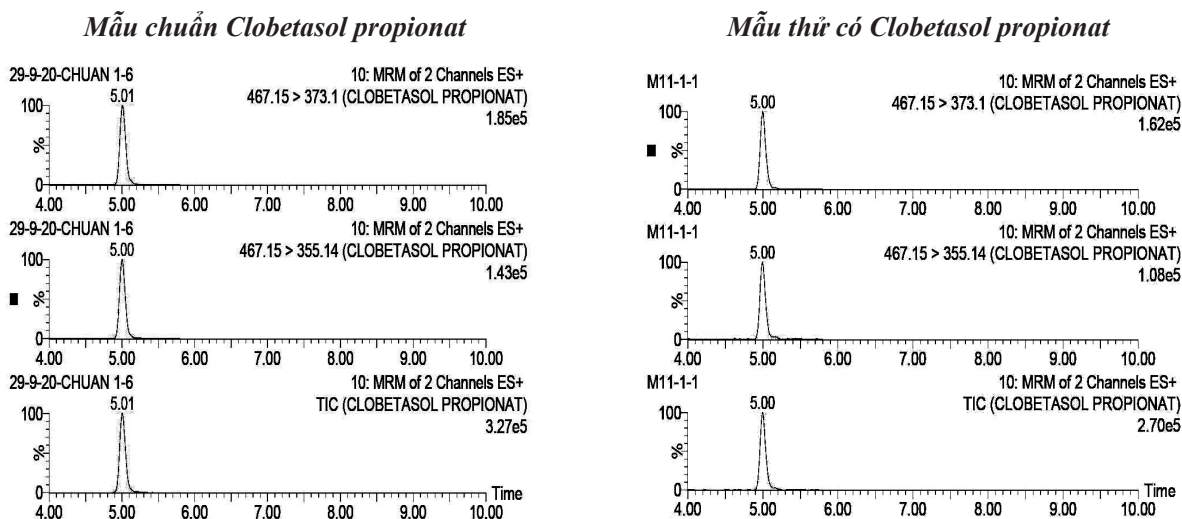


Mẫu tự tạo kem thêm Clobetasol propionat



Mẫu tự tạo phân thêm Clobetasol propionat





Hình 2. Một số sắc ký đồ tiêu biểu khi đánh giá độ đặc hiệu của phương pháp

3.2.3. Giới hạn phát hiện (LOD)

- Tiến hành phân tích mẫu chuẩn được pha trong dung dịch nền mẫu ở các nồng độ thấp dần. Giá trị LOD được xác định tại nồng độ có tỷ lệ giữa tín hiệu chiều cao pic (với pic của cả 2 ion con) của các chất và cường độ nhiễu nền tại lân cận pic ít nhất bằng 3. Sau khi xác định sơ bộ giá trị LOD, tiến hành phân tích mẫu tự tạo ở nồng độ LOD để xác nhận sự phù hợp của giá trị này.

- Kết quả thu được giá trị LOD của các corticoid thể hiện trong Bảng 4.

Bảng 4. Giới hạn phát hiện của phương pháp

Tên chất	LOD trong nền mẫu kem (µg/g)	LOD trong nền mẫu phấn (µg/g)
Prednison	0,21	0,53
Dexamethason	0,22	0,55
Prednison acetat	0,21	0,52
Cortison acetat	0,04	0,10
Hydrocortison acetat	0,22	0,54
Triamcinolon acetonid	0,21	0,52
Dexamethason acetat	0,31	0,76
Fluocinolon acetonid	0,21	0,51
Clobetasol propionat	0,13	0,32
Betamethason valerat	0,06	0,15
Betamethason dipropionat	0,09	0,22
Mometason furoat	0,60	1,51
Prednisolon	0,21	0,52

3.3. Ứng dụng để phát hiện sự có mặt của corticoid trong các mẫu mỹ phẩm trên thị trường

Phương pháp đã được áp dụng để phân tích phát hiện corticoid có mặt trái phép trong 36 mẫu mỹ phẩm. Trong đó, đã phát hiện thấy 2 mẫu có chứa corticoid (kết quả cụ thể tóm tắt trong Bảng 5). Nhóm corticoid là hoạt chất có tác dụng được lý không được phép sử dụng trong mỹ phẩm, nên tất cả các trường hợp này đều có thể bị coi là vi phạm quy định về quản lý chất lượng mỹ phẩm.

Bảng 5. Kết quả phân tích corticoid trong một số mẫu mỹ phẩm

STT	Mẫu	Corticoid phát hiện	Chênh lệch thời gian lưu so với chuẩn (%)	Chênh lệch tỷ lệ cường độ ion con so với chuẩn (%)
1	M11	Clobetasol propionat	0,2	4,9
2	M13	Dexamethason	0,2	5,4
3	M13	Dexamethason acetat	0,3	2,1

4. Kết luận

Phương pháp phát hiện corticoid bằng LC-MS/MS đã được xây dựng nhằm phát hiện corticoid có mặt trái phép trong mỹ phẩm dạng kem và dạng phấn. Phương pháp đã được thẩm định về độ đặc hiệu, độ thích hợp của hệ thống và giới hạn phát hiện. Kết quả thẩm định đã chứng minh phương pháp thích hợp với mục đích ứng dụng và đã được dùng để phát hiện corticoid trong mỹ phẩm dạng kem và dạng phấn. Những kết quả ban đầu đã chỉ ra rằng việc lạm dụng trái phép corticoid trong mỹ phẩm là hiện tượng thực tế, đòi hỏi cần được kiểm soát chặt chẽ hơn nữa để đảm bảo an toàn cho người dùng.

Tài liệu tham khảo

1. Lê Thị Hường Hoa (2013), “Nghiên cứu xây dựng quy trình phát hiện và xác định hàm lượng một số chất bị cấm sử dụng trong mỹ phẩm”, *Luận án Tiến sĩ Dược học*, Trường Đại học Dược Hà Nội.
2. Hoàng Thanh Tâm (2008), “Xây dựng phương pháp phát hiện một số chất thuộc nhóm glucocorticoid trộn trái phép trong mỹ phẩm”, *Luận văn Thạc sĩ Dược học*, Trường Đại học Dược Hà Nội.
3. ASEAN, *Annex of the Asean cosmetics directive*, Version No: 2019-01, 15 July 2019.
4. ASEAN (2005), *Identification of hydrocortisone acetate, dexamethasone, betamethasone, betamethasone 17-valerate and triamcinolone acetonide in cosmetic products by TLC and HPLC* (ACM 007, 02/12/2005).
5. FDA (2003), *Guidance for industry: Mass spectrometry for confirmation of the identity of animal drug residues*.
6. FDA (2019), *Guideline for the validation of chemical methods in food, feed, cosmetics and veterinary products*.

