

VIỆN KIỂM NGHIỆM THUỐC TRUNG ƯƠNG

ISSN 1859 - 0055

TẠP CHÍ
**KIỂM
NGHIỆM
thuốc**

JOURNAL OF DRUG QUALITY CONTROL

SỐ 1.2022

TẬP 20-SỐ 75

NATIONAL INSTITUTE OF DRUG QUALITY CONTROL

48 HAI BA TRUNG - HOAN KIEM - HA NOI - VIETNAM

TEL: (+84-24).39363794 * FAX: (+84-24).38256911 * E-MAIL: tapchiknt@nidqc.gov.vn

TẠP CHÍ KIỂM NGHIỆM THUỐC SỐ 1/2022

JOURNAL OF DRUG QUALITY CONTROL N^o 1/2022

XUẤT BẢN TỪ NĂM 2003

Tổng biên tập: PGS. TS. ĐOÀN CAO SƠN

Phó tổng biên tập: PGS. TS. TRỊNH VĂN LẦU

Thư ký biên tập: ThS. BÙI VĂN TRUNG

Trị sự: ThS. BÙI VĂN TRUNG

Hội đồng Biên tập:

- PGS. TS. ĐOÀN CAO SƠN
- TS. LÊ QUANG THẢO
- ThS. NGUYỄN ĐĂNG LÂM
- TS. TRẦN THỊ HỒNG ANH
- ThS. NGUYỄN TUẤN ANH
- ThS. BÙI VĂN TRUNG
- ThS. NGUYỄN VĂN HÀ
- ThS. TRẦN THÚY HẠNH
- ThS. LỤC THỊ THU HẰNG
- ThS. TRẦN HOÀNG
- ThS. NGUYỄN THỊ VĨNH HỒNG
- TS. NGUYỄN THỊ LIÊN
- ThS. NGUYỄN THỊ PHƯƠNG THẢO
- ThS. LÊ THỊ THU
- ThS. TRẦN THỊ BÍCH VÂN
- PGS. TS. TRẦN VIỆT HÙNG
- TS. TẠ MẠNH HÙNG
- PGS.TS. TRỊNH VĂN LẦU
- TS. LÊ THỊ HƯỜNG HOA
- TS. ĐẶNG VĂN KHÁNH
- PGS. TS. NGUYỄN THỊ KIỀU ANH
- TS. PHẠM QUỐC CHINH
- PGS. TS. LÊ THỊ HỒNG HẢO
- GS. TS. THÁI NGUYỄN HÙNG THU

In 1.000 cuốn khổ 19 x 27cm tại Công ty TNHH MTV In Tạp chí Cộng sản.

Giấy phép xuất bản số 333/GP-BTTTT ngày 23/8/2013 của Bộ Thông tin và Truyền thông.

In xong và nộp lưu chiểu tháng 04 năm 2022.

ĐỊNH HƯỚNG NHIỆM VỤ CÔNG TÁC KIỂM TRA VÀ GIÁM SÁT CHẤT LƯỢNG NĂM 2022

PGS.TS. ĐOÀN CAO SƠN

Viện trưởng Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương

Năm 2021 là năm mà dịch bệnh Covid-19 ảnh hưởng nặng nề nhất tới mọi mặt của đời sống kinh tế - xã hội. Mặc dù vậy, 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 (0,92 %), tỷ lệ thuốc giả thấp so với các nước trong khu vực (0,06%, không tính dược 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 04 tập thể và 28 cá nhân đã có thành tích xuất sắc trong công tác kiểm tra, giám sát và đảm bảo chất lượng thuốc năm 2021. Viện Kiểm nghiệm thuốc TP. Hồ Chí Minh được đề nghị tặng Cờ thi đua của Chính phủ. Các đơn vị gồm Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương, TTKN Bình Phước, TTKN Hà Giang, TTKN Đắk Lắk, TTKN Tây Ninh và TTKN Yên Bái được đề nghị tặng Cờ thi đua của Bộ Y tế.

Về năng lực của Hệ thống kiểm nghiệm: Đến nay toàn hệ thống đã có 21 đơn vị đạt tiêu chuẩn GLP và 57 đơn vị đạt tiêu chuẩn ISO/IEC-17025.

Hội thảo tổng kết công tác kiểm tra, giám sát chất lượng thuốc năm 2021 tại Hà Nội vào ngày 25 tháng 3 năm 2022 đã nhất trí đề ra định hướng công tác và các nhiệm vụ trọng tâm cho Hệ thống kiểm nghiệm năm 2022.

Theo đó, Hệ thống kiểm nghiệm cần phải phát huy những thành tích đã đạt được trong năm 2021, phấn đấu vượt qua những tồn tại và thách thức để thực hiện tốt nhiệm vụ kiểm tra, giám sát chất lượng thuốc phục vụ công tác bảo vệ, chăm sóc và nâng cao sức khỏe nhân

dân trong tình hình mới và hưởng ứng chương trình vận động người Việt Nam ưu tiên dùng thuốc Việt Nam của Bộ trưởng Bộ Y tế, trong tình hình dịch bệnh đang diễn biến phức tạp. Hệ thống kiểm nghiệm Nhà nước và các doanh nghiệp cần triển khai các nhiệm vụ trọng tâm sau:

1. Định hướng công tác

- Tiếp tục thực hiện tốt 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 trong năm 2020, 2021 để các đơn vị trong Hệ thống Kiểm nghiệm có định hướng xây dựng kế hoạch lấy mẫu.

- Xây dựng và triển khai Dự án đầu tư nâng cao năng lực của Hệ thống Kiểm nghiệm thuốc theo “Kế hoạch triển khai thực hiện Chương trình phát triển công nghiệp dược, dược liệu sản xuất trong nước đến năm 2030, tầm nhìn đến năm 2045 theo Quyết định số 376/QĐ-TTg ngày 17 tháng 3 năm 2021 của Thủ tướng Chính phủ”.

- 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 còn lại để các Trung tâm này đạt tiêu chuẩn ISO/IEC-17025 và GLP.

- Tăng cường thiết lập chất chuẩn, chất đối chiếu để mở rộng danh mục hoạt chất được kiểm soát chất lượng, đặc biệt là các thuốc điều trị Covid-19.

2. Nhiệm vụ trọng tâm

2.1. Đối với Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương và Viện Kiểm nghiệm thuốc Tp Hồ chí Minh

- Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương làm đầu mối phối hợp với các Vụ/Cục liên quan xây dựng và triển khai Dự án đầu tư nâng cao năng lực của Hệ thống kiểm nghiệm thuốc theo “Kế hoạch triển khai thực hiện

Chương trình phát triển công nghiệp dược, dược liệu sản xuất trong nước đến năm 2030, tầm nhìn đến năm 2045 theo Quyết định số 376/QĐ-TTg ngày 17 tháng 3 năm 2021 của Thủ tướng Chính phủ”.

- Cùng cố và nâng cấp Trung tâm đánh giá tương đương sinh học ở 2 Viện theo theo chuẩn mực Quốc tế và Khu vực.

- Tổ chức các lớp đào tạo, tập huấn kỹ thuật kiểm nghiệm thuốc – mỹ phẩm và quản lý phòng thí nghiệm.

- 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

- Phối hợp với Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương trong xây dựng và triển khai Dự án đầu tư nâng cao năng lực của Hệ thống kiểm nghiệm thuốc theo “Kế hoạch triển khai thực hiện Chương trình phát triển công nghiệp dược, dược liệu sản xuất trong nước đến năm 2030, tầm nhìn đến năm 2045 theo Quyết định số 376/QĐ-TTg ngày 17 tháng 3 năm 2021 của Thủ tướng Chính phủ”.

- Xây dựng và thực hiện kế hoạch lấy mẫu theo định hướng và chỉ đạo chuyên môn của Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương, chú trọng lấy mẫu thuốc điều trị Covid-19.

- 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 và xây dựng định hướng kế hoạch lấy mẫu 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, cập nhật các tiêu chuẩn chất lượng thuốc cho phù hợp với Dược điển Việt Nam V và phiên bản mới các Dược điển hiện hành.

- Chú trọng kiểm tra chất lượng nguyên liệu, thành phẩm các thuốc có thông báo về nguy cơ cần kiểm soát các tiêu chí ngoài Dược điển (như tạp nitrosamin, ...).

- 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.

- Tiếp tục theo dõi độ ổn định của sản phẩm trong quá trình lưu hành nhằm hạn chế sự biến đổi chất lượng khi lưu thông trên thị trường.

NGHIÊN CỨU KHOA HỌC

XÂY DỰNG QUY TRÌNH XÁC ĐỊNH GIỚI HẠN TẠP CHẤT LIÊN QUAN TẠP A CỦA FENOFIBRAT [(4-CLOROPHENYL) (4-HYDROXYPHENYL)METHANON] BẰNG PHƯƠNG PHÁP HPLC

NGUYỄN THỊ HỒNG, VŨ HÀ KHUÊ, NGUYỄN THỊ LIÊN✉

Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương

Từ khóa: Tạp chất liên quan, RP-HPLC, (4-clophenyl)(4-hydrophenyl)methanon

1. Đặt vấn đề

Fenofibrat là một dẫn chất của acid fibric, có tác dụng hạ lipid máu (gồm cholesterol và triglycerid), ngoài ra còn có tác dụng làm giảm acid uric máu do làm tăng đào thải acid uric qua nước tiểu. Thuốc được chỉ định sử dụng trong điều trị tăng lipid máu, bao gồm cả bệnh nhân bị tăng huyết áp hay bị tiểu đường có kèm tăng lipid máu [1]. Đây là những bệnh mãn tính có thời

gian sử dụng kéo dài, vì vậy việc kiểm soát chất lượng thuốc, đặc biệt là kiểm soát các tạp chất rất quan trọng nhằm hạn chế các độc tính do các tạp chất gây ra. Tạp A của fenofibrat, [(4-chlorophenyl)(4-hydroxyphenyl)methanon], là sản phẩm trung gian của quá trình tổng hợp fenofibrat.

Để kiểm soát chất lượng của nguyên liệu cũng như các chế phẩm chứa hoạt chất fenofibrat, bên cạnh chất

chuẩn fenofibrat, Dược điển Anh, Dược điển Việt Nam, Dược điển Mỹ, Dược điển Châu Âu qui định sử dụng các chất chuẩn tạp của fenofibrat, trong đó có tạp A của fenofibrat để đánh giá sự phù hợp của hệ thống sắc ký và làm chất đối chiếu để định lượng tạp A của fenofibrat trong nguyên liệu và thành phẩm thuốc.

Nhằm góp phần nâng cao năng lực kiểm tra, giám sát chất lượng thuốc phục vụ chăm sóc sức khỏe cộng đồng, nhóm nghiên cứu đã tiến hành xây dựng và thẩm định qui trình xác định tạp chất liên quan (4-chlorophenyl) (4-hydroxyphenyl)methanon (tạp A của fenofibrat) phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC).

2. Thực nghiệm

2.1. Thiết bị, dụng cụ, hóa chất, chất chuẩn và đối tượng nghiên cứu

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 (100 x 4,6 mm; 3,5 μ m); cân phân tích Mettler MS105; cân phân tích Mettler XPE26; 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, acetonitril, acid phosphoric: đạt tiêu chuẩn HPLC và PA.

(4-chlorophenyl)(4-methoxyphenyl)methanon: là sản phẩm trung gian của quá trình tổng hợp tạp A của fenofibrat, được tổng hợp từ anisol và p- clorobenzoyl clorid.

Chất chuẩn:

+ Fenofibrat related compound A USPRS lot: F0F021, hàm lượng 100 %

+ Fenofibrat related compound B USPRS lot: F0F022, hàm lượng 100 %

2.1.3. Đối tượng nghiên cứu

(4-chlorophenyl)(4-hydroxyphenyl)methanon (tạp A của fenofibrat), được tổng hợp và tinh chế từ hợp chất anisol.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Điều kiện sắc ký

Dựa trên các tài liệu tham khảo Dược điển Anh 2020, Dược điển Châu Âu 9.2, Dược điển Việt Nam V, Dược điển Mỹ 41, COA chuẩn tạp A của fenofibrat (Mikromol) [7] 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, khảo sát bước sóng... nhóm nghiên cứu đã lựa chọn được điều kiện sắc ký như sau:

- Cột: C18 (100 x 4,6 mm; 3,5 μ m);

- Detector: UV, đặt ở bước sóng 210 nm;

- Tốc độ dòng: 1,0 ml/phút.

- Thể tích tiêm: 10 μ l.

- Thời gian chạy: 5 lần thời gian lưu của pic tạp A của fenofibrat.

- Pha động: Nước được điều chỉnh pH 2,5 với acid phosphoric loãng - acetonitril (55 : 45)

- Dung môi pha mẫu: Methanol

2.2.2. Phương pháp xử lý mẫu

- Mẫu trắng: Methanol

- Dung dịch thử: Dung dịch tạp chất A của fenofibrat 0,5 mg/ml trong methanol.

- Dung dịch chuẩn: Dung dịch tạp chất A chuẩn của fenofibrat 0,5 mg/ml trong methanol.

- Dung dịch tạp chất B của fenofibrat: Dung dịch tạp chất B chuẩn của fenofibrat 0,05 mg/ml trong methanol

- Dung dịch (4-clophenyl-4-methoxyphenyl)methanon: Dung dịch (4-clophenyl-4-methoxyphenyl)methanon 0,05 mg/ml trong methanol

- Dung dịch Spike: Cân chính xác khoảng 25 mg nguyên liệu tạp chất A của fenofibrat vào bình định mức 50 ml; thêm 5,0 ml mỗi dung dịch tạp chất B của fenofibrat và dung dịch (4-clophenyl-4-methoxyphenyl)methanon, hòa tan và pha loãng với methanol vừa đủ đến vạch.

- Dung dịch đối chiếu: Hút chính xác 1,0 ml dung dịch thử, pha loãng thành 100,0 ml với methanol.

- Dung dịch kiểm tra hệ thống: Cân chính xác khoảng 1 mg chuẩn tạp chất B của fenofibrat và 1 mg chuẩn tạp chất A của fenofibrat, hòa tan và pha loãng thành 20,0 ml với methanol.

* Các dung dịch phân hủy đánh giá độ đặc hiệu:

- Phân hủy bởi tia UV: Dung dịch tạp chất A của fenofibrat 0,5 mg/ml trong methanol, đem phân hủy dưới ánh sáng UV trong 24 giờ.

- Phân hủy bởi nhiệt độ: Dung dịch tạp chất A của fenofibrat 0,5 mg/ml trong methanol, đun cách thủy ở 80 °C trong 120 phút.

- Phân hủy trong môi trường kiềm: Cân chính xác khoảng 25 mg nguyên liệu tạp chất A của fenofibrat, hòa tan và pha loãng trong methanol thành 50 ml, thêm vào 1 ml NaOH 0,1 N, để trong 60 phút.

- *Phân hủy trong môi trường acid*: Cân chính xác khoảng 25 mg nguyên liệu tạp chất A của fenofibrat, hòa tan và pha loãng trong methanol thành 50 ml, thêm vào 1ml HCl 0,1N, để trong 60 phút.

- *Phân hủy bởi tác nhân oxy hóa*: Cân chính xác khoảng 25 mg nguyên liệu tạp chất A của fenofibrat, hòa tan và pha loãng trong methanol thành 50 ml, thêm vào 1ml H₂O₂ 3 %, để trong 60 phút.

Kiểm tra tính thích hợp của hệ thống: Tiến hành sắc ký với *Dung dịch kiểm tra hệ thống*, thứ tự rửa giải của hai pic lần lượt là tạp A của fenofibrat, tạp B của fenofibrat; hệ số phân giải giữa hai pic không được nhỏ hơn 3,0.

Tiêm 10 µl các dung dịch chuẩn, dung dịch thử, dung dịch đối chiếu, dung dịch tạp B của fenofibrat, dung dịch (4-clophenyl-4-methoxyphenyl)methanon, dung dịch kiểm tra hệ thống, dung dịch Spike và các dung dịch phân hủy vào hệ thống sắc ký. Ghi lại sắc ký đồ và đáp ứng của pic chính trong các dung dịch trên.

Do (4-clophenyl-4-hydroxyphenyl)methanon (tạp A của fenofibrat), được tổng hợp và tinh chế từ hợp chất anisol và 4-clorobenzoyl clorid, với sản phẩm trung gian là (4-clophenyl-4-methoxyphenyl)methanon, nên (4-clophenyl-4-methoxyphenyl)methanon được thêm vào trong dung dịch Spike để đánh giá khả năng tách các pic tạp ra khỏi pic chính của hệ thống. Do (4-clophenyl-4-hydroxyphenyl)methanon (tạp A của fenofibrat) có gốc OH phenol, là nhóm chức rất dễ bị tác động của các yếu tố môi trường bên ngoài: ánh sáng, nhiệt độ, các tác nhân oxy hóa, acid hay base, do đó chúng tôi tiến hành đánh giá độ đặc hiệu trong các điều kiện phân hủy khắc nghiệt.