SUMMARY

A LC-MS-based method was developed for simultaneous screening detection of 13 glucocorticoids illegally used in cosmetic creams and powder. Glucocorticoid were extracted from cream and powder matrices with a mixture of methanol and water (9:1, v/v) following by chromatographic separation on a C18 UPLC column with a mixture of methanol and 0.1% aqueous solution of formic acid with gradient program as mobile phase, maintaining at flow rate of 0.2 ml per minute. MS/MS detection of each glucocorticoid was done by monitoring simultaneously 1 precursor ion and 2 product ions in MRM mode. The method was validated in terms of specificity and was proved as suitable for intended application.

(Ngày nhận bài: 07/04/2020 ; Ngày phản biện: 27/07/2020 ; Ngày duyệt đăng: 21/08/2020)

ĐỊNH LƯỢNG RISPERIDON TRONG HUYẾT TƯƠNG NGƯỜI BẰNG PHƯƠNG PHÁP LC-MS/MS

LÊ ĐÌNH KHÁNH, HOÀNG VĂN ĐỨC, TẠ MẠNH HÙNG, ĐOÀN CAO SƠN

Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương

Từ khóa: Risperidon, LC-MS/MS, huyết tương, tương đương sinh học.

1. Đặt vấn đề

Risperidon là thuốc chống loạn thần không điển hình loại benzisoxazol (còn gọi là thuốc chống loạn thần thế hệ thứ hai). Thuốc có tác dụng đối kháng chọn lọc với thụ thể serotonin typ 2 (5-HT₂) và với thụ thể dopamin typ 2 (D₂). Risperidon đã được chấp thuận ở nhiều nước để điều trị tâm thần phân liệt. Sau khi uống risperidon, nồng độ đỉnh trong huyết tương đạt được trong vòng 1 giờ. Sinh khả dụng uống là $66 \pm 28\%$ ở người có chuyển hóa mạnh và cao hơn ở người có chuyển hóa yếu [1]. Ở mức liều sử dụng một viên nén 2 mg risperidon, nồng độ tối đa (C_{max}) trong huyết tương người khoảng từ 14 - 16 ng/ml [5]. Do nồng độ của risperidon thấp nên việc xác định nồng độ thuốc trong các mẫu huyết tương người đòi hỏi phải có phương pháp chiết tách phù hợp và phương pháp phân tích có độ nhạy cao. Do vậy cần xây dựng một phương pháp phân tích phù hợp để xác định được nồng độ risperidon trong các mẫu huyết tương người. Dựa trên nguyên lý hoạt động của phương pháp sắc ký lỏng – khối phổ (LC-MS), các phương pháp chiết tách và tham khảo tài liệu [2], chúng tôi đã tiến hành nghiên cứu xây dựng phương pháp UPLC-MS/MS có đủ độ nhạy, đặc hiệu, chính xác, định lượng được risperidon trong các mẫu huyết tương người.

2. Thực nghiệm

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

2.1.1. Thiết bị, dụng cụ

Các thiết bị được quản lý và hiệu chuẩn theo các quy định của ISO/IEC và GLP, bao gồm:

- Máy sắc ký lỏng khối phổ Sciex Qtrap 6500+ (Sciex – Mỹ);
- Cân phân tích Mettler Toledo (Thụy Sĩ, độ chính xác d = 0,01 mg);
- Tủ lạnh sâu -35 °C ± 5 °C (Panasonic – Nhật Bản);
- Máy ly tâm lạnh (Sigma 4-16KS – Đức);
- Máy lắc xoay, máy lọc nước,...

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

2.1.2. Hóa chất, chất chuẩn

- **Chất chuẩn:**

+ Risperidon (RPD): Chất chuẩn của Sigma, SKS: LRAC2895, hàm lượng 99,8% tính theo nguyên trạng.

+ Haloperidol: Chất chuẩn của Viện Kiểm nghiệm thuốc TW, SKS: 0108241, hàm lượng 99,55%, độ ẩm 0,04%. Haloperidol được sử dụng làm chất nội chuẩn (IS) của RPD trong phương pháp phân tích.

- **Dung môi, hóa chất:** Đạt tiêu chuẩn tinh khiết dùng cho HPLC và LC/MS.

2.2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Đối tượng nghiên cứu

Huyết tương trắng: Không có risperidon do Bệnh viện Trung ương Quân đội 108 cung cấp.

2.2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.2.1. Điều kiện sắc ký

- Cột Acquity BEH C18; 50 x 2,1 mm; 1,7 μm.
- Pha động: Acetonitril – dung dịch amoni bicarbonat 5 mM, tỷ lệ 80 : 20 (v/v)
- Tốc độ dòng: 0,2 ml/phút
- Thể tích tiêm mẫu: 2 μl
- Nhiệt độ autosampler (buồng tiêm mẫu): Nhiệt độ phòng

2.2.2.2. 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 RPD và chất chuẩn nội (IS) được trình bày ở Bảng 1.

2.2.2.3. Phương pháp chuẩn bị mẫu

- **Dung dịch chuẩn gốc:** Chuẩn bị dung dịch chuẩn gốc trong methanol có nồng độ RPD khoảng 200 μg/ml và dung dịch chuẩn nội gốc trong methanol có nồng độ haloperidol khoảng 500 μg/ml.

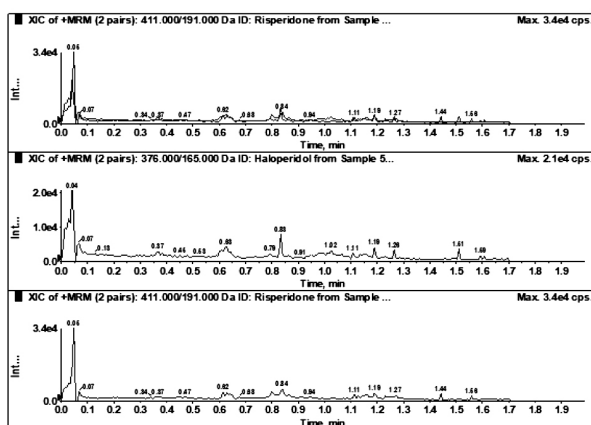
Bảng 1. Các thông số của detector khối phổ dùng để định lượng RPD và chuẩn nội

Hoạt chất	Risperidon	Haloperidol (IS)
Thông số		
Chế độ ion hóa	ESI(+)	ESI(+)
Điện thế ion hóa (V)	4500	4500
Khí phun sương (psi)	65	65
Khí tăng cường (psi)	65	65
Nhiệt độ hóa hơi (°C)	450	450
Điện thế chọn lọc ion (V)	50	50
Khí làm sạch (psi)	35	35
Năng lượng phân mảnh (V)	37	29
Ion ban đầu (parent ion)	411	376
Ion tạo thành (product ion)	191	165

- *Dung dịch chuẩn nội làm việc:* Từ dung dịch chuẩn nội gốc chuẩn bị dung dịch chuẩn nội làm việc trong hỗn hợp methanol-nước (1:1) có nồng độ haloperidol khoảng 500 ng/ml.

- *Dung dịch chuẩn làm việc trong huyết tương:* Từ dung dịch chuẩn gốc RPD, chuẩn bị các dung dịch chuẩn làm việc trong huyết tương có nồng độ RPD lần lượt là 50 ng/ml và 2 ng/ml.

- Từ các dung dịch chuẩn làm việc trong huyết tương, chuẩn bị các mẫu bằng cách pha loãng với huyết tương trắng để thu được các mẫu trong đường chuẩn có nồng độ RPD từ 0,2 ng/ml đến 50 ng/ml và các mẫu LLOQ, LQC, SQC, MQC và HQC chứa RPD có nồng độ tương ứng là 0,2; 0,6; 4; 20 và 40 ng/ml.



Hình 1. Sắc ký đồ mẫu huyết tương trắng

Chú thích hình (từ trên xuống): Sắc ký đồ tổng ion; sắc ký đồ chọn lọc ion Risperidon có $m/z = 411 \rightarrow 191$; sắc ký đồ chọn lọc ion chuẩn nội có $m/z = 376 \rightarrow 165$

2.2.2.4. Phương pháp xử lý mẫu

Mẫu HT để ră đông ở nhiệt độ phòng. Lấy 100 μ l mẫu huyết tương vào ống ly tâm, thêm 20 μ l dung dịch chuẩn nội làm việc. Thêm 1 ml acetonitril. Lắc xoay 10 giây. Ly tâm với tốc độ 6500 vòng/phút trong 5 phút. Lấy lớp dịch nổi. Tiêm vào hệ thống sắc ký.

2.2.2.5. Phương pháp tính kết quả

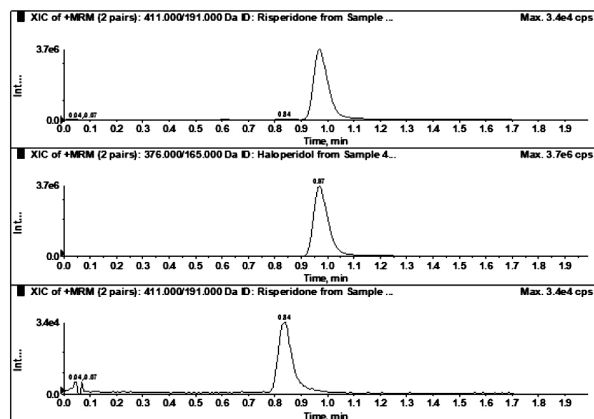
Xác định nồng độ RPD có trong các mẫu thử (chưa biết nồng độ) dựa vào tỷ lệ diện tích pic tương ứng RPD/IS thu được từ sắc đồ của mẫu thử và đường chuẩn tương ứng phân tích trong cùng điều kiện. Tiến hành thẩm định phương pháp phân tích theo quy định của EMA và US-FDA [3],[4].

3. Kết quả và bàn luận

3.1. Độ đặc hiệu – chọn lọc của phương pháp

Phân tích các mẫu HT trắng và các mẫu HT tự tạo chứa chuẩn nội và RPD với nồng độ khoảng 0,2 ng/ml theo phương pháp đã được xây dựng.

Trên SKĐ của mẫu HT trắng (Hình 1), tại thời điểm 0,83 phút và 0,97 phút trùng với thời gian lưu của RPD và IS trong mẫu chuẩn (Hình 2) không xuất hiện các pic có mảnh phổ khối $m/z = 411 \rightarrow 191$ (đặc trưng cho RPD), mảnh phổ khối $m/z = 376 \rightarrow 165$ (đặc trưng cho IS). Do vậy, phương pháp phân tích có độ đặc hiệu - chọn lọc với RPD và IS theo các quy định của phương pháp phân tích thuốc trong dịch sinh học [3],[4].



Hình 2. Sắc ký đồ mẫu huyết tương tự tạo chứa chuẩn RPD (0,2 ng/ml) và chuẩn nội

3.2. Đường chuẩn và khoảng tuyến tính

Phân tích các mẫu HT chứa chuẩn RPD có nồng độ khoảng từ 0,2 ng/ml đến 50 ng/ml và chuẩn nội tương ứng theo quy trình đã xây dựng. Xác định sự tương quan giữa nồng độ RPD có trong mẫu và tỷ lệ diện tích pic tương ứng RPD/IS bằng phương pháp hồi quy tuyến tính, sử dụng hệ số tỷ trọng ($1/\text{nồng độ}^2$). Kết quả xác định mối tương quan tuyến tính được trình bày trong Bảng 2.