2.2.3. Giới hạn tạp chất

- Trên SKĐ thu được từ dung dịch thử, diện tích của bất kỳ pic phụ nào, ngoài pic chính, không được lớn hơn diện tích pic chính trong dung dịch đối chiếu (1,0 %).

- Tổng diện tích của các pic phụ, ngoài pic chính, không được lớn hơn 2 lần diện tích pic chính trong dung dịch đối chiếu (2,0 %).

Đối với các tạp chuẩn dùng trong các phép thử HPLC và GC, độ tinh khiết yêu cầu ≥ 95 % [6]. Trong đề tài tổng hợp tạp A của fenofibrat chúng tôi đang nghiên cứu, mục tiêu tổng hợp được tạp A của fenofibrat có độ tinh khiết ≥ 98 %, do đó chúng tôi xây dựng tiêu chuẩn về giới hạn tạp: mỗi tạp $\leq 1,0$ %, tổng tạp $\leq 2,0$ %.

2.2.3. 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 đặc hiệu, độ thích hợp hệ thống, độ tuyến tính, giới hạn phát hiện, giới hạn định lượng, độ lặp lại [5].

3. Kết quả và bàn luận

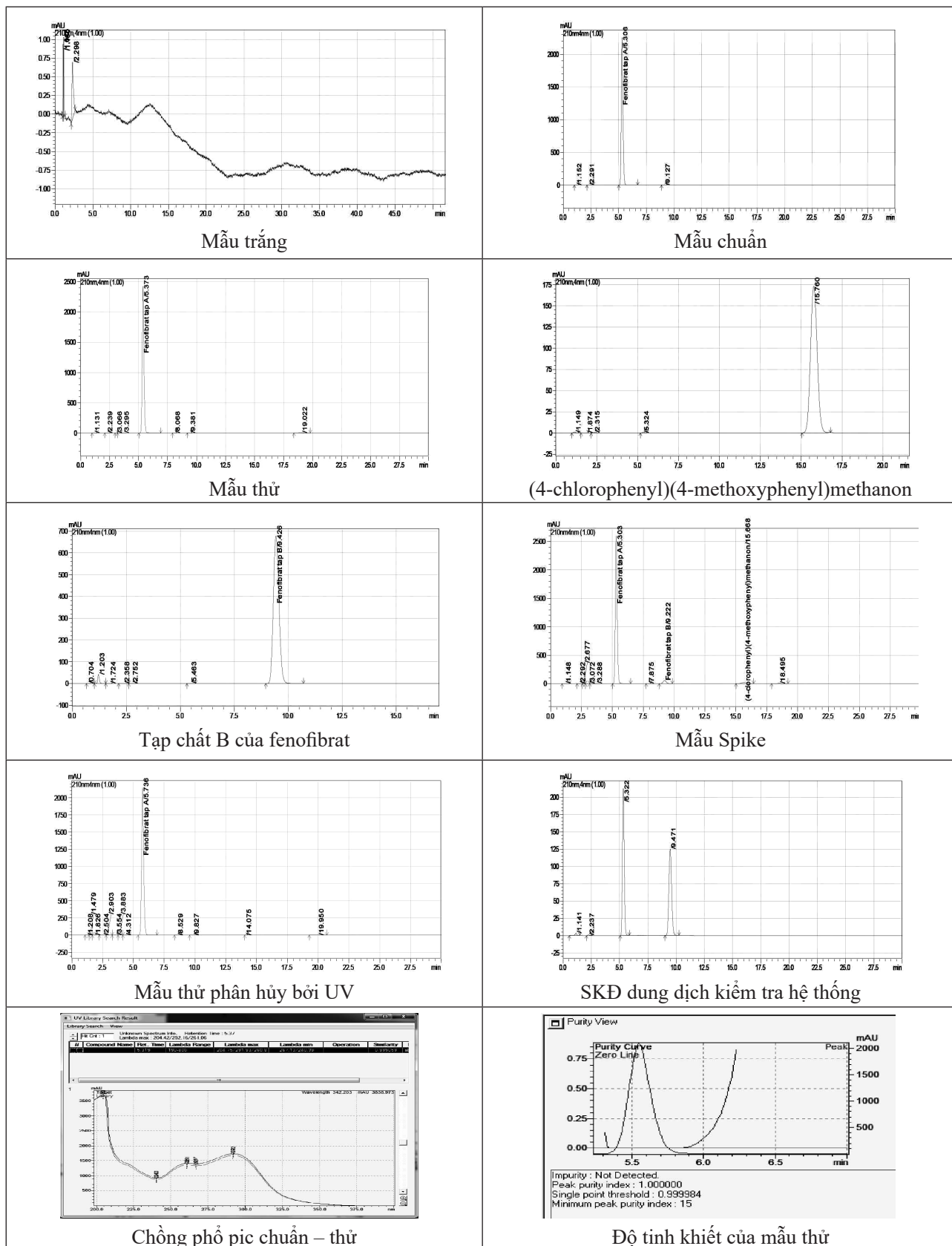
3.1. Lựa chọn điều kiện sắc ký

Tiến hành sắc ký các dung dịch chuẩn, thử, dung dịch tạp B của fenofibrat, dung dịch (4-clophenyl-4-methoxyphenyl)methanon, dung dịch Spike, các dung dịch phân hủy đã được xây dựng theo mục 2.2.1; sắc ký đồ thu được của các dung dịch thể hiện ở **Hình 1**. Thứ tự rửa giải của các pic được xác định bằng cách tiêm dung dịch chuẩn đơn của từng chất, lần lượt là tạp A của fenofibrat, tạp B của fenofibrat, (4-clophenyl-4-methoxyphenyl)methanon; 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. Độ đặc hiệu

Tiêm lần lượt các dung dịch như sau: Mẫu trắng, dung dịch chuẩn tạp A của fenofibrat, dung dịch thử, dung dịch tạp B của fenofibrat, dung dịch (4-clophenyl-4-methoxyphenyl)methanon, dung dịch Spike và các dung dịch phân hủy vào hệ thống sắc ký. Trên sắc ký đồ thu được từ chương trình sắc ký, pic mẫu trắng không xuất hiện pic có thời gian lưu tương ứng với pic tạp A của fenofibrat thu được từ dung dịch chuẩn, dung dịch thử tạp A của fenofibrat có thời gian lưu (khoảng 5,37 phút) tương ứng với pic tạp A của fenofibrat trong dung dịch chuẩn (khoảng 5,31 phút), pic chính trên SKĐ của dung dịch tạp B của fenofibrat có thời gian lưu 9,43 phút, pic chính trên SKĐ của dung dịch (4-clophenyl-4-methoxyphenyl)methanon có thời gian lưu 15,76 phút. Các pic trong dung dịch Spike tách rõ ràng; trên SKĐ của các dung dịch phân hủy, các pic tạp tách hoàn toàn ra khỏi pic chính, pic chính đạt yêu cầu về độ tinh khiết. Quét phổ hấp thụ tử ngoại khả kiến của các dung dịch chuẩn và dung dịch thử với detector UV cho thấy, quang phổ hấp thụ tử ngoại khả kiến của 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 dung dịch chuẩn tương ứng, hệ số chồng phổ giữa chuẩn và thử bằng 0,999059. Độ tinh khiết của pic chính trên SKĐ dung dịch thử bằng 0,999988 (**Hình 1**)



Hình 1. Sắc ký đồ thẩm định độ đặc hiệu

Với các điều kiện sắc ký như trên và từ các kết quả thu được đã chứng tỏ phương pháp đạt yêu cầu về độ đặc hiệu.

3.2.2. Tính thích hợp của hệ thống

Tính thích hợp của hệ thống sắc ký được xác định bằng cách tiêm lặp lại 6 lần dung dịch đối chiếu và dung dịch kiểm tra hệ thống. Ghi lại các giá trị về thời gian lưu, diện tích pic, độ cân xứng pic (T) và độ phân giải giữa 2 pic (R) trong dung dịch kiểm tra hệ thống.

Kết quả:

- Độ phân giải giữa 2 pic tạp A của fenofibrat và tạp B của fenofibrat trên sắc ký đồ dung dịch kiểm tra hệ thống là $10,9 > 3,0$.

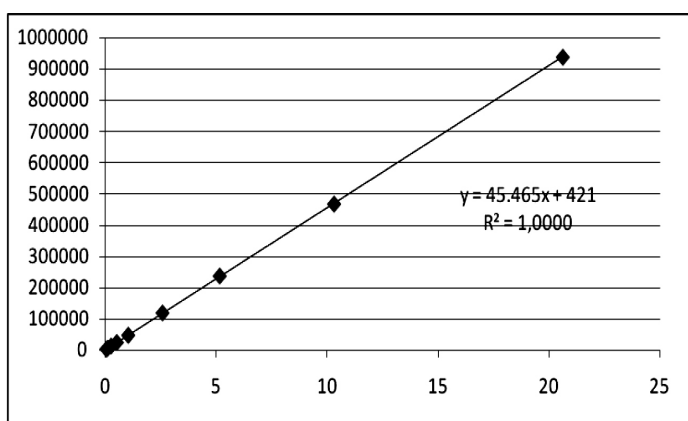
- Các giá trị T, N, T_R và diện tích pic của 6 lần tiêm dung dịch đối chiếu đều đạt yêu cầu ($0,8 < T = 1,168$,

$1,5$; $N = 4794 > 1500$; $RSD_S = 0,17 \% < 2,0 \%$; $RSD_{Tr} = 0,12 \% < 1,0 \%$). Quy trình thử đạt yêu cầu về độ thích hợp hệ thống.

3.2.3. Độ tuyến tính

Từ dung dịch chuẩn gốc tạp A của fenofibrat (5,154 mg/10,0 ml methanol $\sim 0,5154$ mg/ml), pha loãng thành các dung dịch tạp A của fenofibrat có các nồng độ khoảng 20; 10; 5; 2,5; 1; 0,5; 0,25; 0,1 và 0,05 $\mu\text{g/ml}$ trong methanol tương ứng với 400 %; 200 %; 100 %; 50 %; 20 %; 10 %; 5 %; 2 % và 1 % nồng độ giới hạn mỗi tạp, với giới hạn cho phép của mỗi tạp $\leq 1,0 \%$ (tương ứng với nồng độ 5 $\mu\text{g/ml}$).

Tiến hành sắc ký các dung dịch chuẩn, ghi lại sắc ký đồ và đáp ứng của pic. Kết quả thể hiện ở hình sau:



Hình 2. Đồ thị biểu diễn mối tương quan tuyến tính giữa nồng độ tạp chất A của fenofibrat và diện tích pic

Phương trình hồi quy: $y = 45465x + 421$

Hệ số tương quan $r = 1,0000$

Hệ số chặn Y = 0,18 %

Kết quả khảo sát cho thấy trong khoảng nồng độ từ 0,05 $\mu\text{g/ml}$ đến 20 $\mu\text{g/ml}$ (400 % so với nồng độ giới hạn mỗi tạp), có sự liên quan chặt chẽ giữa nồng độ và diện tích pic, hệ số tương quan $r = 1,0000$, phần trăm hệ số chặn tại nồng độ 100 % là $0,18 \% < 5,0 \%$

3.2.4. Giới hạn phát hiện, giới hạn định lượng

Từ kết quả khảo sát độ tuyến tính, tiến hành phân tích thống kê ANOVA với độ tin cậy 95 % cho kết quả như sau: độ lệch chuẩn số dư $\sigma = 427,4$; độ dốc đường chuẩn: **45465**, giá trị LOD và LOQ như sau:

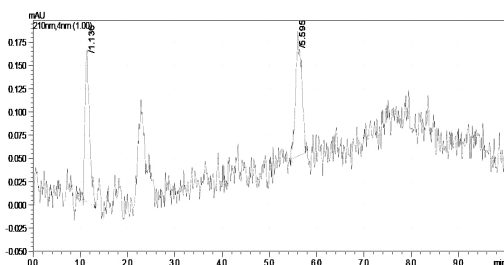
$LOD = (3,3 \times 427,4) / 45465 = 0,031$ ($\mu\text{g/ml}$);

$LOQ = 3 \times LOD = 0,093$ ($\mu\text{g/ml}$)

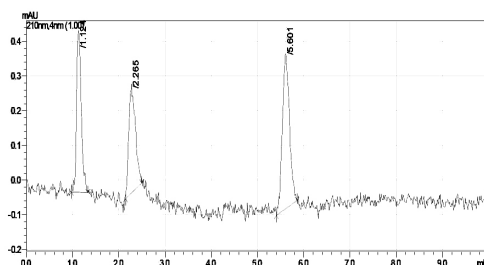
Thực nghiệm xác nhận sự phù hợp các giá trị LOD và LOQ:

- Dung dịch LOD: Cân 6,216 mg chuẩn tạp chất A của fenofibrat vào bình định mức 20 ml. Hòa tan và thêm vừa đủ với methanol. Hút 1,0 ml dung dịch này pha loãng với methanol vừa đủ 100 ml. Tiếp tục hút chính xác 1,0 ml dung dịch thu được vào bình định mức 100 ml, thêm methanol vừa đủ đến vạch. Lắc đều, lọc qua màng 0,45 μm .

- Dung dịch LOQ: Cân 6,216 mg chuẩn tạp chất A của fenofibrat vào bình định mức 20 ml. Hòa tan và thêm vừa đủ với methanol. Hút 1,0 ml dung dịch này pha loãng với methanol vừa đủ 100 ml. Tiếp tục hút chính xác 3,0 ml dung dịch thu được vào bình định mức 100 ml, thêm methanol vừa đủ đến vạch. Lắc đều, lọc qua màng 0,45 μm .



SKĐ tạp A của fenofibrat tại nồng độ LOD



SKĐ tạp A của fenofibrat tại nồng độ LOQ

Hình 3. Sắc ký đồ xác định LOD và LOQ

Nhận xét: Giá trị LOD, LOQ có nồng độ rất nhỏ so với nồng độ giới hạn mỗi tạp (1 %; $\approx 5 \mu\text{g/ml}$); tỷ số tín hiệu /nhiều (S/N) của dung dịch LOD 3,75 (>3); độ lặp lại của pic hoạt chất trong dung dịch LOQ: 1,08 % ($< 10,0$ %), tỷ số tín hiệu /nhiều (S/N) của dung dịch LOQ 11,1 (>10). Như vậy, phương pháp đạt yêu cầu về

giới hạn phát hiện và giới hạn định lượng.

3.2.5. Độ lặp lại

Khảo sát trên 6 dung dịch thử, với các điều kiện sắc ký như đã chọn trong mục 2.2.1. Kết quả được ghi trong Bảng 1.

Bảng 1. Kết quả thẩm định độ lặp lại

Mô tả	Thử 1		Thử 2		Thử 3		Thử 4		Thử 5		Thử 6		HL tạp trung bình (%)
Lượng cân (mg)	25,06		25,12		25,09		25,17		25,07		25,05		
TB diện tích pic dung dịch đối chiếu	241745		235148		235877		233729		235962		236544		
T _R tạp (Phút)	S _{tạp} (mAU)	% tạp	S _{tạp} (mAU)	% tạp	S _{tạp} (mAU)	% tạp	S _{tạp} (mAU)	% tạp	S _{tạp} (mAU)	% tạp	S _{tạp} (mAU)	% tạp	
3,13	-	-	-	-	1584	0,007	1493	0,007	1165	0,005	1286	0,006	0,004
3,48	3468	0,015	3321	0,014	3805	0,016	3735	0,016	3407	0,015	3498	0,015	0,015
8,06	-	-	-	-	1280	0,005	-	-	2106	0,009	2266	0,010	0,004
8,66	4593	0,020	2807	0,012	3050	0,013	2691	0,012	-	-	-	-	0,009
10,09	3272	0,014	3444	0,015	2081	0,009	2314	0,010	2024	0,009	2129	0,009	0,011
20,59	100277	0,430	103122	0,440	101327	0,430	91958	0,404	91075	0,401	92156	0,396	0,417
Tổng tạp (%)	0,48		0,48		0,48		0,45		0,44		0,44		0,46

Kết quả phân tích cho thấy, lô nguyên liệu tạp A của fenofibrat xuất hiện 06 tạp, hàm lượng mỗi tạp $< 1,0$ %, tổng các tạp $< 2,0$ %; % RSD của tổng tạp: 4,70 ($< 5,0$ %). Do đó phương pháp đạt yêu cầu về độ lặp lại.

4. Kết luận

Qua khảo nghiên cứu, chúng tôi đã xây dựng được quy trình xác định giới hạn tạp chất liên quan của nguyên liệu tạp A của fenofibrat bằng kỹ thuật sắc ký lỏng hiệu

năng cao trên cột pha đảo với pha động nước được điều chỉnh pH 2,5 bằng acid phosphoric - acetonitril (55 : 45). Phương pháp sử dụng cột C18 (100 x 4,6 mm, 3,5 μm); tốc độ dòng 1,0 ml/phút; thể tích tiêm 10 μl ; detector 210 nm. Phương pháp đã được áp dụng để xác định tạp chất liên quan của lô nguyên liệu tạp A của fenofibrat đã tổng hợp được. Kết quả đã xác định được 06 tạp $\leq 0,42$ %, tổng tạp 0,46 %, đạt yêu cầu về giới hạn của tạp chất liên quan của nguyên liệu tạp A của fenofibrat.