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

Mẫu	Nồng độ (ng/ml)	Độ đúng (%)				
		Đường chuẩn 1	Đường chuẩn 2	Đường chuẩn 3	Đường chuẩn 4	Đường chuẩn 5
S1	0,201	98,6	101,4	98,2	94,4	96,9
S2	0,403	102,8	95,5	100,3	109,8	105,9
S3	1,006	99,5	101,5	107,7	102,5	100,4
S4	2,013	100,9	105,8	102,8	102,3	100,7
S5	5,032	100,3	97,3	97,8	97,4	100,1
S6	10,065	102,5	103,1	99,1	104,0	101,7
S7	25,162	101,8	98,8	102,0	98,6	97,9
S8	50,324	93,7	96,5	92,2	90,9	96,4
Phương trình hồi quy ($y = ax + b$)		a = 0,0423	a = 0,0404	a = 0,0409	a = 0,0416	a = 0,0420
		b = 0,0007	b = 0,0012	b = 0,001	b = 0,0011	b = 0,0012
		r = 0,9994	r = 0,9992	r = 0,9987	r = 0,9977	r = 0,9994

Kết quả xác định cho thấy trong khoảng nồng độ từ 0,2 ng/ml đến 50 ng/ml có sự tương quan tuyến tính giữa nồng độ RPD với tỷ lệ diện tích pic tương ứng RPD/IS với hệ số tương quan xấp xỉ bằng 1. Nồng độ RPD xác định từ đường chuẩn so với giá trị lý thuyết đều đạt xấp xỉ 100% và nằm trong giới hạn cho phép theo qui định của phương pháp phân tích thuốc trong dịch sinh học.

3.3. Giới hạn định lượng dưới của phương pháp

Phân tích các mẫu huyết tương trắng và mẫu huyết tương chứa RPD với nồng độ khoảng 0,2 ng/ml (mẫu LLOQ). Xác định diện tích pic RPD và chuẩn nội của các mẫu LLOQ và xác định nồng độ RPD có trong các mẫu từ đường chuẩn tiến hành làm song song trong cùng điều kiện. Tiến hành trên 3 ngày khác nhau. Kết quả thẩm định giới hạn định lượng dưới của phương pháp được trình bày ở Bảng 3 (xem trang sau).

Kết quả thẩm định cho thấy tỷ lệ đáp ứng của pic RPD trong các mẫu LLOQ (nồng độ khoảng 0,2 ng/ml) so với đáp ứng tại thời gian lưu tương ứng trong các mẫu huyết tương trắng có thêm chuẩn nội (mẫu zero) đều > 5 ; tỷ lệ nồng độ RPD xác định từ đường chuẩn so với nồng độ thực có trong mẫu nằm trong khoảng từ 80 – 120% (trung bình = 90,9% và CV = 12,3%) đáp ứng yêu cầu giới hạn định lượng dưới của phương pháp phân tích thuốc trong dịch sinh học.

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

Tiến hành thẩm định độ đúng, độ lặp lại trên 5 lô mẫu thử LLOQ, LQC, SQC, MQC và HQC chứa RPD có nồng độ tương ứng là 0,2; 0,6; 4; 20 và 40 ng/ml. Xác định hàm lượng RPD có trong mẫu bằng phương pháp đường chuẩn và tỷ lệ % giữa nồng độ xác định được từ đường chuẩn so với nồng độ lý thuyết. Tiến hành trên 3 ngày khác nhau. Kết quả xác định độ đúng, độ lặp lại của phương pháp được trình bày ở Bảng 4.

Bảng 3. Kết quả xác định giá trị LLOQ

Ngày thẩm định	Tỷ lệ diện tích pic	Nồng độ xác định từ đường chuẩn (ng/ml)	Độ đúng so với nồng độ thực (%)	Tỷ lệ đáp ứng LLOQ/Zero	Trung bình (%)
Ngày 1	0,008	0,169	82,2	32,6	90,3% CV= 11,9%
	0,007	0,162	78,5		
	0,009	0,206	100,0		
	0,007	0,167	81,3		
	0,009	0,209	101,7		
	0,009	0,203	98,3		
Ngày 2	0,009	0,174	84,4	18,5	80,4% CV= 5,4%
	0,008	0,153	74,0		
	0,008	0,170	82,6		
	0,009	0,171	83,1		
	0,008	0,170	82,4		
	0,008	0,156	75,8		
Ngày 3	0,008	0,212	102,9	11,5	101,9% CV= 3,4%
	0,007	0,198	95,9		
	0,008	0,219	106,2		
	0,007	0,211	102,4		
	0,008	0,213	103,4		
	0,007	0,207	100,7		
Trung bình độ đúng (3 ngày)					90,9%
CV % (n = 18)					12,3%

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

<i>Độ đúng, Độ lặp lại</i>	<i>Mẫu LLOQ (0,2 ng/ml)</i>		<i>Mẫu LQC (0,6 ng/ml)</i>		<i>Mẫu SQC (4 ng/ml)</i>		<i>Mẫu MQC (20 ng/ml)</i>		<i>Mẫu HQC (40 ng/ml)</i>	
	<i>Độ đúng (%)</i>	<i>Độ lặp lại (CV%)</i>	<i>Độ đúng (%)</i>	<i>Độ lặp lại (CV%)</i>	<i>Độ đúng (%)</i>	<i>Độ lặp lại (CV%)</i>	<i>Độ đúng (%)</i>	<i>Độ lặp lại (CV%)</i>	<i>Độ đúng (%)</i>	<i>Độ lặp lại (CV%)</i>
Ngày 1 (n = 6)	90,3	11,9	99,6	8,4	98,9	2,7	99,1	5,1	98,5	4,3
Ngày 2 (n = 6)	80,4	5,4	92,6	5,0	104,9	3,4	94,4	4,5	92,8	3,7
Ngày 3 (n = 6)	101,9	3,4	97,4	2,6	94,9	2,4	94,0	3,4	92,6	4,0
Khác ngày (n = 3)	90,0	12,3	95,5	6,3	100,9	5,2	95,7	5,0	94,2	4,6

Kết quả thẩm định cho thấy ở các khoảng nồng độ thấp; trung bình và cao, phương pháp có độ đúng trong ngày, khác ngày từ 85% đến 115% (ngoại trừ mẫu LLOQ từ 80% đến 120%); độ lặp lại trong ngày, khác ngày với giá trị CV < 15,0% (ngoại trừ mẫu LLOQ với CV < 20%); đáp ứng các yêu cầu về độ đúng, độ lặp lại của phương pháp phân tích thuốc trong dịch sinh học theo hướng dẫn của US-FDA và EMEA.

3.5. Độ ổn định của hoạt chất trong huyết tương

Tiến hành nghiên cứu độ ổn định của RPD trong HT trên các lô mẫu LQC và HQC. Đánh giá độ ổn định của RPD trong HT bằng cách so sánh nồng độ RPD có trong mẫu được bảo quản ở những điều kiện nhất định với nồng độ pha thực tế. Kết quả nghiên cứu độ ổn định của RPD trong huyết tương ở cả hai khoảng nồng độ thấp và cao được trình bày trong Bảng 5.

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

Độ ổn định		LQC	HQC
Sau 5 chu kỳ đông – rã đông	Nồng độ trung bình (ng/ml)	0,664	42,418
	% độ ổn định	109,8	105,2
	CV%	1,0	3,2
Độ ổn định thời gian ngắn (6 giờ; nhiệt độ phòng)	Nồng độ trung bình (ng/ml)	0,599	38,902
	% độ ổn định	99,0	96,5
	CV%	4,6	2,7
Độ ổn định trong autosampler (48 giờ; nhiệt độ phòng)	Nồng độ trung bình (ng/ml)	0,672	42,045
	% độ ổn định	108,5	101,9
	CV%	12,0	2,8
Độ ổn định thời gian dài (95 ngày; - 35 °C ± 5 °C)	Nồng độ trung bình (ng/ml)	0,596	36,039
	% độ ổn định	98,4	89,4
	CV%	1,7	4,3

Kết quả thẩm định cho thấy độ ổn định của RPD trong huyết tương tại các điều kiện bảo quản khác nhau (sau 5 chu kỳ đông – rã đông; bảo quản ở nhiệt độ phòng sau 6 giờ; bảo quản trong autosampler sau 48 giờ và bảo quản ở - 35°C ± 5 °C sau 95 ngày) đáp ứng các yêu cầu về độ ổn định của phương pháp phân tích thuốc trong dịch sinh học.

4. Kết luận

Nghiên cứu đã xây dựng được phương pháp định lượng risperidon trong huyết tương người bằng LC/MS-MS với giá trị giới hạn định lượng dưới là 0,2 ng/ml; khoảng tuyến tính từ 0,2 đến 50 ng/ml; độ đúng xấp xỉ 100% , độ lặp lại với CV < 15% đáp ứng yêu cầu đối với phương pháp phân tích thuốc trong dịch sinh học của EMA và US-FDA [3],[4]. Quy trình xử lý mẫu nhanh, đơn giản, thời gian phân tích ngắn (2,0 phút cho mỗi mẫu). Phương pháp phân tích có thể ứng dụng trong các nghiên cứu đánh giá tương đương sinh học chế phẩm chứa hoạt chất risperidon.

Tài liệu tham khảo

1. Bộ Y tế (2018), Dược thư quốc gia Việt Nam, lần xuất bản thứ hai, Nhà xuất bản Khoa học và kỹ thuật, trang 1249-1251.
2. Bhatt J, Subbaiah G, Singh S. “*Liquid chromatography/tandem mass spectrometry method for simultaneous determination of risperidone and its active metabolite 9-hydroxyrisperidone in human plasma*” Rapid Communication in Mass Spectrometry. 2006;20(14):2109-14.
3. European Medicines Agency, Committee for Medicinal Products for Human Use (2012). *Guideline on Validation of Bioanalytical Methods*.
4. U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration (2018): *Guidance for Industry - Bioanalytical Method Validation*.
5. Y. Liu, M. Zhang, J. Jia, Y. Liu, G. Liu, S. Li, W. Wang, L. Weng, C. Yu, “*Bioequivalence and Pharmacokinetic Evaluation of Two Formulations of Risperidone 2 mg: An Open-Label, Single-Dose, Fasting, Randomized-Sequence, Two-Way Crossover Study in Healthy Male Chinese Volunteers*” Drugs in R&D, volume 13, pages 29-36 (2013).

SUMMARY

A high throughput and specific method using Ultra Performance Liquid Chromatography tandem Mass Spectrometry for determination of Risperidone in human plasma was developed. The Sciex Qtrap 6500+ LC-MS/MS was operated under the multi reaction-monitoring mode using the positive electrospray ionization technique. Risperidone and internal standard were treated from human plasma by protein precipitate technique using Acetonitrile. The samples were chromatographed on a C18 column (dimension 50 x 2.1 mm, particle 1.7 µm) with isocratic elution at a flow rate of 0.2 ml/min using 5mM Ammonium bicarbonate – Acetonitrile with suitable ratio. The standard curves were found to be linear in the range 0.2 to 50 ng/ml, with mean correlation coefficient of ≥ 0.99. The intra-day and inter-day precision and accuracy were within 85% - 115.0%. Total run time was 2.0 min only. This method can be used for BA-BE studies of Risperidone preparations.

(Ngày nhận bài: 14/12/2020 ; Ngày phản biện: 10/03/2021 ; Ngày duyệt đăng: 30/03/2021)

GIỚI THIỆU PHƯƠNG PHÁP XÁC ĐỊNH KÍCH THƯỚC TIỂU PHÂN BẰNG KÍNH HIỂN VI THEO QUY ĐỊNH TRONG DƯỢC ĐIỂN

NGUYỄN THU PHƯƠNG, NGUYỄN HỮU THẢO, TRẦN THỊ HỒNG ANH

Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương

Từ khóa: *Tiểu phân, kích thước tiểu phân, kính hiển vi, xác định kích thước tiểu phân.*

1. Giới thiệu chung về các phương pháp xác định kích thước tiểu phân được ứng dụng trong Dược điển

Tiểu phân trong thuốc tiêm và thuốc tiêm truyền là các hạt nhỏ không hòa tan, linh động, không phải là bọt khí, có nguồn gốc ngẫu nhiên từ bên ngoài [1]. Các tiểu phân này được chia thành hai loại: loại nhìn thấy bằng mắt thường (xơ bông, hạt cơ học,...) có thể phát hiện bằng cách soi dưới đèn trên nền đen/trắng phù hợp; loại không nhìn thấy bằng mắt thường cần phải sử dụng thiết bị riêng để phát hiện. Theo quy định trong Dược điển Việt Nam và các Dược điển tham chiếu hiện hành, các chế phẩm thuốc tiêm, thuốc tiêm truyền và chế phẩm thuốc nhỏ mắt cần được kiểm soát các tiểu phân qua chỉ tiêu “Xác định giới hạn tiểu phân” bằng một trong hai phương pháp: Phương pháp 1 dùng thiết bị đếm tiểu phân có sử dụng tia Laser; Phương pháp 2 dùng kính hiển vi [1],[2],[4].