Tài liệu tham khảo

1. Bộ Y tế (2015), *Dược thư quốc gia Việt nam*, Lần xuất bản thứ hai, Nhà xuất bản Y học, tr. 652 - 653.
2. Bộ Y tế (2017), *Dược điển Việt Nam*, Lần xuất bản thứ năm, Nhà xuất bản Y học.
3. The British Pharmacopoeial Convention (2020), *British Pharmacopoeia*.
4. The United States Pharmacopoeial convention (2020), *United states Pharmacopoeia* 42.
5. ICH (2005), "validation of analytical procedures: Text and methodology Q2(R1)", *ICH Harmonized Tripartite guidelines*, Pg.1-13.
6. WHO (2007) "General guidelines for the establishment, maintenance and distribution of chemical reference substances", Annex 3, Pg.66 - 67.
7. LGC Standards (2021), (4-Chlorophenyl)(4-hydroxyphenyl)methanone, <https://www.lgcstandards.com/FR/en/-4-Chlorophenyl-4-hydroxyphenyl-methanone/p/MM0505.01-0025>.

SUMMARY

A Reversed-phase HPLC method for determination of the related substance limit of fenofibrat impurity A was introduced: The chromatographic separation was done in a RP C18 (100 × 4.6 mm; 3.5 μm) column using mixture of 45 volumes of acetonitril, 55 volumes of water acidified to pH 2.5 with phosphoric acid as a mobile phase. The flow rate was maintained at 1.0 ml/min, detector was set up at 210 nm, and injection volume was 10 μl.

The method was validated about the specificity, system suitability, linearity, linearity, accuracy and precision according to ICH (Q2R1) and which had LOD at 0.01 μg/ml. The results showed that the developed method was suitable for analyzing related substances of fenofibrate impurity A.

(Ngày nhận bài: 20/09/2021; Ngày phản biện: 29/09/2021; Ngày duyệt đăng: 08/10/2021)

XÂY DỰNG VÀ THẨM ĐỊNH QUY TRÌNH ĐỊNH LƯỢNG ĐỒNG THỜI DESLO RATADIN VÀ CHẤT BẢO QUẢN NATRI BENZOAT TRONG SIRO HO NGHIÊN CỨU BẰNG KỸ THUẬT SẮC KÝ LỎNG PHA ĐẢO

NGUYỄN VIỆT CHÍNH

Trường Đại học Y Dược Hải Phòng

LÊ QUANG THẢO✉

Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương

Từ khóa: Định lượng đồng thời, Desloratadin, natri benzoat, siro ho, RP-HPLC.

1. Đặt vấn đề

Siro là dạng chế phẩm lỏng đường uống rất phổ biến trên thị trường do có tính ưu việt hơn so với những dạng bào chế thông thường khác như: viên nén, viên nang... Các thuốc dưới dạng bào chế này vừa có khả năng hấp thu nhanh, vừa có thể sử dụng được cho nhiều đối tượng người dùng khác nhau nhờ khả năng che giấu mùi vị của nhiều dược chất khó chịu.

Hiện nay, một số loại siro ho có chứa desloratadin được sử dụng nhiều để điều trị các bệnh dị ứng, viêm mũi dị ứng theo mùa,... Desloratadin là thuốc kháng histamine H₁ thế hệ 2 có hiệu quả trong việc điều trị dứt điểm các triệu chứng do dị ứng gây ra. Tuy nhiên, trong công thức siro thường có chứa hàm lượng đường

cao, đây là điều kiện thuận lợi để vi sinh vật xâm nhập và phát triển. Do đó, trong công thức đòi hỏi phải có thêm thành phần chất bảo quản. Natri benzoat là một chất bảo quản được sử dụng rộng rãi trong mỹ phẩm, thực phẩm và dược phẩm. Natri benzoat được sử dụng với hàm lượng 0,02 - 0,5 % ở dạng thuốc uống [6]. Theo FDA khuyến nghị nên kiểm tra hàm lượng, giới hạn chất bảo quản trong các chế phẩm siro để đảm bảo chất lượng và bảo vệ người tiêu dùng [3], [4]. Hiện nay, các tài liệu trong nước và một số tài liệu nước ngoài chúng tôi tham khảo, chưa có nhiều tài liệu công bố về quy trình định lượng đồng thời hai chất này [1], [2], [7] hoặc quy trình còn phức tạp [5].

Nhằm góp phần 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 desloratadin và chất bảo quản natri benzoat trong siro ho nghiên cứu (NC01) 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, đáp ứng yêu cầu của ISO/IEC 17025 và GLP, bao gồm:

- Cân phân tích MS 105 độ chính xác 0,01 mg;
- Máy sắc ký lỏng hiệu năng cao Water ARC;
- Máy đo pH Mettler Toledo;
- Cột phân tích Phenomenex C8 (250 x 4,6 mm; 5 μ m);
- Các thiết bị, dụng cụ khác: máy lắc siêu âm, các dụng cụ thủy tinh chính xác class A

2.1.2. Hóa chất, dung môi và chất chuẩn

- Hóa chất: Ortho - kali dihydro phosphate (PA), natri hexansulfonat (PA) của Merck

- Dung môi: Methanol (HPLC), acetonitrile (HPLC), acid ortho - phosphoric 85 % (PA) của Merck, nước RO của Viện Kiểm nghiệm Thuốc Trung ương

- Chất chuẩn: Desloratadin ($C_{19}H_{19}ClN_2$) hàm lượng: 99,80 % (nguyên trạng), SKS: F006W0 và natri benzoat ($C_7H_5NaO_2$), hàm lượng: 98,59 % (nguyên trạng), SKS: WS.0115314.01 của Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương.

2.2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Đối tượng nghiên cứu

- Mẫu chế phẩm siro ho desloratadin có chứa natri benzoat đang lưu hành trên thị trường: T01 và T02.

- Mẫu siro ho nghiên cứu (NC01), số lô 010621, được công ty cung cấp chứa desloratadin 0,5 mg; natri benzoat 2,0 mg và tá dược trong vừa đủ 1 ml.

- Mẫu placebo (1): Mẫu giả được được chuẩn bị như một lô mẫu thử nhưng không có thành phần natri benzoat. Mẫu placebo gồm glycerin, saccarose, dung dịch sorbitol 70 %, acid citric, natri citrat, dinatri edetat, màu tartrazin, tinh dầu cam, ethanol 96 %, nước tinh khiết.

- Mẫu placebo (2): Mẫu giả được được chuẩn bị như một lô mẫu thử nhưng không có thành phần desloratadin. Mẫu placebo gồm glycerin, saccarose, dung dịch sorbitol 70 %, acid citric, natri citrat, dinatri edetat, màu tartrazin, tinh dầu cam, ethanol 96 %, nước tinh khiết.

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 C8 (250 x 4,6 mm; 5 μ m) và hệ pha động acetonitril – đệm.

2.2.2.2. Phương pháp chuẩn bị mẫu chuẩn [5], [8]

- Dung dịch chuẩn gốc: Pha dung dịch chuẩn gốc desloratadin (0,1 mg/ml) và natri benzoat (0,4 mg/ml) trong dung môi pha mẫu.

- Dung dịch chuẩn hỗn hợp: Hút chính xác 1,0 ml dung dịch chuẩn gốc desloratadin 0,1 mg/ml và 1,0 ml dung dịch chuẩn gốc natri benzoat 0,4 mg/ml vào bình định mức 10 ml. Thêm dung môi pha mẫu vừa đủ đến vạch, lắc kỹ.

- Dung dịch thử: Cân chính xác khoảng 2,60 g chế phẩm cho vào bình định mức 100 ml. Thêm 60 ml dung môi pha mẫu, lắc siêu âm trong 10 phút. Sau đó để yên trong 10 phút cho dung dịch trở về nhiệt độ phòng rồi thêm dung môi pha mẫu đến vạch, lắc kỹ. Dung dịch thu được đem lọc qua màng lọc 0,45 μ m loại bỏ 20 ml dịch lọc đầu. Sử dụng dịch lọc.

Kiểm tra tính thích hợp của hệ thống: Tiến hành sắc ký với dung dịch chuẩn hỗn hợp, thứ tự rửa giải của 2 pic lần lượt là natri benzoat và desloratadin; độ phân giải của 2 pic không được nhỏ hơn 2,0; 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 50 μ l dung dịch placebo, dung dịch chuẩn hỗn hợp và dung dịch thử và 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

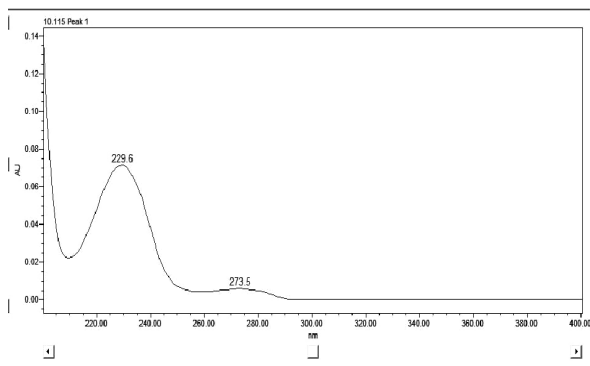
3.1. Lựa chọn điều kiện sắc ký

3.1.1. Lựa chọn cột sắc ký

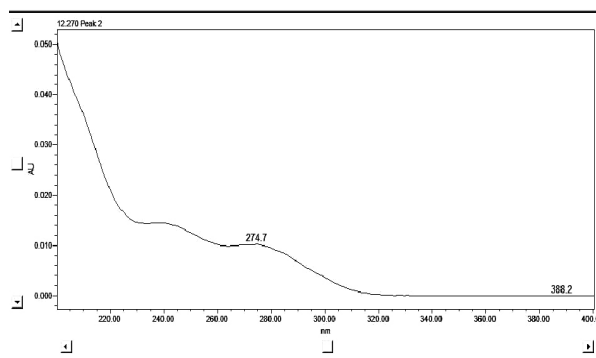
Qua nghiên cứu các tài liệu về định lượng desloratadin và natri benzoat [5], [8], cùng các đặc điểm về tính chất lý hóa và công thức cấu tạo cùng với điều kiện hiện có của phòng thí nghiệm, chúng tôi lựa chọn cột phân tích hiện có là cột sắc ký Phenomenex C8 (250 mm x 4,6 mm, 5 μ m).

3.1.2. Lựa chọn bước sóng phát hiện

Thực hiện quét phổ UV mẫu chuẩn đơn của hai chất ở dải bước sóng 200 - 400 nm. Kết quả thu được như sau:



(a)



(b)

Hình 1. Hình ảnh quét phổ dung dịch chuẩn của mẫu natri benzoat (a) và của mẫu desloratadin (b)

Kết quả cho thấy cả hai chất desloratadin và natri benzoat đều có cực đại hấp thụ tại bước sóng khoảng 273 nm - 274 nm. Do đó nhóm nghiên cứu lựa chọn bước sóng 274nm để phân tích đồng thời hai chất trên, giảm thiểu tránh các sai số ảnh hưởng do độ lệch của bước sóng.

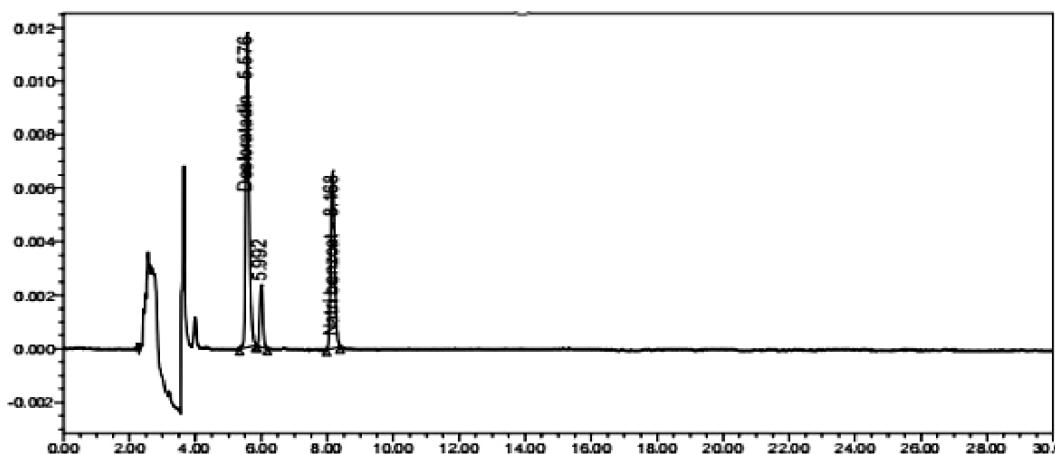
3.1.3. Lựa chọn pha động

Căn cứ vào giá trị pKa của desloratadin và natri benzoat lần lượt là 9,73 và 4,25 tiến hành lựa chọn pha động có thành phần đệm pH < 4,0 để hai chất phân tích

không bị chuyển dạng ion trong dung dịch, có thể được lưu giữ và rửa giải theo thời gian khác nhau.

Qua các tài liệu nghiên cứu được [5], [8] kết hợp với sự có sẵn của hóa chất, dung môi hiện có của phòng thí nghiệm. Nhóm nghiên cứu lựa chọn pha động 1 gồm acetonitril và đệm phosphat (KH_2PO_4 0,01 M) với tỉ lệ 30 : 70 để khảo sát.

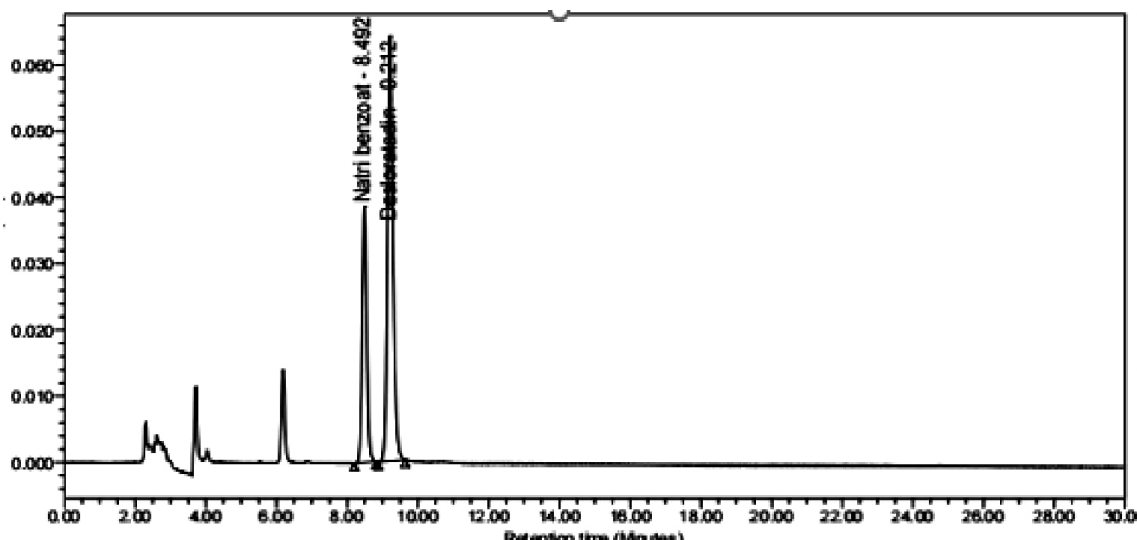
Tiến hành khảo sát chương trình đẳng dòng với pha động gồm acetonitril và đệm phosphat 0,01 M được điều chỉnh pH tới giá trị 3,0 bằng acid ortho-phosphoric 0,1 % trên dung dịch thử. Kết quả thu được như hình 2:



Hình 2. Sắc ký đồ dung dịch thử tại hệ pha động 1

Từ hình ảnh sắc ký đồ thu được sau khi khảo sát pH = 3,0 của dung dịch đệm, thấy rằng tại đệm pH = 3,0 có xuất hiện pic của hai chất phân tích với thời gian lưu hợp lý. Tuy nhiên, pic desloratadin và pic tá được chưa tách tốt vẫn còn bị dính chân và pic desloratadin cũng có hiện tượng bị kéo đuôi.