Phương pháp 1 là phương pháp sử dụng thiết bị hoạt động theo nguyên tắc cản sáng cho phép tự động xác định kích thước tiểu phân và số lượng tiểu phân theo kích thước đã chọn. Đây là phương pháp đo gián tiếp, thường áp dụng kiểm tra tiểu phân không nhìn thấy bằng mắt thường của dung dịch thuốc tiêm và thuốc tiêm truyền có nồng độ tiểu phân nhỏ [1].

Phương pháp 2 sử dụng kính hiển vi, nguyên tắc đo và đếm trực tiếp tiểu phân được lưu giữ trên màng lọc ở độ phóng đại thích hợp. Phương pháp này áp dụng cho các chế phẩm không thật trong, có nồng độ tiểu phân lớn hay có độ nhớt cao, hoặc tạo bọt khí khi đưa vào thiết bị đếm tiểu phân. Ví dụ: chế phẩm tiêm dạng nhũ tương, dạng hỗn dịch, dạng keo hay dạng liposom. Nếu độ nhớt của chế phẩm quá cao, cản trở phương pháp kiểm tra, có thể pha loãng với dung môi thích hợp để có thể tiến hành được thử nghiệm [1].

Theo quy định của các Dược điển tham chiếu hiện hành, phương pháp 2 sẽ được sử dụng để đánh giá lại chế phẩm khi kết quả đo bằng phương pháp 1 không

đạt. Tuy nhiên, phương pháp 2 trong thực tiễn ít được áp dụng và hiếm có phòng thí nghiệm nào đầu tư thiết bị. Vì vậy, sự hiểu biết cũng như kinh nghiệm thực tiễn vẫn còn hạn chế.

2. Ưu nhược điểm của các phương pháp

Phương pháp 1: Ưu điểm của phương pháp là hệ thống tương đối kín, thao tác dễ dàng và kết quả tương đối chính xác. Tuy nhiên có nhược điểm là chỉ áp dụng được với mẫu có nồng độ tiểu phân nhỏ (dung dịch thuốc tiêm hoặc tiêm truyền) và bị ảnh hưởng bởi bọt khí.

Phương pháp 2: Phương pháp này quét trực tiếp tiểu phân có trong dung dịch được lưu giữ trên màng lọc nên không có ảnh hưởng của bọt khí đến kết quả phân tích, ngoài ra có thể quan sát được từng tiểu phân. Mặc dù vậy, phương pháp này đòi hỏi điều kiện môi trường tiến hành nghiêm ngặt hơn [1],[2],[4] như: thiết bị phải được đặt trong buồng thổi khí sạch, các thao tác chuẩn bị mẫu và cách xử lý dụng cụ sau khi lọc phải đảm bảo tránh lây nhiễm tạp tiểu phân từ môi trường bên ngoài vào.

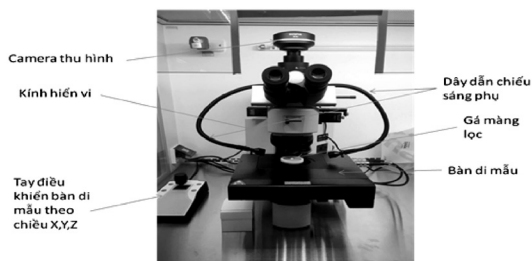
Trong khuôn khổ bài báo, chúng tôi tập trung giới thiệu phương pháp xác định giới hạn tiểu phân không nhìn thấy bằng mắt thường của dung dịch tiêm truyền, trên thiết bị kính hiển vi Olympus.

3. Giới thiệu thiết bị kính hiển vi Olympus dùng để xác định tiểu phân theo phương pháp 2

3.1. Cấu tạo

Thiết bị xác định kích thước tiểu phân sử dụng kính hiển vi bao gồm: Kính hiển vi Olympus (Model: BX51M), Camera CDD chuyên dụng (Model: XC 10), phần mềm phân tích và đếm tiểu phân kèm theo bản quyền (Model: Particle inspector A-INSP-P-V-5.64), máy tính, màn hình, máy in và các trang thiết bị phụ trợ kèm theo bao gồm: Buồng thổi khí sạch Esco (Model: LVG-5AG-F8), bộ lọc chân không và các phụ kiện kèm theo (Merck Millipore, Model: XX1004700), bơm hút chân không (Merck Millipore, Model: WP6222050).

Các phụ kiện dùng cho thiết bị này bao gồm màng lọc, khăn lau và găng tay không bụi để tránh nhiễm tiểu phân từ môi trường hay do thao tác. Màng lọc là loại đặc chủng, màu xám, không có đường vạch kẻ vì nếu có đường kẻ dễ bị sai số khi có các tiểu phân nằm trên đường kẻ.



Hình 1. Hình ảnh tổng quan về kính hiển vi Olympus

3.2. Các bước tiến hành cơ bản

Trước khi tiến hành, thiết bị và các dụng cụ phải được vệ sinh sạch sẽ, đảm bảo không có các tiểu phân gây ảnh hưởng đến kết quả của phép thử.

3.2.1. Chuẩn bị buồng thổi khí sạch

Sau khi cắm nguồn điện, đợi tủ làm ẩm không khí và quạt thổi các tiểu phân bên trong ra ngoài, bật ổ điện cho kính hiển vi và đèn, có thể bật đèn UV trước khoảng 30 phút để loại các vi sinh vật có mặt [3].

3.2.2. Chuẩn bị mẫu

Ngay trước khi tiến hành, tráng rửa dụng cụ bằng nước không có tiểu phân (trừ màng lọc) theo thứ tự từ trên xuống dưới, từ ngoài vào trong.

- **Mẫu trắng:** Lọc 50 ml nước không có tiểu phân qua màng lọc, đặt màng lọc trên đĩa petri và để khô màng lọc trong bình hút ẩm.

- **Mẫu thử:** Chuẩn bị theo chuyên luận, lọc, chú ý phân bố lượng tiểu phân đều trên bề mặt màng lọc, đặt màng lọc trên đĩa petri và để khô màng lọc trong bình hút ẩm.

Rửa sạch dụng cụ bằng chất tẩy rửa ẩm; phễu lọc cần để khô, ngâm trong acid sulfocromic, tráng rửa sạch bằng nước RO và tráng lại bằng nước không có tiểu phân [3].