Vì vậy, để giảm hiện tượng kéo đuôi pic desloratadin cũng như tăng hiệu suất tách của cột sắc ký, chúng tôi tiến hành sử dụng thêm chất tạo cặp ion natri hexansulfonat trong pha động. Sau khi chuẩn bị xong dung dịch đệm phosphat 0,01 M, pH = 3,0 có thêm chất tạo cặp ion natri hexansulfonat, chúng tôi tiến hành khảo sát tiếp pha động 2. Kết quả thu được như hình 3:

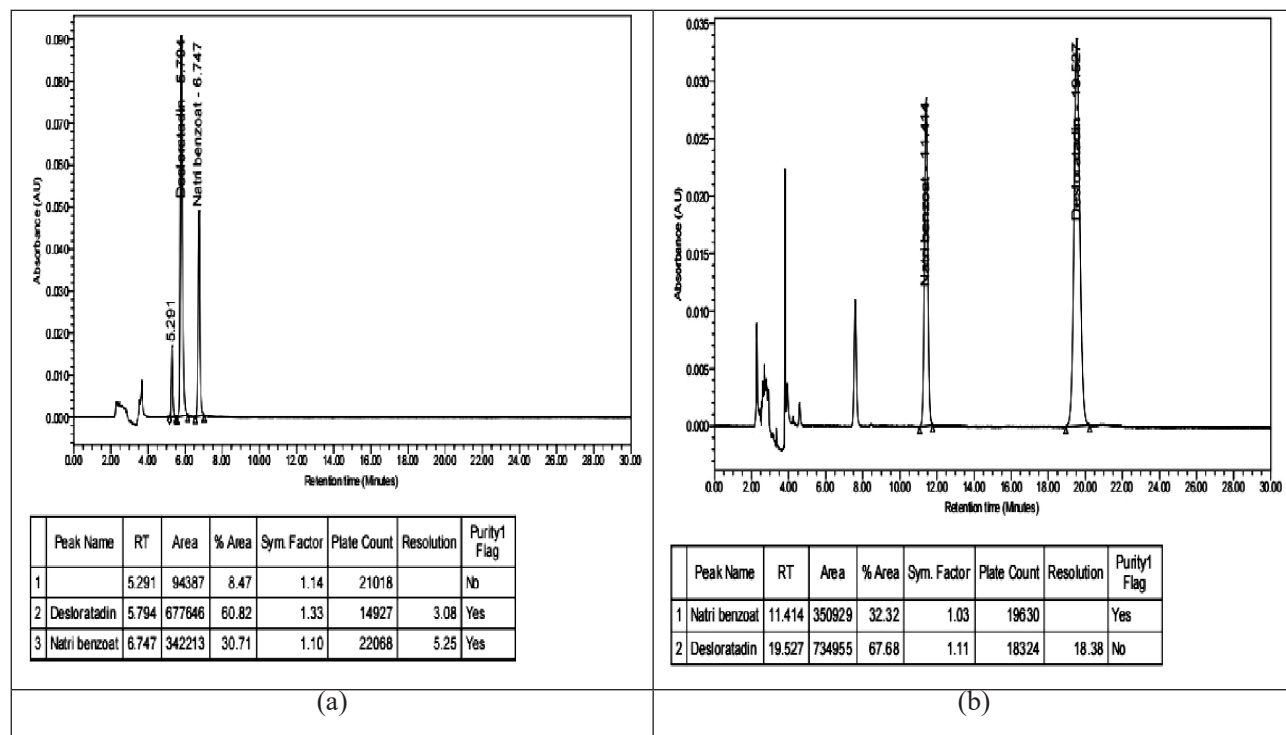


Hình 3. Sắc ký đồ dung dịch thử tại hệ pha động 2

Nhận thấy, các pic cân đối không còn hiện tượng bị kéo đuôi, độ tinh khiết của hai pic đều đạt và pic tá được đã tách khỏi pic hai chất phân tích. Tuy nhiên, hai pic chất phân tích có hiện tượng dính chân pic. Vì vậy, có thể lựa chọn hệ đệm này trong thành phần pha động để phân tích, nhưng cần khảo sát thêm tỉ lệ pha động để các pic có thể tách nhau tốt hơn.

3.1.4. Tỉ lệ pha động và tốc độ dòng

Tiến hành khảo sát pha động gồm acetonitril: đệm phosphat (KH_2PO_4 0,01 M, natri hexansulfonat pH = 3,0) ở các tỷ lệ (35 : 65) và (25 : 75). Tốc độ dòng để ở mức 1 ml/phút. Kết quả thu được như hình 4:



Hình 4. Sắc ký đồ dung dịch thử tại hệ pha động tỷ lệ 35 : 65 (a) và hệ pha động tỷ lệ 25 : 75 (b)

Từ kết quả sắc ký đồ, nhận thấy:

- Ở tỉ lệ pha động 3 (35 : 65) pic desloratadin bị kéo đuôi và bị dính chân pic tá được, khả năng tách các pic kém.

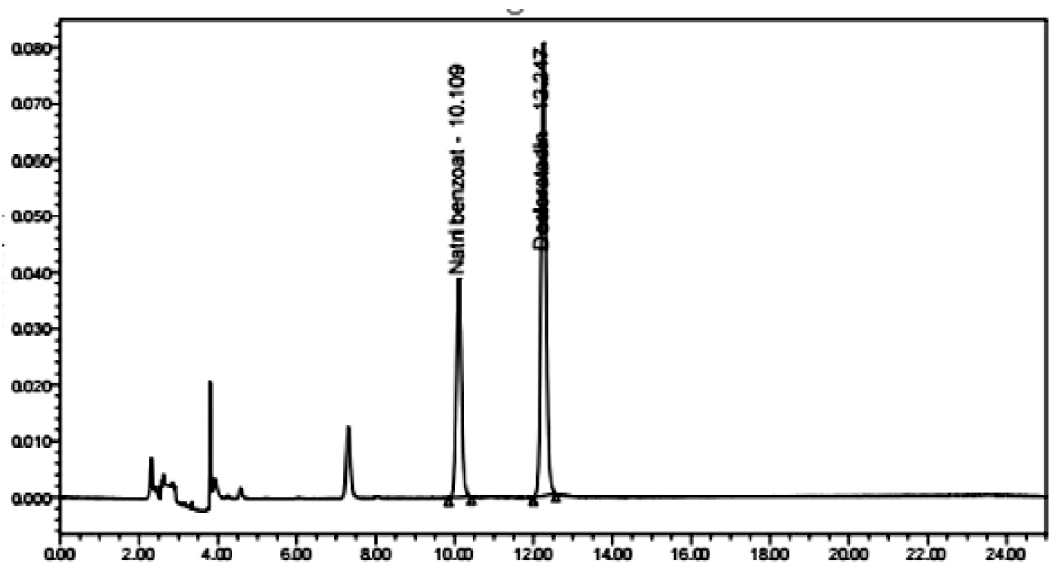
- Ở tỉ lệ pha động 4 (25 : 75) các pic tách tốt không còn bị dính chân nhưng thời gian lưu của pic desloratadin bị kéo dài và có hiện tượng bị doãng pic.

Để khắc phục những hạn chế ở trên, nhóm nghiên cứu chuyển chương trình chạy đẳng dòng sang chương

trình gradient dung môi (hệ pha động 5) như sau:

Thời gian (phút)	% Pha động A	% Pha động B
0	75	25
0 – 20	75 → 60	25 → 40
20 - 25	60 → 75	40 → 25

Kết quả chạy chương trình gradient dung môi như hình 5:



Hình 5. Sắc ký đồ dung dịch thử tại hệ pha động

Nhận thấy, với chương trình gradient ở trên các pic gọn không còn hiện tượng bị kéo đuôi, tách hoàn toàn, thời gian lưu hợp lý.

Như vậy, qua quá trình khảo sát thực nghiệm, chúng tôi đã lựa chọn được điều kiện sắc ký như sau:

- Cột sắc ký Phenomenex C₈ (250 x 4,6 mm, 5 µm), nhiệt độ cột: 50 °C.

- Pha động:

+ Pha A: Đệm phosphat pH = 3,0: Hòa tan 1,36 g kali dihydrophosphat và 0,96 g natri hexansulfonat trong 950 ml nước, điều chỉnh đến pH = 3,0 bằng acid phosphoric 0,1 %, thêm nước đủ 1000 ml, lắc đều.

+ Pha B: Acetonitril

Chương trình gradient dung môi:

Thời gian (phút)	% Pha động A	% Pha động B
0	75	25
0 – 20	75 → 60	25 → 40
20 - 25	60 → 75	40 → 25

- Tốc độ dòng: 1,0 ml/phút;

- Thể tích tiêm: 50 µl;

- Bước sóng ghi: 274 nm;

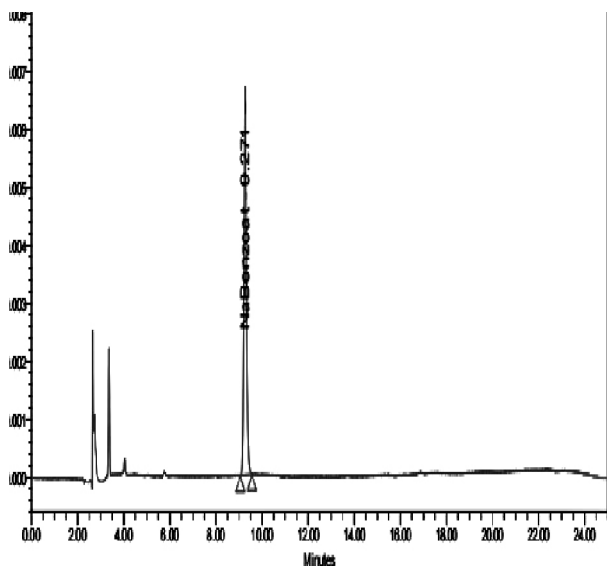
- Dung môi pha mẫu methanol - nước (50 : 50).

Với điều kiện sắc ký như trên, thứ tự rửa giải của 2 pic lần lượt là natri benzoat và desloratadin; 2 pic thu được tách rõ ràng, đối xứng và gọn. Như vậy việc lựa chọn các điều kiện sắc ký là phù hợp.

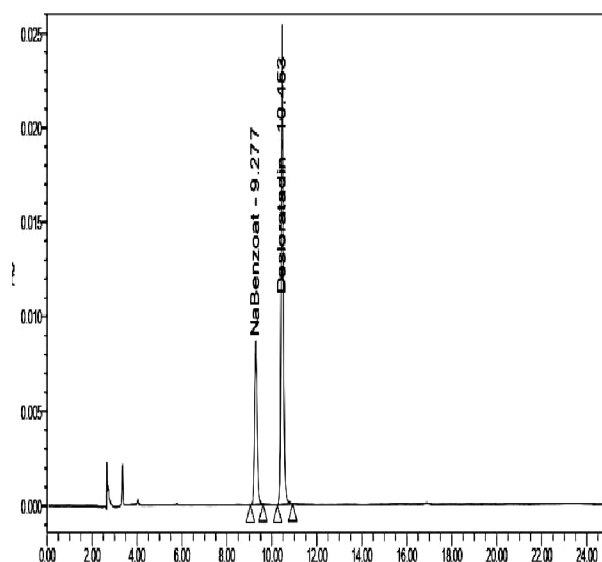
3.2. Thẩm định phương pháp phân tích

3.2.1. Độ đặc hiệu

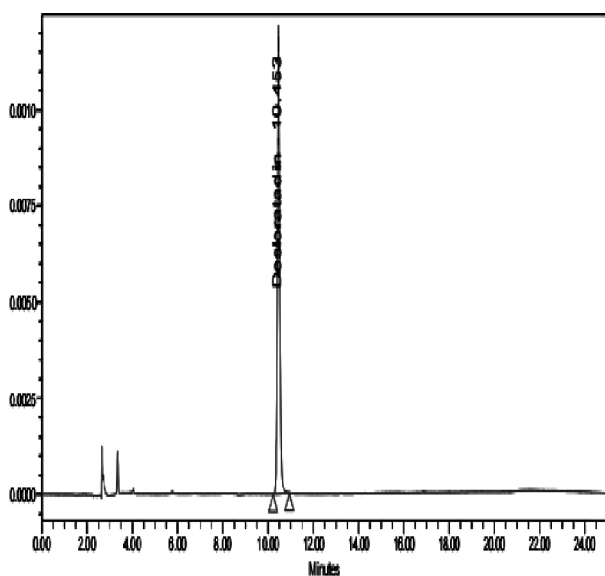
Tiến hành tiêm vào hệ thống sắc ký lần lượt các dung dịch sau: dung dịch placebo (1), (2); dung dịch thử và dung dịch chuẩn hỗn hợp. Kết quả được trình bày ở sắc ký đồ dưới đây.



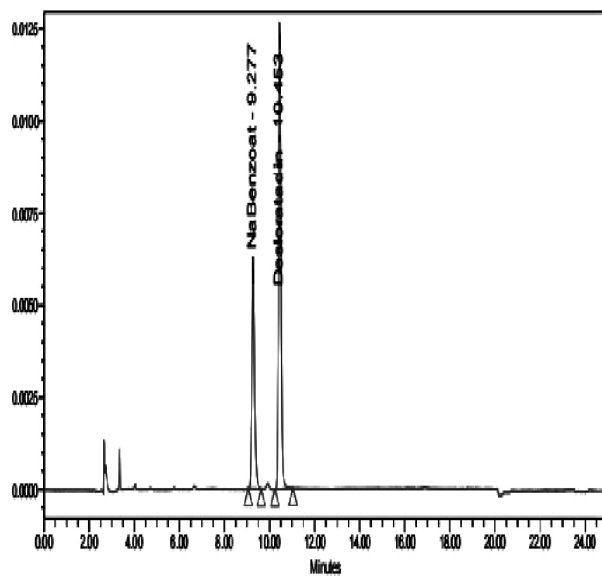
Hình 6. Sắc ký đồ dung dịch placebo (1)



Hình 8. Sắc ký đồ dung dịch chuẩn hỗn hợp



Hình 7. Sắc ký đồ dung dịch placebo (2)



Hình 9. Sắc ký đồ dung dịch thử

Kết quả cho thấy:

- Trên sắc ký đồ của dung dịch placebo (1) chỉ xuất hiện pic natri benzoat, dung dịch placebo (2) chỉ xuất hiện pic desloratadin

- Sắc ký đồ của dung dịch thử cho pic có thời gian lưu (10,453 phút) và phổ UV tương ứng với thời gian lưu và phổ UV của pic desloratadin (10,453 phút); pic có thời gian lưu (9,271 phút) và phổ UV tương ứng với thời gian lưu và phổ UV của pic natri benzoat (9,277 phút) thu được trên sắc ký đồ của dung dịch chuẩn hỗn hợp.

Vì vậy, phương pháp có tính đặc hiệu để định tính và định lượng đồng thời desloratadin và natri benzoat trong chế phẩm siro ho.

3.2.2. Độ thích hợp hệ thống

Tiêm vào hệ thống sắc ký 6 lần lặp lại dung dịch chuẩn hỗn hợp ở mức nồng độ 100 %. Ghi lại các giá trị về thời gian lưu, diện tích pic, hệ số phân giải giữa 2 pic. Kết quả khảo sát độ thích hợp hệ thống được trình bày ở Bảng 1.

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

STT	Pic natri benzoat		Pic desloratadin		Hệ số phân giải giữa 2 pic
	Thời gian lưu (phút)	Diện tích pic (mAU.s)	Thời gian lưu (phút)	Diện tích pic (mAU.s)	
1	9,226	52808	10,454	95604	6,0
2	9,265	52619	10,454	95770	6,0
3	9,267	52703	10,453	95550	6,0
4	9,273	52747	10,456	95192	6,0
5	9,272	52142	10,456	95772	6,0
6	9,272	53051	10,455	96700	6,0
TB	9,269	52678	10,455	95765	6,0
RSD (%)	0,04	0,57	0,01	0,53	0

3.2.3. Độ tuyến tính

Từ các dung dịch chuẩn gốc desloratadin (0,1 mg/ml) và natri benzoat (0,394 mg/ml) pha loãng chính xác với dung môi pha mẫu để thu được 06 dung dịch chuẩn

có nồng độ khoảng 40 %, 60 %, 80 %, 100 %, 120 %, 150 % so với dung dịch chuẩn hỗn hợp. Tiến hành sắc ký theo điều kiện trên. Kết quả được trình bày trong Bảng 2.

Bảng 2. Kết quả khảo sát độ tuyến tính của phương pháp

STT	Nồng độ dung dịch chuẩn gốc (mg/ml)	Desloratadin		Natri benzoat	
		Nồng độ dung dịch (mg/ml)	Diện tích pic (mAU.s)	Nồng độ dung dịch (mg/ml)	Diện tích pic (mAU.s)
1	40 %	0,004	37610	0,016	21502
2	60 %	0,006	57409	0,024	31618
3	80 %	0,008	75070	0,032	41728
4	100 %	0,010	96033	0,039	52813
5	120 %	0,012	114233	0,047	62532
6	150 %	0,015	143625	0,059	79005
Phương trình hồi quy		$Y = 9595051,546 x - 687,639$		$Y = 1320863,664 x + 452,307$	
Hệ số tương quan		0,99987		0,99989	
% Hệ số chặn		0,716		0,856	

Kết quả khảo sát cho thấy có sự tương quan tuyến tính giữa diện tích pic và nồng độ từng chất phân tích trong khoảng nồng độ khảo sát với hệ số tương quan r gần bằng 1.

3.2.4. Độ chính xác

3.2.4.1. Độ lặp lại của phương pháp: Tiến hành định lượng trên chế phẩm siro ho, 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

TT	Lượng mẫu thử đã sử dụng (g)	Diện tích pic desloratadin (mAU.s)	Hàm lượng desloratadin (mg/ml)	Diện tích pic natri benzoat (mAU.s)	Hàm lượng natri benzoat (mg/ml)
Dung dịch chuẩn: 0,01 mg desloratadin/ml; 0,0394 mg natri benzoat/ml		95764,67		52678,33	
1	2,5441	92869	0,495	52421	2,008
2	2,5943	94037	0,492	53323	2,003
3	2,6108	96867	0,503	52813	1,972
4	2,6051	95447	0,497	54238	2,029
5	2,5885	93830	0,492	53481	2,014
6	2,5845	94522	0,496	53006	1,999
Trung bình		0,496 mg; n = 6; RSD = 0,86 %		2,004 mg; n = 6; RSD = 0,96 %	

Kết quả ở Bảng 3 cho thấy phương pháp có độ lặp lại tốt đối với cả 2 hoạt chất (RSD < 2 %).

3.2.4.2. Độ chính xác trung gian: Xác định độ chính

xác trung gian bằng cách xác định hàm lượng các hoạt chất trong 6 mẫu thử bởi kiểm nghiệm viên khác, thời điểm khác. Kết quả được trình bày trong Bảng 4.

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

TT	Lượng mẫu thử đã sử dụng (g)	Diện tích pic desloratadin (mAU.s)	Hàm lượng desloratadin (mg/ml)	Diện tích pic natri benzoat (mAU.s)	Hàm lượng natri benzoat (mg/ml)
Dung dịch chuẩn: 0,01 mg desloratadin/ml; 0,0392 mg natri benzoat/ml		93989,33		52786,17	
1	2,5994	92333	0,496	52665	1,961
2	2,5953	93891	0,505	53557	1,997
3	2,6009	93199	0,500	52922	1,969
4	2,5376	91885	0,506	52601	2,006
5	2,5939	94438	0,508	54338	2,027
6	2,5911	94490	0,509	54178	2,024
Trung bình		0,504 mg; n = 6; RSD = 1,00%		1,997 mg; n = 6; RSD = 1,38 %	
2 KNV (n = 12)		RSD = 1,23 %		RSD = 1,14 %	

Kết quả ở bảng 4 cho thấy, phương pháp có độ chính xác tốt theo hướng dẫn ICH.

3.2.5. Độ đúng

Chuẩn bị 3 mẫu tự tạo ở mức nồng độ 70 %, 100 % và 130 % so với nồng độ định lượng bằng cách thêm vào

một lượng chính xác mỗi chất chuẩn vào mẫu placebo. Tại mỗi mức nồng độ thực hiện trên 3 mẫu độc lập và đem phân tích theo điều kiện đã chọn. Tính lượng thu hồi của các chất phân tích. Kết quả được trình bày trong Bảng 5.

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

TT	% thêm vào so với hàm lượng ghi trên nhãn	Diện tích pic desloratadin (mAU.s)	% thu hồi desloratadin	Diện tích pic natri benzoat (mAU.s)	% thu hồi natri benzoat
1	70 %	66310	98,92	36715	98,57
2	70 %	66853	100,74	37009	101,87
3	70 %	66894	99,29	36884	99,52
4	100 %	96209	100,46	52597	98,85
5	100 %	95154	100,37	52403	100,97
6	100 %	95720	99,46	51998	98,21
7	130 %	122114	98,09	67928	98,20
8	130 %	121990	98,98	68602	101,68
9	130 %	125771	100,52	68181	99,06
Trung bình (n = 9)		99,65 % RSD = 0,92 %		99,66 % RSD = 1,47 %	

Kết quả ở Bảng 5 cho thấy, phương pháp có độ đúng cao với trung bình phần trăm tỷ lệ thu hồi ở mỗi mức nồng độ đều thỏa mãn điều kiện từ 98,0 - 102,0 % và RSD < 2,0 %. Do đó, đảm bảo cho việc định lượng desloratadin và natri benzoat trong chế phẩm.

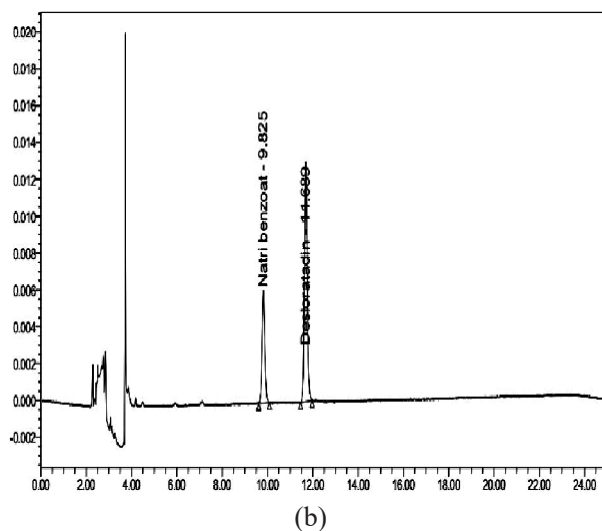
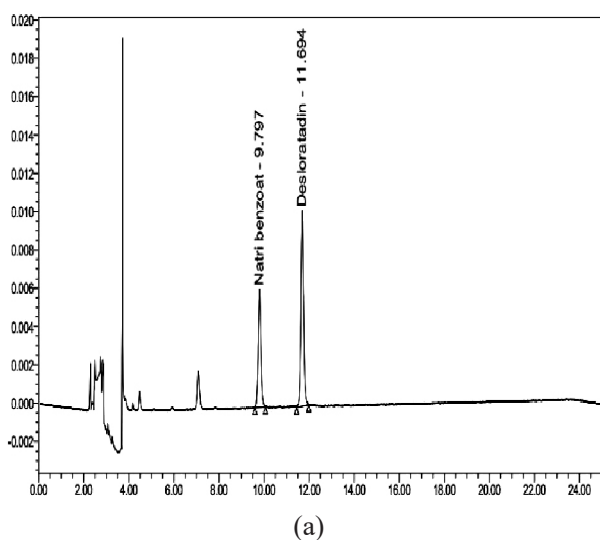
3.2.6. Khoảng xác định

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 0,007 – 0,013 mg/ml desloratadin và 0,02758 –

0,05122 mg/ml natri benzoat.

3.3. Ứng dụng định lượng các mẫu siro trên thị trường

Nhóm nghiên cứu thực hiện mua mẫu siro ho T01 và T02 có chứa đồng thời desloratadin và chất bảo quản natri benzoat của 02 công ty tại các nhà thuốc trên địa bàn Thành phố Hà Nội. Tiến hành định lượng đồng thời desloratadin và natri benzoat trong các mẫu theo phương pháp đã xây dựng.



Hình 10. Sắc ký đồ mẫu thử T01 (a) và mẫu thử T02 (b)

Kết quả hàm lượng desloratadin và natri benzoate trong 2 mẫu thử được trình bày trong Bảng 6.

Bảng 6. Kết quả định lượng các mẫu siro T01 và T02.

Mẫu thử		Desloratadin			natri benzoat		
		Hàm lượng (mg/ml)	Hàm lượng TB (mg/ml)	RSD %	Hàm lượng (mg/ml)	Hàm lượng TB (mg/ml)	RSD %
T01	T01.1	0,467	0,462	1,36	2,35	2,40	1,87
	T01.2	0,464			2,41		
	T01.3	0,455			2,44		
T02	T02.1	0,496	0,493	1,55	1,99	1,95	1,85
	T02.2	0,484			1,94		
	T02.3	0,498			1,92		

4. Kết luận

Qua khảo sát thực nghiệm, chúng tôi đã xây dựng được phương pháp định lượng đồng thời desloratadin và chất bảo quản natri benzoat trong siro bằng HPLC với điều kiện sắc ký đơn giản, dễ dàng, tiết kiệm có thể áp

dụng được ở các Trung tâm Kiểm nghiệm, các phòng thí nghiệm có máy HPLC. Phương pháp đã xây dựng có độ chính xác cao, độ đúng tốt, khoảng tuyến tính rộng để có thể phân tích đồng thời desloratadin và natri benzoat trong các chế phẩm siro ho đang lưu hành trên thị trường.

Tài liệu tham khảo

1. Hội đồng Dược điển Việt Nam (2017), *Dược điển Việt Nam V*, pp. 654-655.
2. Medicines and Healthcare products Regulatory Agency (2021), *British Pharmacopoeia*, pp. 728-729.
3. FDA (2003), Stability testing of new drug substances and products, *Guidance for industry, Q1A (R2)*, Rockville, USA.
4. ICH (2003), *Q1A (R2), Stability Testing of new Drug Substances and Products*.
5. Kumar Navneet, Sangeetha Dhanaraj, SUNIL REDDY Pingili, Prakash Lakkireddy (2012), “A validated stability-indicating RP-UPLC method for simultaneous determination of desloratadine and sodium benzoate in oral liquid pharmaceutical formulations”, *Scientia pharmaceutica*, 80(1), pp. 153-166.
6. Rowe Raymond C, Sheskey Paul, Quinn Marian (2009), *Handbook of pharmaceutical excipients*, pp. 627-629.
7. The United States Pharmacopeial Convention (2021), *The United States Pharmacopoeia*, volume II, IV, pp. 3655-3658, 7876.
8. Razib BM Mahbubul Alam, Ullah Md Ashik, et al. (2006), “Validation and application of a modified RP-HPLC method for the quantification of desloratadine in pharmaceutical dosage forms”, *Dhaka University Journal of Pharmaceutical Sciences*, 5(1), pp. 1-4.

SUMMARY

A Reversed-phase HPLC method for simultaneous determination of desloratadine and sodium benzoate in cough syrup was introduced. The method was carried out on a C18 column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), using an acetonitrile – phosphate buffer pH 3.0 mixture with composition varying following a gradient program as mobile phase. The mobile phase flow rate was maintained at 1.0 mL per minute. Injection volume was 50 μL. The UV detector was set at 274 nm. The developed method has been illustrated to satisfied the requirements of specificity, system suitability, linearity, accuracy, precision (repeatability and intermediate precision) according to ICH-(Q2R1) guideline. The validation results indicated that the developed procedure was suitable for simultaneous determination of desloratadine and sodium benzoate in studied cough syrup, and which would be a potential procedure to applied for other similar syrup matrix.

(Ngày nhận bài: 25/11/2021; Ngày phản biện: 14/3/2022; Ngày duyệt đăng: 20/3/2022)

THẨM ĐỊNH PHƯƠNG PHÁP THỬ NGHIỆM ĐỘC TÍNH TẾ BÀO *IN VITRO* BẰNG THUỐC THỬ MTT TRÊN TẾ BÀO VERO 76

LÊ VĂN ĐẠT, NGUYỄN THỊ LIÊN✉

Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương

Từ khóa: Độc tính tế bào, Vero 76, Thuốc thử MTT

1. Đặt vấn đề

Độc tính tế bào là một trong những phép thử quan trọng để đánh giá tính tương thích sinh học của các trang thiết bị y tế, thiết bị cấy ghép và bao bì đựng thuốc [1, 5].

Quy trình thử nghiệm dựa trên việc đánh giá khả năng sống của tế bào thông qua hoạt động trao đổi chất. MTT(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5 diphenyltetrazoliumbromid) màu vàng tan trong nước khi vào tế bào bị khử chuyển hóa trong tế bào thành formazan màu xanh tím, không tan trong nước. Số lượng tế bào sống tương quan với cường độ màu được xác định bằng phép đo quang sau khi hòa tan formazan trong isopropanol [3].

Tế bào Vero là dòng tế bào được phân lập lần đầu năm 1962 từ các tế bào biểu mô thận của khỉ xanh châu phi. Hiện nay dòng tế bào Vero 76 được sử dụng rộng rãi trong nghiên cứu và sản xuất các sản phẩm y sinh học,

được phẩm và vắc xin do nó dễ xây dựng ngân hàng tế bào, cấu trúc nhân và hình dạng ổn định, ít thay đổi qua các lần cấy chuyển và khả năng bị nhiễm các yếu tố ngoại lai thấp trong quá trình nuôi cấy [6].

Theo ISO 10993-5:2009 (E) phụ lục C hướng dẫn về thử nghiệm độc tính tế bào bằng thuốc thử MTT thực hiện trên tế bào L929. Tuy nhiên, hiện nay ở Việt Nam dòng tế bào này chưa được sử dụng phổ biến. Để mở rộng phạm vi phép thử trên các dòng tế bào khác nhau chúng tôi đã tiến hành nghiên cứu thẩm định phương pháp thử nghiệm độc tính tế bào *in vitro* bằng thuốc thử MTT trên tế bào Vero 76 thay thế cho tế bào L929.

2. Thực nghiệm

2.1. Thiết bị, hóa chất, chất chuẩn

2.1.1. Thiết bị, dụng cụ

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

STT	Tên thiết bị, dụng cụ	Nơi sản xuất
1	Bể ổn nhiệt	Memmert, Đức
2	Nồi hấp tiệt trùng	Hirayama, Nhật Bản
3	Tủ sấy	Memmert, Đức
4	Tủ ẩm CO2	Memmert, Đức
5	Tủ an toàn sinh học cấp II	Azbil Telstar, TBN
6	Máy đọc đĩa Varioskan Lux	Thermo, Singapore
7	Máy ly tâm	Eppendorf, Đức
8	Máy lắc đĩa	USA Scientific, Mỹ
9	Cân phân tích	Mettler, Trung Quốc
10	Máy đếm tế bào	Logos, Hàn Quốc
11	Kính hiển vi soi ngược	Olympus, Nhật Bản
12	Micropipet	Eppendorf, Nhật Bản
13	Bình nuôi cấy	Corning, Trung Quốc
14	Đĩa 96 giếng	Corning, Trung Quốc
15	Bình nón có nút mài	Duran, Đức
16	Kìm cắt mẫu	Fujiya, Nhật Bản

2.1.2. Hóa chất, dung môi, chất chuẩn

- Môi trường MEM (Gibco, Mỹ)
- Huyết thanh bò (FBS), (Gibco, Mỹ)
- Dung dịch Trypsin/EDTA (Gibco, Mỹ)
- Dung dịch PBS (Gibco, Mỹ)
- MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid), (Thermo, Mỹ)
- Isopropanol (Merk, Đức)
- Penicillin/streptomycin (Gibco, Mỹ)
- Nước BET (Lonza, Mỹ)
- Đối chứng dương 0,1% ZDEC polyurethane Film (Hatano Research Institute, Nhật Bản)
- Đối chứng âm HDPE (Hatano Research Institute, Nhật Bản)

2.2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Đối tượng nghiên cứu

* Tế bào Vero 76 do Viện Kiểm định Quốc gia Vaccine và Sinh phẩm y tế (NICB) cung cấp, số lô NICB/MCB01-18

* Mẫu thử:

- Mẫu thử 1: Dây dẫn đường mạch máu (RF*GA38263M), nơi sản xuất Công ty TNHH Terumo Việt Nam, số lô 200624V.

- Mẫu thử 2: Ống thông mạch máu (RH*4MP3520M), nơi sản xuất Công ty TNHH Terumo Việt Nam, số lô 210205V.

- Mẫu thử 3: Bơm tiêm 10 ml sử dụng 1 lần, nơi sản xuất Công ty Cổ phần TBVT Vinahankook, số lô 2511.

- Mẫu thử 4: Dụng cụ mở đường mạch máu (RS*A60G16SQZ), nơi sản xuất Công ty TNHH Terumo Việt Nam.

2.2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.2.1. Chuẩn bị thuốc thử

- Môi trường nuôi cấy: Môi trường MEM bổ sung 10 % FBS, 10 % DMSO, 4 mM glutamin, 100 IU/ml penicillin và 100 µg/ml streptomycin.

- Dung dịch MTT : MTT được hòa tan trong môi trường MEM không có chất bổ sung và không có đồ phenol để được nồng độ 1 mg/ml. Dung dịch được lọc qua màng lọc vô trùng (kích thước $\leq 0,22 \mu\text{m}$).

- Chuẩn bị huyền phù tế bào: Tế bào được cấy chuyển 2 đến 3 lần từ khi đã đông trước khi đưa vào thử nghiệm. Chuẩn bị dịch huyền phù tế bào có nồng độ khoảng $1,0 \times 10^5$ tế bào/ml.

2.2.2.2. Phương pháp xử lý mẫu

- Chuẩn bị mẫu thử

+ Tùy theo hình dạng, kích thước mẫu thử, mẫu thử được chiết theo ISO-10993-12:2009 nhưng không ít hơn 03 đơn vị mẫu thử trong một bình chiết. Đối với các mẫu thử có hình dạng không xác định tỷ lệ mẫu thử và dung môi là 0,2 g mẫu thử/ml môi trường nuôi cấy. Mẫu thử dạng xy lanh tính theo diện tích tiếp xúc [4].