3.2.3. Tiến hành đo mẫu và xử lý kết quả trên phần mềm phân tích

Các bước thao tác cơ bản bao gồm: chuyển bàn di mẫu đến vị trí thích hợp, bật công tắc điện trên thân máy kính hiển vi, bật máy tính, vào phần mềm Olympus

Particle Inspector. Đưa màng lọc đã làm khô vào gá màng lọc rồi đưa vào vị trí trên bàn di mẫu. Sau khi đặt giới hạn cho bàn di mẫu thì tiến hành cài đặt phương pháp.

Các bước chính để cài đặt phương pháp: chọn chế độ quét vòng tròn 3 điểm (circle) hoặc các chế độ khác tùy vào mục đích quét nhưng thường chọn chế độ circle; sau đó tiến hành cài đặt để loại bỏ các tiểu phân nhỏ hay loại bỏ các tiểu phân dạng sợi (fiber); chọn tiêu chuẩn đánh giá. Chọn ngưỡng phát hiện tiểu phân tại thanh “thresholds” trên thanh công cụ. Cài đặt tên mẫu mới. Sau khi bấm “start”, máy sẽ báo “focus” một số điểm. Tiến hành “focus” lần lượt các điểm theo yêu cầu. Sau khi hoàn tất các điểm máy sẽ tự động quét toàn bộ bề mặt màng lọc để xác định tiểu phân. Ngay sau khi máy hoàn thành việc quét tiểu phân cần tiến hành xử lý kết quả [3].

4. Ứng dụng thực tế, xác định tiểu phân của một chế phẩm bằng 2 phương pháp để so sánh

* **Đối tượng thí nghiệm:** Dung dịch Hetopartat (Số lô: 01417, NXS: 26/4/2017, HD: 26/4/2020) của Nhà sản xuất: Công ty Cổ phần Dược Danapha.

* **Chuẩn bị mẫu:**

- **Mẫu 1:** Tiến hành trên máy xác định kích thước tiểu phân trong dung dịch PAMAS (đã được hiệu chuẩn). Mẫu được chuẩn bị như sau: trộn đều thể tích của 5 ống chế phẩm (thể tích mỗi ống là 10 ml), siêu âm nhẹ 15 giây để loại bọt khí.

- **Mẫu 2:** Tiến hành trên thiết bị xác định kích thước tiểu phân sử dụng kính hiển vi (đã được hiệu chuẩn). Lọc 1 ống chế phẩm (thể tích 10 ml), đặt màng lọc trên đĩa petri và để khô màng lọc trong bình hút ẩm.

* **Tiến hành:**

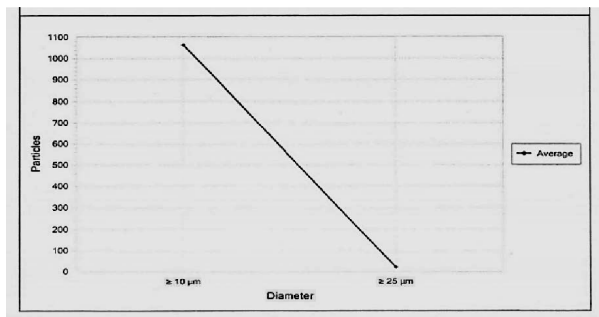
Trên thiết bị đo kích thước tiểu phân trong dung dịch (PAMAS): Tiến hành đo 4 lần, mỗi lần 5 ml, loại bỏ kết quả lần 1, lấy trung bình kết quả của 3 lần đo sau. Đếm số tiểu phân có kích thước $\geq 10 \mu\text{m}$ và $\geq 25 \mu\text{m}$ trong 01 đơn vị chế phẩm.

Trên kính hiển vi (OLYMPUS): Tiến hành quét mẫu trên màng lọc đã được chuẩn bị ở vật kính có độ phóng đại 10x. Đếm số tiểu phân có kích thước $\geq 10 \mu\text{m}$ và $\geq 25 \mu\text{m}$ trong 01 đơn vị chế phẩm.

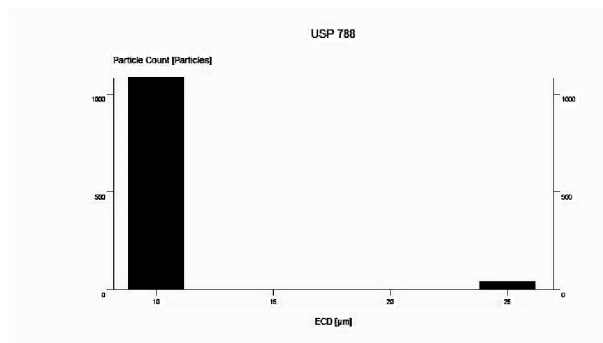
Kết quả đo kích thước tiểu phân bằng hai phương pháp thể hiện ở Bảng 1.

Bảng 1. Kết quả đo kích thước tiểu phân bằng hai phương pháp

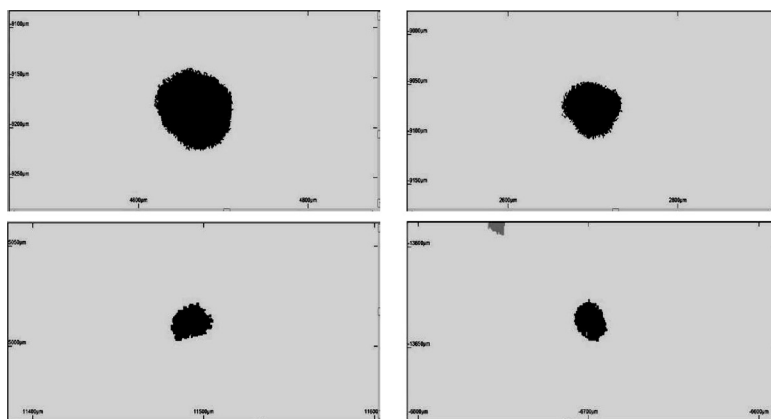
	Đo KTTT trong dung dịch Pamas		Đo KTTT bằng kính hiển vi Olympus	
	Kết quả	Yêu cầu	Kết quả	Yêu cầu
Tiểu phân $\geq 10 \mu\text{m}/\text{l}$	1065	≤ 6000 tiểu phân	1086	≤ 3000 tiểu phân
Tiểu phân $\geq 25 \mu\text{m}/\text{l}$	23	≤ 600 tiểu phân	39	≤ 300 tiểu phân
Kết luận		Đạt		Đạt



Hình 2. Kết quả xác định kích thước tiểu phân trên máy PAMAS



Hình 3. Kết quả xác định kích thước tiểu phân trên kính hiển vi



Hình 4. Một số hình ảnh hạt tiểu phân đặc trưng xác định được trên kính hiển vi

Nhận xét: Dựa vào kết quả so sánh trên 2 thiết bị đo khác nhau cho thấy hai phương pháp xác định giới hạn tiểu phân không nhìn thấy bằng mắt thường có sự tương đồng về kết quả.