+ Ủ các bình chiết ở nhiệt độ $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ trong (24 ± 2) giờ để thu được dung dịch thử 1 (dịch chiết mẫu thử 100 %). Từ dung dịch thử 100 % pha loãng thành các dung dịch thử 2 (50 %), thử 3 (25 %) và thử 4 (12,5 %) bằng môi trường nuôi cấy [2, 4].

- Chuẩn bị mẫu đối chứng dương

+ Chiết mẫu đối chứng dương (0,1 % ZDEC polyurethane Film, lô A-191K, Hatano Research Institute, Nhật Bản) với tỷ lệ 0,1 g mẫu thử/ml bằng môi trường nuôi cấy [3, 4]. Tiến hành các bước tiếp theo tương mẫu thử.

- Chuẩn bị mẫu đối chứng âm

+ Chiết mẫu đối chứng âm (HDPE, lô C-161, Hatano Research Institute, Nhật Bản) với tỷ lệ 0,1 g mẫu thử/ml bằng môi trường nuôi cấy [3, 4].

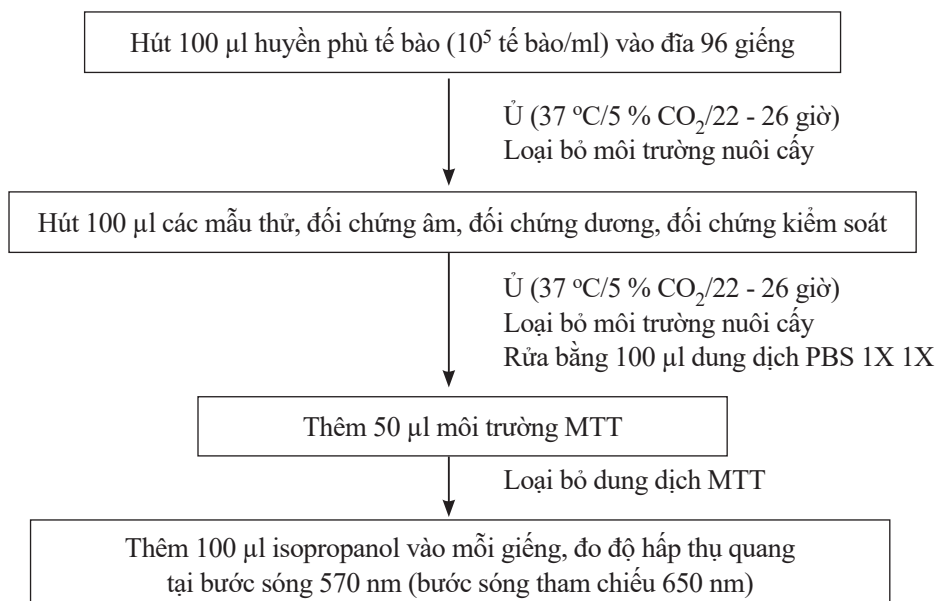
+ Ủ các bình chiết ở nhiệt độ $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ trong (24 ± 2) giờ để thu được dung dịch đối chứng âm (dịch chiết đối chứng âm 100 %).

- Chuẩn bị mẫu trắng kiểm soát: Sử dụng môi trường nuôi cấy ở nhiệt độ $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ trong (24 ± 2) giờ làm mẫu trắng kiểm soát.

2.2.2.3. Quy trình phân tích

Thời gian (giờ)	Quy trình phân tích
00:00	- Hút 100 µl huyền phù tế bào (10^5 tế bào/ml) vào đĩa 96 giếng - Ủ ($37\text{ }^{\circ}\text{C}/5\text{ \% CO}_2/22\text{-}26$ giờ)
24:00	- Đánh giá hình thái tế bào bằng kính hiển vi phản pha, loại bỏ các giếng bất thường - Loại bỏ môi trường nuôi cấy - Hút 100 µl các mẫu sau vào các giếng: + Dịch chiết mẫu thử, mẫu đối chứng dương ít nhất 4 nồng độ bắt đầu từ nồng độ 100 %, mỗi nồng độ lặp lại 3 lần. + Mẫu đối chứng âm nồng độ 100 % + Mẫu trắng kiểm soát - Ủ ($37\text{ }^{\circ}\text{C}/5\text{ \% CO}_2/24$ giờ)
48:00	- Đánh giá hình thái tế bào bằng kính hiển vi phản pha - Loại bỏ môi trường nuôi cấy - Rửa bằng 100 µl dung dịch PBS 1X - Thêm 50 µl môi trường MTT - Ủ ($37\text{ }^{\circ}\text{C}/5\text{ \% CO}_2/2$ giờ)
51:00	- Loại bỏ dung dịch MTT - Thêm 100 µl isopropanol vào mỗi giếng - Lắc đĩa 10 phút
51:30	Đo độ hấp thụ quang tại bước sóng 570 nm (bước sóng tham chiếu 650 nm)

Các bước tiến hành theo sơ đồ sau:



2.2.2.4. Tính kết quả

$$\% \text{ khả năng sống của tế bào} = \frac{OD_{570T}}{OD_{57B}} \times 100$$

Giá trị % khả năng sống của tế bào của mỗi mẫu thử được tính theo công thức:

OD_{570T} : Độ hấp thụ của giếng chứa mẫu thử.

OD_{570B} : Độ hấp thụ trung bình của các giếng chứa mẫu trắng kiểm soát.

2.2.2.5. Đánh giá kết quả

- Phép thử có hiệu lực khi
- + Giá trị OD_{570} trung bình của tất cả mẫu trắng kiểm soát $\geq 0,2$;
- + Giá trị OD_{570} trung bình của mẫu trắng kiểm soát ở bên trái và ở bên phải đĩa 96 giếng phải không chênh lệch quá 15 % so với giá trị OD_{570} trung bình của tất cả mẫu trắng kiểm soát;
- + % khả năng sống của tế bào ở các giếng chứa dịch chiết mẫu thử 50 % phải bằng hoặc cao hơn ở các giếng chứa dịch chiết mẫu thử 100 %.
- Nhận định kết quả
- + Mẫu thử được xem là không gây độc tính tế bào khi: % khả năng sống trung bình của tế bào ở các giếng chứa dịch chiết mẫu thử 100 % ≥ 70 %.
- + Mẫu thử được xem là gây độc tế bào khi: % khả năng sống trung bình của tế bào ở các giếng chứa dịch chiết mẫu thử 100 % < 70 %.

3. Kết quả và bàn luận

3.1. Tính thích hợp hệ thống

Sử dụng mẫu trắng kiểm soát để kiểm tra tính thích hợp hệ thống. Bố trí các mẫu trắng kiểm soát trên đĩa 96 giếng ở vị trí bên trái (từ B2 đến G2) và bên phải (từ B11 đến G11). Tiến hành theo qui trình phân tích mục 2.2.2.3. trên tế bào Vero 76, ghi lại độ hấp thụ tại bước sóng 570 nm. Kết quả thể hiện ở Bảng 1.

Bảng 1. Khảo sát tính thích hợp của hệ thống

STT	OD Mẫu trắng KS trái	OD Mẫu trắng KS phải
1	0,5452	0,5209
2	0,5347	0,5550
3	0,5411	0,5419
4	0,5248	0,5591
5	0,5402	0,5564
6	0,5267	0,5030
TB trái/phải	0,5355	0,5394
TB chung	0,5374	
Chênh lệch (%)	-0,37	0,37

Kết quả thu được ở Bảng 1 cho thấy giá trị OD_{570} trung bình của tất cả mẫu trắng kiểm soát ($0,5374$) $\geq 0,2$ và chênh lệch giá trị OD_{570} trung bình của mẫu trắng kiểm soát ở các giếng bên trái và bên phải đĩa 96 giếng ($0,37$ %) < 15 % so với giá trị OD_{570} trung bình của tất cả các giếng mẫu trắng kiểm soát. Như vậy, phương pháp thử nghiệm độc tính tế bào *in vitro* bằng thuốc thử

MTT trên tế bào Vero 76 đạt yêu cầu về tính thích hợp của hệ thống.

3.2. Tính phù hợp của phương pháp

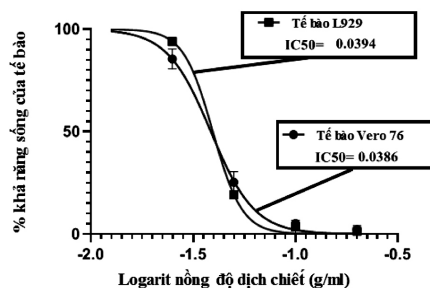
3.2.1. Tính phù hợp trên mẫu đối chứng dương và mẫu đối chứng âm.

- Mẫu đối chứng dương: Cắt tấm đối chứng dương có trọng lượng 0,7799 g vào bình chiết, hấp tiệt trùng ở 121 °C trong 15 phút. Thêm 3,90 ml môi trường nuôi cấy vào bình, ủ ở 37 °C trong 24 giờ thu được dung dịch đối chứng dương 200 %. Từ dung dịch đối chứng dương 200 % pha loãng thành các dung dịch đối chứng dương 100 %, 50 %, 25 % và 12,5 % bằng môi trường nuôi cấy.

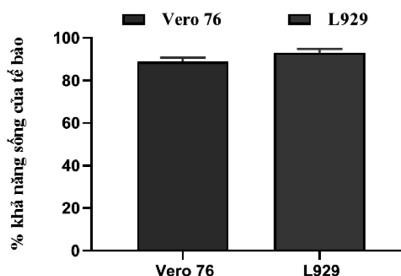
- Mẫu đối chứng âm: Cắt tấm đối chứng âm có trọng lượng 0,3952 g vào bình chiết, hấp tiệt trùng ở 121 °C trong 15 phút. Thêm 3,95 ml môi trường nuôi cấy vào bình, ủ ở 37 °C trong 24 giờ thu được dung dịch đối chứng âm 100 %.

- Mẫu trắng kiểm soát: Là môi trường nuôi cấy ủ ở 37 °C trong 24 giờ.

Tiến hành song song theo qui trình phân tích mục 2.2.2.3. trên tế bào Vero 76 và tế bào L929 ghi lại độ hấp thụ tại bước sóng 570 nm, từ đó tính khả năng sống của tế bào ở từng nồng độ thử nghiệm. Kết quả thể hiện ở Hình 1 và Hình 2.



Hình 1. Độc tính tế bào của mẫu đối chứng dương trên tế bào Vero 76 và L929



Hình 2. Độc tính tế bào của mẫu đối chứng âm trên tế bào Vero 76 và L929

Kết quả cho thấy giá trị IC_{50} của mẫu đối chứng dương trên tế bào Vero 76 (0,0386 g/ml) và của tế bào L929 (0,0394 g/ml). Chênh lệch về độc tính tế bào của mẫu đối chứng âm trên tế bào Vero 76 (89,01 %) và tế bào L929 (93,32 %) là 4,3 %. Như vậy, có sự tương

đồng về độc tính tế bào gây ra bởi mẫu đối chứng dương và đối chứng âm trên tế bào Vero 76 và L929.

3.2.1. Tính phù hợp trên mẫu thử

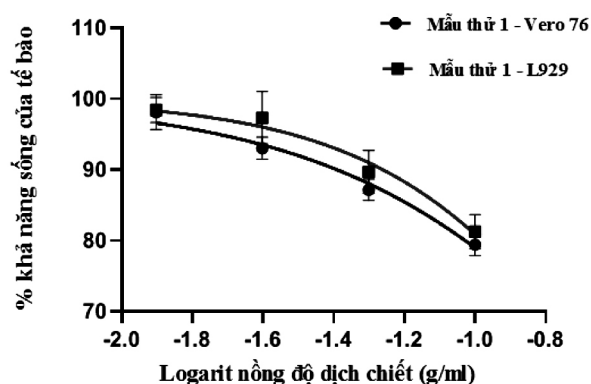
Các mẫu thử được chuẩn bị theo Bảng 2.

Bảng 2. Chuẩn bị mẫu thử

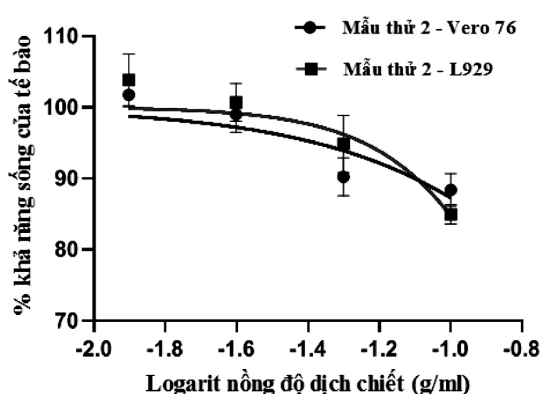
Mẫu thử	Khối lượng (g)	Môi trường nuôi cấy (ml)	Ghi chú
Mẫu thử 1	0,8164	4,08	
Mẫu thử 2	0,9864	4,93	
Mẫu thử 3	1 xy lạnh	10	Hút 10 ml môi trường nuôi cấy vào 1 xy lạnh
Mẫu thử 4	1,8639	9,32	

Ủ bình chiết mẫu thử ở 37 °C trong 24 giờ thu được dung dịch mẫu thử 100%. Từ dung dịch mẫu thử 100% pha loãng thành các dung dịch mẫu thử 50 %, 25 % và 12,5 % bằng môi trường nuôi cấy.

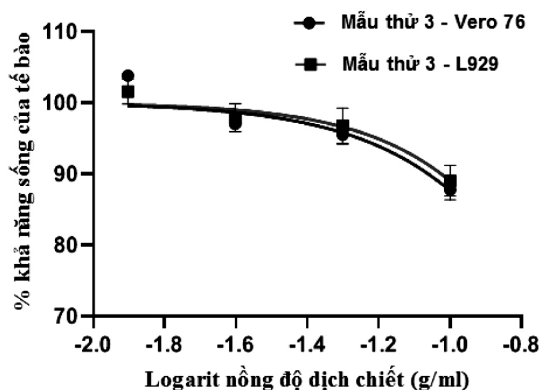
Tiến hành song song theo qui trình phân tích mục 2.2.2.3. trên tế bào Vero 76 và tế bào L929 ghi lại độ hấp thụ tại bước sóng 570 nm, từ đó tính khả năng sống của tế bào ở từng nồng độ thử nghiệm. Kết quả thể hiện từ Hình 3 đến Hình 6.



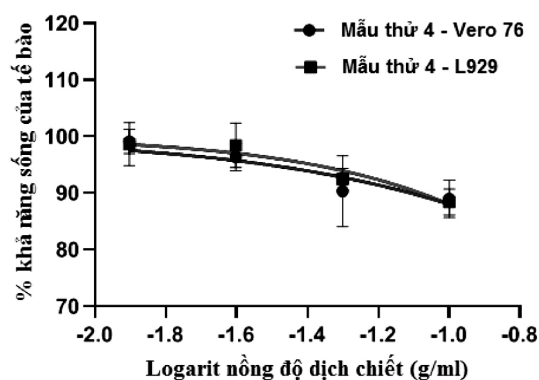
Hình 3. Độc tính tế bào của mẫu thử 1 trên tế bào Vero 76 và L929



Hình 4. Độc tính tế bào của mẫu thử 2 trên tế bào Vero 76 và L929



Hình 5. Độc tính tế bào của mẫu thử 3 trên tế bào Vero 76 và L929 và L929



Hình 6. Độc tính tế bào của mẫu thử 4 trên tế bào Vero 76 và và L929

Từ kết quả trên cho thấy chênh lệch phần trăm khả năng sống của tế bào ở các mẫu thử nồng độ 100 % trên tế bào Vero 76 và L929: mẫu dây dẫn đường mạch máu -1,8 %, mẫu ống thông mạch máu 5,3 %, mẫu bơm tiêm -1,2 % và mẫu dụng cụ mở đường mạch máu 0,6 %. Như vậy, có sự tương đồng về độc tính tế bào gây ra bởi 4 nền mẫu thử khác nhau trên tế bào vero 76 và tế bào L929.

3.3. Độ đặc hiệu

- Đối chứng âm: Sử dụng dung dịch đối chứng âm phân tích phù hợp của phương pháp.

- Đối chứng dương: Sử dụng mẫu đối chứng dương 100 % phân tích phù hợp của phương pháp.
- Mẫu trắng kiểm soát: Là môi trường nuôi cấy ủ ở 37 °C trong 24 giờ.
- Mẫu thử: Sử dụng mẫu thử 2 (nồng độ 100 %) ở phân tích phù hợp của phương pháp.
- Mẫu Blank: Không chứa tế bào, mẫu thử chỉ có dung dịch MTT.

Tiến hành theo qui trình phân tích mục 2.2.2.3. trên tế bào Vero 76, ghi lại độ hấp thụ tại bước sóng 570 nm, từ đó tính % tế bào sống của các mẫu đối chứng âm, đối chứng dương và mẫu thử. Kết quả thể hiện ở Bảng 3.

Bảng 3. Khảo sát độ đặc hiệu của phương pháp

STT	Độ hấp thụ (OD)		% khả năng sống của tế bào sống (%)		
	<i>Blank</i>	<i>Mẫu trắng kiểm soát</i>	<i>ĐC âm</i>	<i>ĐC dương 100 %</i>	<i>Mẫu thử 100 %</i>
1	0,0421	0,5452	90,05	4,58	85,00
2	0,0453	0,5347	86,88	6,97	85,16
3	0,0436	0,5411	90,09	3,83	84,82
TB	0,0437	0,5403	89,01	5,13	84,99

Kết quả cho thấy có sự chênh lệch đáng kể độ hấp thụ của mẫu trắng kiểm soát (0,5403) và mẫu Blank (0,0437). Ngoài ra, phần trăm khả năng sống của tế bào của mẫu đối chứng âm (89,91 %) và mẫu thử (84,99 %) > 70 %. Phần trăm khả năng sống của tế bào của mẫu đối chứng dương 100 % (3,49 %) < 70 %. Như vậy, phương pháp thử nghiệm độc tính tế bào bằng thuốc thử MTT trên tế bào Vero 76 đạt yêu cầu về tính đặc hiệu.

3.4. Độ lặp lại

- Chuẩn bị mẫu thử: Sử dụng các mẫu thử 100 % ở phân tích thích phù hợp của phương pháp. Mỗi mẫu thử tiến hành lặp lại 6 lần.

Tiến hành theo qui trình phân tích mục 2.2.2.3. trên tế bào Vero 76, ghi lại độ hấp thụ tại bước sóng 570 nm. Kết quả thể hiện ở Bảng 4.

Bảng 4. Khảo sát độ lặp lại của phương pháp

STT	OD Thử 1	OD Thử 2	OD Thử 3	OD Thử 4
1	0,4205	0,4634	0,4857	0,5016
2	0,4552	0,4642	0,4731	0,5145
3	0,4537	0,4625	0,4633	0,5019
4	0,4287	0,4895	0,4632	0,4900
5	0,4486	0,4722	0,5098	0,4959
6	0,4300	0,4931	0,4975	0,4851
TB	0,4395	0,4742	0,4821	0,4982
RSD (%)	3,37	2,91	3,95	2,08

Từ kết quả trên cho thấy phương pháp thử nghiệm độc tính tế bào bằng thuốc thử MTT trên tế bào Vero 76 đạt yêu cầu về độ lặp lại phù hợp với phép thử sinh học.

4. Kết luận

Qua khảo sát chúng tôi đã thẩm định được phương pháp thử nghiệm độc tính tế bào *in vitro* bằng thuốc thử

MTT trên tế bào Vero 76 bao gồm tính thích hợp của hệ thống, tính phù hợp của phương pháp, độ đặc hiệu và độ lặp lại. Kết quả thẩm định cho thấy phương pháp phù hợp cho việc thử nghiệm độc tính tế bào *in vitro* bằng

thuốc thử MTT trên tế bào Vero 76 trên các nền mẫu trang thiết bị y tế như ống thông mạch, ống dẫn đường, bơm tiêm và dụng cụ mở đường.

Tài liệu tham khảo

1. Nghị định 98/2021/NĐ-CP (2021), *Nghị định về quản lý trang thiết bị y tế*, trang 1-25.
2. TCVN 7391 - 5 - 2005, *Đánh giá sinh học trang thiết bị y tế - Phần 5: Phép thử độc tính tế bào in vitro*, trang 7 - 17.
3. ISO 10993-5:2009 (E), *Annex C*, pages 24 - 28.
4. ISO 10993-12: 2021, pages 6 - 8.
5. United states Pharmacopoeia 44, <1031> *The biocompatibility of materials used in drug containers, medical devices, and implants*.
6. ATCC (American Type Culture Collection), Vero 76, <https://www.atcc.org/products/crl-1587>.

SUMMARY

The in vitro cytotoxicity assay method using the MTT reagent on Vero 76 cells was validated for system suitability, method suitability, specificity and repeatability. The validation results showed that the method using MTT reagent on Vero 76 cells was suitable for in vitro cytotoxicity testing of medical devices.

(Ngày nhận bài: 05/03/2022; Ngày phản biện: 15/03/2022; Ngày duyệt đăng: 25/03/2022)

NGHIÊN CỨU ĐỊNH LƯỢNG RACTOPAMIN HYDROCLORID TỒN DƯ TRONG THỊT GÀ BẰNG PHƯƠNG PHÁP LC – MS/MS

NGUYỄN THỊ HỒNG VÂN, CHỦ VĂN MẪN

Học viện Quân y

LÊ THỊ HUỖNG HOA✉

Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương

Từ khóa: Ractopamin, Chất cấm tồn dư, Định lượng chất cấm, LC -MS/MS

1. Đặt vấn đề

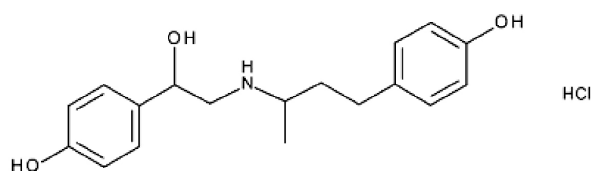
Vệ sinh an toàn thực phẩm luôn là một trong các vấn đề được quan tâm hàng đầu trong toàn xã hội của mọi quốc gia vì nó liên quan trực tiếp đến sức khỏe của người dân. Các chất nhóm β - agonists đã và đang bị lạm dụng sử dụng (trộn vào thức ăn) như một loại hormon tăng trưởng, tạo nạc cho gia súc và gia cầm trong sản xuất và chăn nuôi, một trong số đó phải kể đến là Ractopamin hydroclorid (RAC.HCl) (Hình 1) [1], [2], [3].

Nhằm tăng năng suất chăn nuôi bằng RAC.HCl, người dân sẽ trộn thêm chất này vào giai đoạn gần xuất chuồng, nên nhiều trường hợp dư lượng dư lượng của chúng trong thịt khi sử dụng, dư lượng này có thể gây

nên nhiều tác hại xấu cho sức khỏe người tiêu dùng như: có thể gây triệu chứng ngộ độc cấp, buồn nôn, chóng mặt, run cơ, đánh trống ngực, tăng huyết áp, thúc đẩy bệnh tim mạch, thậm chí tử vong [3]. Nếu sử dụng trong thời gian kéo dài có thể gây dậy thì sớm ở trẻ em, có thể dẫn đến rối loạn hệ thống hormon ...[3]. Ở Việt nam, từ năm 2002 đến nay Ractopamin vẫn được liệt kê trong danh sách những hóa chất, hormon cấm sử dụng trong sản xuất kinh doanh động vật trên cạn [1], [2]... Vì vậy, việc nghiên cứu tình trạng sử dụng cũng như xác định lượng tồn dư trong thực phẩm cần được quan tâm.

Với sự phát triển của khoa học công nghệ, có nhiều phương pháp có thể xác định sự có mặt của RAC.HCl như kỹ thuật miễn dịch Elisa, tuy nhiên, phương pháp

này chỉ phù hợp cho sàng lọc do dễ gây phản ứng chéo, gây tỉ lệ dương tính giả hoặc âm tính giả. Sắc ký khí kết nối khối phổ là phương pháp phổ biến nhưng phải tạo dẫn xuất dễ gây tạp chất hoặc test Kit đánh giá cho kết quả nhanh nhưng độ chính xác và giới hạn phát hiện không cao. Hiện nay, sắc ký lỏng khối phổ (LC-MS/MS) được đánh giá là phương pháp có độ nhạy cao, phân tích nhanh, chính xác đang được ứng dụng nhiều trong phân tích, định lượng các chất trong dịch sinh học, trong đó có phân tích Ractopamin.HCl trong thịt bò và thịt lợn [4], [5], [6]. Trong bài này, chúng tôi xin giới thiệu kết quả nghiên cứu xây dựng phương pháp định lượng Ractopamin.HCl trong thịt gà bằng phương pháp LC-MS/MS



Hình 1. Công thức hóa học của Ractopamin hydroclorid

2. Thực nghiệm

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

2.1.1. Trang thiết bị: Đã được hiệu chuẩn theo yêu cầu của ISO/IEC 17025 và GLP

- Máy sắc ký lỏng ACQUITY UPLC H-Class's Quaternary Solvent Manager, khối phổ: Xevo TQD Waters; Cột sắc ký: ACQUITY UPLC® BEH C₁₈ (2,1 x 50 mm, 1,7 μm)

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

- Máy ly tâm; máy đo pH Metrohm 780 (Thụy sĩ); máy lắc vortex

- Cột chiết SPE MCX, micropipet, dụng cụ thủy tinh cần thiết (bình định mức, pipet, ống đong, phễu lọc...)

2.1.2. Hoá chất và chất chuẩn

Dung môi, hóa chất: Acetonitril, methanol, acid hydrophosphoric, amoni hydroxyd, dikali hydrophosphat K₂HPO₄ đạt tiêu chuẩn tinh khiết dùng cho phân tích sắc ký

Chất đối chiếu: Ractopamin hydroclorid của Sigma-Aldrich, Mỹ, số lô: BCBT4623; hàm lượng 95,0 %

2.2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Đối tượng nghiên cứu

- **Mẫu trắng:** mẫu thịt gà được lấy tại Ban Cung cấp Động vật của Học viện Quân Y, không chứa chất RAC.HCl.

- **Mẫu chuẩn:** Cân chất chuẩn và pha trong methanol. Sau đó thêm dịch chiết từ mẫu trắng để được các dung dịch chuẩn trong nền mẫu.

- **Mẫu tự tạo:** Thêm chất chuẩn RAC.HCl vào mẫu thịt gà đã xay nhuyễn.

- **Mẫu QC (quality control sample):** chuẩn bị độc lập với mẫu chuẩn.

2.2.1. Phương pháp nghiên cứu

- **Phương pháp xử lý mẫu:** Khảo sát, lựa chọn phương pháp xử lý mẫu phù hợp để chiết được tối đa hoạt chất và loại được các tạp chất

- **Khảo sát, lựa chọn các điều kiện phân tích:** Sử dụng hệ thống sắc ký khối phổ UPLC - MS/MS loại tứ cực chấp 3 với nguồn ion hóa kiểu ESI. Khảo sát lựa chọn điều kiện sắc ký (cột sắc ký, pha động, tốc độ dòng, thể tích tiêm mẫu, điều kiện khối phổ...). Chọn chế độ khảo sát tự động để chọn ion mẹ, ion con dùng để định tính, định lượng. Các thông số MS/MS được tự động tối ưu bằng chế độ MS tune của thiết bị.

- **Thẩm định phương pháp đã chọn:** Về độ đặc hiệu, khoảng tuyến tính, độ chính xác, độ đúng, giới hạn định lượng dưới (LLOQ), giới hạn định lượng (LOQ), giới hạn định lượng trên (ULOQ), đánh giá độ chọn lọc và các giá trị thu hồi của các mẫu thêm chuẩn vào nền mẫu... Đánh giá độ bền của Ractopamin trong dịch chiết mẫu đặt tại bộ phận tiêm mẫu tự động (autosample), trong dịch chiết thịt gà được bảo quản dài ngày ... Các kết quả thực nghiệm được tính toán và xử lý thống kê trên Microsoft Excel với các hàm thống kê thông dụng. Kết quả thẩm định phải đạt các yêu cầu của phương pháp phân tích các chất trong dịch sinh học [7], [8].

3. Kết quả nghiên cứu

3.1. Khảo sát điều kiện sắc ký

Thử nghiệm được tiến hành trên hệ thống sắc ký ACQUITY UPLC H-Class's Quaternary Solvent Manager, khối phổ: Xevo TQD Waters; cột sắc ký ACQUITY UPLC® BEH C₁₈ (50 × 2,1 mm; 1,7 μm), Nhiệt độ cột: 30 °C; Thể tích tiêm: 2 μl, Tốc độ dòng: 0,2 ml/phút với pha động: acetonitril - dung dịch acid formic 0,1 % ở các tỷ lệ (95 : 5) và (85 : 15). Kết quả cho thấy pha động ở tỷ lệ acetonitril - dung dịch acid formic 0,1 % (85 : 15) cho pic cân đối, được tách riêng biệt, thời gian lưu phù hợp nên được chọn cho nghiên cứu tiếp theo.

Lựa chọn điều kiện khối phổ

Bảng 1. Các thông số của detector khối phổ để định lượng Ractopamin hydroclorid

Thông số	Chất phân tích
Chế độ ion hóa	ESI (+)
Điện thế mao quản (kV)	1,5
Điện thế cone (V)	62
Nhiệt độ khử Solvat (°C)	550
Tốc độ khí khử Solvat (L/H)	900
Tốc độ khí cone (L/H)	25
Năng lượng va chạm (V)	16
Ion mẹ (Dalton)	302,07
Ion con (Dalton)	164,06

3.2. Phương pháp chuẩn bị mẫu

Mẫu trắng: là mẫu dịch chiết từ thịt gà theo qui trình chiết mẫu thử

Mẫu chuẩn: Các mẫu chuẩn được chuẩn bị bằng cách thêm chuẩn vào nền mẫu. Từ dung dịch chuẩn gốc 100 mg/ml RAC.HCl trong MeOH, pha thành dung dịch chuẩn trung gian trong MeOH có nồng độ 1000 ng/ml. Sau đó, từ các dung dịch này, chuẩn bị các dung dịch chuẩn có nồng độ từ 45 ng/ml đến 9500 ng/ml bằng cách phối hợp với nền mẫu trắng để được các dung dịch xây dựng đường chuẩn

Mẫu kiểm tra (QC): Hòa tan chất chuẩn RAC.HCl trong methanol để thu được dung dịch chuẩn gốc có nồng độ RAC.HCl chính xác khoảng 100 mg/ml (QC-W). Chuẩn bị độc lập với mẫu chuẩn. Pha loãng với methanol thành chuẩn kiểm tra làm việc QC (cách pha tương tự pha mẫu chuẩn). Từ đó, pha với dịch nền mẫu trắng để tạo thành chuẩn LQC (giới hạn định lượng) = 3 LLOQ; MQC

gần với nồng độ giữa trong dãy chuẩn; HQC (ở nồng độ cao trong dãy chuẩn) = 60 – 80 % ULOQ.

Mẫu thử: Cân 1 g thịt gà đã xay nhuyễn cho vào ống ly tâm 50 ml. Thêm 10 ml dung dịch K_2HPO_4 0,1M, lắc vortex 10 phút. Ly tâm 15 phút ở tốc độ 4000 vòng/phút. Lấy 5 ml dịch chiết (sau ly tâm) cho qua cột SPE MCX (Cột SPE MCX đã được hoạt hóa bằng 5 ml MeOH, 5 ml nước cất, sau đó cho 5 ml đệm chiết mẫu K_2HPO_4 0,1M). Tải mẫu lên cột, tốc độ 1 ml/phút. (Không để khô cột giai đoạn cho mẫu lên cột và rửa cột). Rửa bằng 4 ml nước, rửa tiếp bằng 4 ml MeOH. Rửa giải bằng 4 ml dung dịch NH_4OH 5 % trong MeOH. Lấy dung dịch rửa giải, thổi khô bằng khí nitơ ở 40 °C. Hòa tan cần khô bằng 1 ml hỗn hợp của acetonitril và acid formic (85 : 15), lắc bằng máy vortex và lọc qua màng lọc 0,45 μ m, được dung dịch để tiêm sắc ký

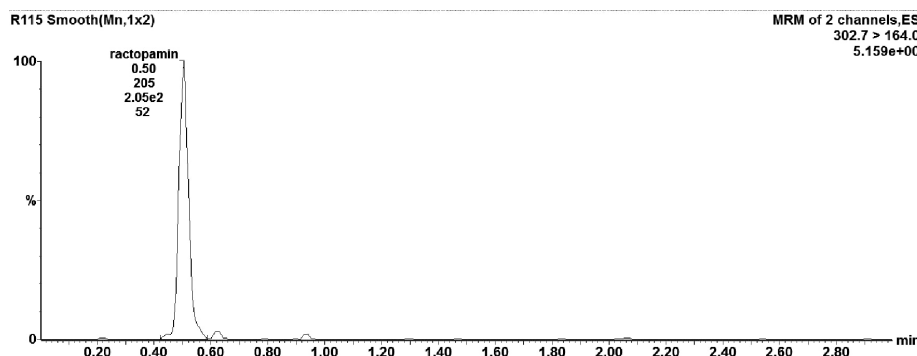
3.3. Thẩm định phương pháp phân tích

3.3.1. Tính tương thích của hệ thống

Phân tích sắc ký lặp lại 6 lần mẫu tự tạo (thêm chất chuẩn vào nền mẫu thịt gà), ghi lại sắc ký đồ, đáp ứng pic của 6 lần phân tích. Kết quả được nêu ra ở Bảng 2 và Hình 2.