Tài liệu tham khảo

1. Bộ Y tế (2017), *Dược điển Việt Nam*, Lần xuất bản thứ năm, Phụ lục 11.8 “Xác định giới hạn tiểu phân”.
2. The British Pharmacopoeia Commission (2018), *British Pharmacopoeia*, “Particulate Contamination: Sub- visible Particles (Appendix XIII A)”.
3. Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương- Khoa Kiểm nghiệm các dạng Bào chế (2018), *Hướng dẫn sử dụng Thiết bị xác định kích thước tiểu phân dùng kính hiển vi* (VKN/HLII/22.03).
4. The United States Pharmacopoeial Convention (2015), *United states Pharmacopoeia 38*, “Particulate Matter in Injections (788)”.
5. Hướng dẫn sử dụng Kính hiển vi Olympus model BX51M.

SUMMARY

“Particulate matter” stated in the current pharmacopoeias is an important parameter for parenteral preparations quality control. To perform this test Vietnamese pharmacopoeia, British pharmacopoeia and the United States pharmacopoeia introduce 2 methods including Method 1- Light obscuration particle count test and Method 2 - Microscopic particle count test. In fact, the second method is used less than the first one and there are not many laboratories equipped with microscope. So the understanding about it is limited. This article focuses on an overview about methods for particles count test stated in the current Pharmacopoeias, introduction of Olympus microscope and the application of two methods on the same sample. The experimental results showed the similarity of these two methods.

(Ngày nhận bài: 18/3/2019 ; Ngày phản biện: 04/03/2020 ; Ngày duyệt đăng: 21/08/2020)

MỤC LỤC

	Trang
● Quản lý - Trao đổi nghiệp vụ	
- Định hướng công tác kiểm tra và giám sát chất lượng thuốc năm 2021.	
PGS. TS. ĐOÀN CAO SƠN – VIỆN TRƯỞNG VIỆN KIỂM NGHIỆM THUỐC TRUNG ƯƠNG	1
● Nghiên cứu khoa học	
- Xây dựng và thẩm định quy trình định lượng đồng thời Guaifenesin, Bromhexin hydroclorid và Kali sorbat trong siro ho bằng kỹ thuật sắc ký lỏng pha đảo.	
NGUYỄN THỊ HỒNG, NGUYỄN VĂN BÌNH, DƯƠNG MINH TÂN, LÊ QUANG THẢO	2
- Xây dựng quy trình xác định giới hạn tạp chất liên quan trong nguyên liệu Polyphyllin D phân lập được từ cây Bảy lá một hoa bằng phương pháp HPLC.	
CAO NGỌC ANH, HOÀNG THỊ THANH THẢO, ĐỖ THỊ HẠ, THÁI NGUYỄN HÙNG THU	9
- Xây dựng phương pháp phát hiện đồng thời 13 Corticoid dùng trái phép trong mỹ phẩm bằng sắc ký lỏng kết nối khối phổ (LC-MS/MS).	
NGÔ THỊ DUYÊN, NGUYỄN VĂN HẠ, NGUYỄN VĂN BÌNH, DƯƠNG THỊ KHÁNH HUYỀN, LÊ ĐÌNH CHI, TẠ MẠNH HÙNG	15
- Định lượng Risperidon trong huyết tương người bằng phương pháp LC-MS/MS.	
LÊ ĐÌNH KHÁNH, HOÀNG VĂN ĐỨC, TẠ MẠNH HÙNG, ĐOÀN CAO SƠN	24
● Thông tin khoa học - Tin tức	
- Giới thiệu phương pháp xác định giới hạn kích thước tiểu phân bằng kính hiển vi theo quy định trong dược điển.	
NGUYỄN THU PHƯƠNG, NGUYỄN HỮU THẢO, TRẦN THỊ HỒNG ANH	29

CONTENTS

	Page
● Management - Professional exchange	
- Objectives and activities of the drug quality control and monitoring for the year 2021.	
Associate Prof. ĐOÀN CAO SƠN, Ph.D., Director of NIDQC	1
● Scientific researches	
- Development and validation of the procedure for simultaneous determination of Guaifenesin, Bromhexine hydrochloride and Potassium sorbate in cough syrup by Reverse Phase Liquid Chromatography technique.	
NGUYỄN THỊ HỒNG, NGUYỄN VĂN BÌNH, DƯƠNG MINH TÂN, LÊ QUANG THẢO	2
- Development a process for determination the limits of related substances in Polyphyllin D raw materials, isolated from “Bảy lá một hoa - <i>Paris polyphylla</i> var. <i>Chinensis</i> Smith.” plant by HPLC method.	
CAO NGỌC ANH, HOÀNG THỊ THANH THẢO, ĐỖ THỊ HẠ, THÁI NGUYỄN HÙNG THU	9
- Development a method of simultaneous identification of 13 Glucocorticoids illegally used in cosmetics by LC-MS/MS.	
NGÔ THỊ DUYÊN, NGUYỄN VĂN HẠ, NGUYỄN VĂN BÌNH, DƯƠNG THỊ KHÁNH HUYỀN, LÊ ĐÌNH CHI, TẠ MẠNH HÙNG	15
Determination of Risperidon in human plasma by LC-MS/MS method.	
LÊ ĐÌNH KHÁNH, HOÀNG VĂN ĐỨC, TẠ MẠNH HÙNG, ĐOÀN CAO SƠN	24
● Technical information – News	
- Introduction of the method of determining the particle size limit by microscope specified in Pharmacopeia.	
NGUYỄN THU PHƯƠNG, NGUYỄN HỮU THẢO, TRẦN THỊ HỒNG ANH	29