Bảng 2. Sự phù hợp của hệ thống sắc ký

STT	RAC.HCl (48 ng/ml)	
	t_R	Đáp ứng pic (counts)
1	0,5	199,672
2	0,5	204,565
3	0,51	199,803
4	0,5	204,547
5	0,5	208,904
6	0,5	203,302
TB	0,5	203,466
CV (%)	0,81	1,69

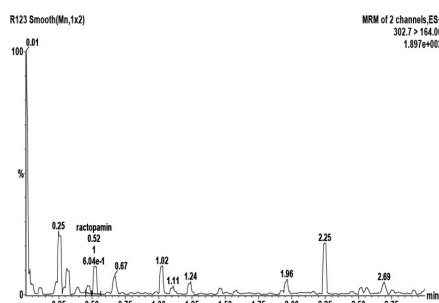


Hình 2. Sắc ký đồ mẫu kiểm tra sự tương thích của hệ thống sắc ký

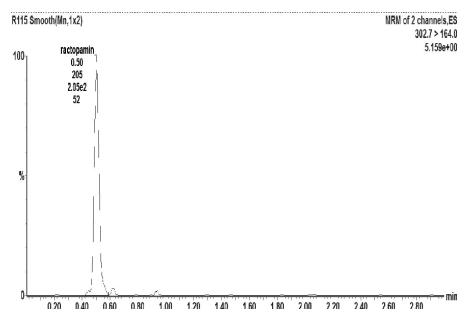
Như vậy, độ lệch về thời gian lưu của RAC.HCl là 0,81 % (< 2 %), của diện tích pic là 1,69 % (< 5 %) đều đạt

yêu cầu, phương pháp là phù hợp với hệ thống sắc ký đã chọn.

3.3.2. Độ đặc hiệu của phương pháp



a)



b)

Hình 3. Sắc ký đồ các mẫu: mẫu trắng a); mẫu thêm chuẩn RAC.HCl nồng độ ở LLOQ: b)

Bảng 3. Kết quả xác định độ chọn lọc và giới hạn định lượng dưới (LLOQ)

Số TT	Đáp ứng mẫu trắng (counts)	Mẫu thêm chuẩn (48 ng/ml)			Tỷ lệ đáp ứng mẫu trắng/mẫu thêm chuẩn (%)
		Đáp ứng pic (counts)	Nồng độ tìm thấy	Độ đúng (%)	
1	0,019	199,672	38,15	80,3	0,01
2	0,604	204,565	45,89	96,6	0,29
3	1,315	199,803	38,35	80,7	0,66
4	0,032	204,547	45,87	96,5	0,02
5	0,035	208,904	52,8	111,1	0,01
6	0,163	203,302	43,89	96,5	0,08
$\bar{X}$		203,466	44,15	93,6	
CV (%)		1,69	12,42	12,41	
Kết luận		Đạt	Đạt	Đạt	Đạt (<20%)

Kết quả cho thấy: Trên sắc ký đồ, pic của RAC.HCl được nhận diện rõ ràng, tách hoàn toàn khỏi pic tạp chất có trong mẫu. Tại thời điểm 0,51 phút (trùng với thời gian lưu của RAC.HCl): Tỷ lệ đáp ứng của mẫu có hoạt chất tại nồng độ 48 ng/ml so với mẫu trắng gấp nhiều lần mẫu trắng, đạt yêu cầu (Theo các tài liệu phải gấp ít nhất là 5 lần). Phương pháp đạt yêu cầu về độ chọn lọc, đặc hiệu. Giá trị 48 ng/ml là giới hạn định lượng dưới của phương pháp với tỷ lệ thu hồi đạt từ 80,3 đến 111,1 %, độ lệch CV = 12,41 %. Như vậy độ đúng và độ lặp lại tại nồng độ này đều < 20 %, đạt yêu cầu phương pháp phân tích trong dịch sinh học [7], [8]...

3.3.3. Đường chuẩn và khoảng tuyến tính

Phân tích các mẫu chuẩn RAC.HCl có nồng độ 47,5; 95; 190; 475; 950; 1900; 4750; 9500 ng/ml trong mẫu thịt gà theo quy trình đã xây dựng. Kết quả được trình bày trong Bảng 4 và Hình 4. Kết quả từ Bảng 4 và Hình 4 ta thấy, tỷ lệ diện tích pic và nồng độ RAC.HCl phụ thuộc tuyến tính chặt chẽ với hệ số tương quan cao, $R^2 = 0,9975$. Nồng độ RAC.HCl tính lại theo đường chuẩn

so với lý thuyết nằm trong khoảng 92,72 - 114,8 %, đều nằm trong khoảng giới hạn cho phép là 85 - 115 % và 80 - 120 % đối với điểm LLOQ. Duy nhất tại điểm nồng độ S6 là nằm ngoài khoảng 85 - 115 % (116,1 %) nhưng vẫn trong yêu cầu cho phép (75 % số điểm nằm trong khoảng tuyến tính). Khoảng nồng độ 47,5 ng/ml - 9500 ng/ml là khá rộng, đảm bảo phương pháp có độ tin cậy khi định lượng RAC.HCl ở nhiều mức nồng độ khác nhau, đáp ứng quy định của phương pháp phân tích thuốc trong dịch sinh học [7], [8]

3.3.4. Độ đúng và độ chính xác của phương pháp

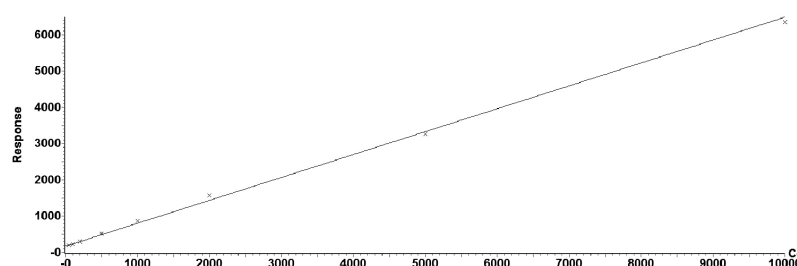
Thẩm định độ đúng và độ lặp lại trên 4 loại mẫu: LLOQ, LQC, MQC và HQC chứa RAC.HCl có nồng độ tương ứng là 50 ng/ml; 150 ng/ml; 750 ng/ml và 7500 ng/ml. Kết quả được trình bày ở Bảng 5. Kết quả khảo sát cho thấy: Phương pháp định lượng ở mức nồng độ LLOQ có độ đúng trong ngày (từ 80,1-111,1 %) và khác ngày (từ 80,1 - 115,4 %), là trong khoảng cho phép 80 - 120 %. Ở 3 mức nồng độ còn lại (từ 85,0 - 113,2 %) nằm trong giới hạn cho phép 85- 115 %. Độ chính xác có giá

trị CV % từ 9,25 - 13,86 % (đạt yêu cầu < 15 %). Như vậy, độ đúng, độ chính xác trong ngày và khác ngày phù hợp với phương pháp phân tích trong mẫu thịt gà (dịch sinh học) [7], [8].

Bảng 4. Sự tương quan giữa nồng độ và diện tích pic RAC.HCl trong mẫu thịt gà

Tên mẫu	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8
Nồng độ thực (ng/mL)	47,5	95	190	475	950	1900	4750	9500
Đáp ứng pic (counts)	203,395	229,234	308,190	512,760	864,366	1568,774	3267,401	6350,792
Phương trình hồi quy	$Y = 0,631256 X + 175,592; R^2 = 0,9975$							
Nồng độ xác định từ đường chuẩn (ng/mL)	44,05	89,45	210,05	534,12	1091,11	2207,00	4897,87	9782,40
Nồng độ xác định từ đường chuẩn so với giá trị thực (%)	92,7	109,7	110,5	112,4	114,8	116,1	103,1	102,9

Compound name: ractopamin
Correlation coefficient: $r = 0,998780, r^2 = 0,997561$
Calibration curve: $0,631256 \times x + 175,592$
Response type: External Std, Area
Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: 1/x, Axis trans: None



Hình 4. Đường chuẩn của Ractopamin hydroclorid

Bảng 5. Kết quả khảo sát độ đúng, độ lặp lại trong ngày và khác ngày

Ngày	Mẫu	LLOQ (50 ng/mL)		LQC (150 ng/mL)		MQC (750 ng/mL)		HQC (7500 ng/mL)	
		Nồng độ ^(a) (ng/mL)	Độ đúng ^(b) (%)	Nồng độ ^(a) (ng/mL)	Độ đúng ^(b) (%)	Nồng độ ^(a) (ng/mL)	Độ đúng ^(b) (%)	Nồng độ ^(a) (ng/mL)	Độ đúng ^(b) (%)
I	1	38,14	80,3	123,13	86,4	605,7	85,1	7864,91	110,4
	2	45,89	96,6	133,20	93,4	750,6	105,3	7209,00	101,1
	3	37,97	80,1	142,67	100,1	632,7	88,9	6056,31	85,0
	4	45,88	96,6	159,90	112,2	818,56	114,8	8009,72	112,4
	5	52,77	111,1	151,67	106,4	714,32	100,2	6219,23	87,3
II	1	44,41	93,5	125,09	87,7	713,92	100,2	7046,63	98,9
	2	40,37	85,0	126,76	88,9	654,07	91,8	7609,50	106,8
	3	54,29	114,3	148,68	88,5	607,76	85,3	7987,12	112,1
	4	47,40	99,8	159,87	112,2	672,60	94,9	7174,87	100,7
	5	52,53	110,6	136,94	96,1	806,55	113,2	8065,51	113,2
III	1	38,61	81,3	124,38	87,3	688,98	96,7	7481,05	105,0
	2	44,98	94,7	145,52	102,1	652,65	91,6	7146,37	100,3
	3	56,71	115,4	125,81	88,2	681,15	95,6	7659,37	107,5
	4	55,05	115,3	146,94	103,1	788,73	110,7	7310,25	102,6
	5	42,37	89,2	132,23	91,0	665,95	93,6	6426,75	90,2
$\bar{X}$		46,49	97,8	138,85	96,2	696,95	97,8	7284,44	101,8
CV (%)		13,86	13,84	9,25	9,50	9,75	9,70	8,77	8,81

(a): tính từ phương trình hồi quy; (b): % so với nồng độ thực

3.3.5. Ảnh hưởng của nền mẫu:

Đánh giá các kết quả thu được từ các mẫu tự tạo

LLOQ, LQC, MQC và HQC sẽ dao động trong khoảng nào, kết quả thể hiện ở Bảng 6.

Bảng 6. Kết quả khảo sát các giá trị thu hồi từ các mẫu tự tạo

Ngày	Mẫu	LLOQ (50 ng/mL)		LQC (150 ng/mL)		MQC (750 ng/mL)		HQC (7500 ng/mL)	
		Nồng độ ^(a) (ng/mL)	Độ đúng ^(b) (%)	Nồng độ ^(a) (ng/mL)	Độ đúng ^(b) (%)	Nồng độ ^(a) (ng/mL)	Độ đúng ^(b) (%)	Nồng độ ^(a) (ng/mL)	Độ đúng ^(b) (%)
I	1	38,14	80,3	123,13	86,4	605,7	85,1	7864,91	110,4
	2	45,89	96,6	133,20	93,4	750,6	105,3	7209,00	101,1
	3	37,97	80,1	142,67	100,1	632,7	88,9	6056,31	85,0
	4	45,88	96,6	159,90	112,2	818,56	114,8	8009,72	112,4
	5	52,77	111,1	151,67	106,4	714,32	100,2	6219,23	87,3
	TB		92,94		99,7		98,86		99,24
	Giới hạn $\pm 20\%$ LLOQ		($\pm 18,59$) 74,35 - 111,53		81,1 - 118,29		80,27 - 117,45		80,65 - 117,83
II	1	44,41	93,5	125,09	87,7	713,92	100,2	7046,63	98,9
	2	40,37	85,0	126,76	88,9	654,07	91,8	7609,50	106,8
	3	54,29	114,3	148,68	88,5	607,76	85,3	7987,12	112,1
	4	47,40	99,8	159,87	112,2	672,60	94,9	7174,87	100,7
	5	52,53	110,6	136,94	96,1	806,55	113,2	8065,51	113,2
	TB		100,64		94,68		97,1		106,34
	Giới hạn $\pm 20\%$ LLOQ		($\pm 20,13$) 80,51 - 120,77		74,55 - 114,81		76,95 - 117,21		86,21 - 126,47
III	1	38,61	81,3	124,38	87,3	688,98	96,7	7481,05	105,0
	2	44,98	94,7	145,52	102,1	652,65	91,6	7146,37	100,3
	3	56,71	115,4	125,81	88,2	681,15	95,6	7659,37	107,5
	4	55,05	115,3	146,94	103,1	788,73	110,7	7310,25	102,6
	5	42,37	89,2	132,23	91,0	665,95	93,6	6426,75	90,2
	TB		99,18		94,34		97,64		101,12
	Giới hạn $\pm 20\%$ LLOQ		($\pm 19,84$) 79,34 - 119,02		74,5 - 114,18		77,8 - 117,48		81,28 - 120,96

Kết quả thu được cho thấy, các giá trị thu hồi ở các mức nồng độ khác nhau trong các mẫu tự tạo đều nằm trong khoảng $\pm 20\%$ LLOQ. Theo tài liệu tham khảo của FDA năm 2018, cùng với kết quả về độ chọn lọc và độ đặc hiệu ở trên, kết quả này là đạt yêu cầu [8].

3.3.6. Độ ổn định của RAC.HCl trong dịch chiết từ thịt gà

Nghiên cứu độ ổn định của RAC.HCl có mặt trong mẫu dịch chiết thịt gà đã qua bảo quản trên các lô LQC (150 ng/ml) và HQC (7500 ng/ml). Đánh giá độ ổn định

của RAC.HCl bằng cách so sánh nồng độ RAC.HCl có trong các mẫu được bảo quản và các mẫu có nồng độ tương ứng được phân tích ngay sau khi hòa tan chuẩn RAC.HCl vào dịch chiết từ thịt gà. Kết quả được trình bày ở Bảng 7.

Từ kết quả của Bảng 7 ta thấy: Độ lệch % của nồng độ mẫu dịch chiết thịt gà qua bảo quản so với ban đầu sau 3 chu kì đông - rã ở 2 mức nồng độ LQC và HQC với độ lệch lần lượt là 8,3 và 5 % (đều < 15 %). Độ chính xác CV % dao động từ 4,9 - 7,6 % (đều < 15 %).

Bảng 7. Kết quả độ ổn định của RAC.HCl trong mẫu dịch chiết thịt gà đã bảo quản

Độ ổn định	Mẫu	Nồng độ ban đầu (ng/ml; n = 6)		Nồng độ sau bảo quản (ng/ml; n = 6)		Độ lệch (%)
		Nồng độ TB	CV (%)	Nồng độ TB	CV (%)	
Sau 3 chu kỳ đông - rã	LQC	147,6	7,1	159,9	7,6	8,3
	HQC	7234,0	6,7	7594,8	4,9	5
Ở nhiệt độ phòng trong thời gian ngắn (6 giờ)	LQC	147,6	7,1	153,8	6,1	4,2
	HQC	7234,0	6,7	7505,3	6,0	3,7
Độ ổn định trong autosampler (24 giờ, 20 °C)	LQC	147,6	7,1	150,0	6,0	2,7
	HQC	7234,0	1,6	7210,2	6,7	-0,3
Độ ổn định dài ngày (-35 °C ± 5 °C, 30 ngày)	LQC	147,6	7,1	157,8	8,4	6,9
	HQC	7234,0	6,7	7529,4	5,1	4,1

Độ ổn định của mẫu dịch chiết thịt gà qua bảo quản ở nhiệt độ phòng: độ lệch (%) nồng độ của mẫu này ở nồng độ LQC và HQC lần lượt là 4,2 % và 3,7 % (đều < 15 %) và giá trị CV % giữa các lần định lượng đều < 15 %. Độ ổn định của mẫu sau xử lý (auto sampler): Độ lệch nồng độ của mẫu dịch chiết thịt gà sau xử lý sau 24 h ở 2 mức nồng độ LQC và HQC lần lượt là 1,6 và - 0,3 %, đều < 15 %, đạt. Và độ chính xác CV % của các lần đo đều < 15 %.

- Độ lệch % của nồng độ mẫu thịt gà so với ban đầu sau thời gian bảo quản dài ngày (30 ngày) ở 2 mức nồng độ LQC và HQC là 6,9 % và 4,1 %, đều < 15 %.

4. Kết luận

Qua khảo sát nghiên cứu, một qui trình phân tích xác định dư lượng Ractopamin hydroclorid trong thịt gà bằng phương pháp LC-MS/MS đã được thiết lập với kỹ thuật chiết pha rắn và các điều kiện sắc ký và khối phổ phù hợp. Chất cảm Ractopamin hydroclorid được chiết tách ra khỏi mẫu thịt gà bằng kỹ thuật chiết pha rắn (SPE). Phương pháp phân tích tiếp theo là LC -MS/

MS với các điều kiện phân tích như sau: Cột sắc ký: ACQUITY UPLC® BEH C₁₈ (2,1 x 50 mm, 1,7 µm) được sử dụng làm pha tĩnh, pha động là hỗn hợp của acetonitril và dung dịch acid formic 0,1 % với tỷ lệ 85 : 15; tốc độ dòng là 0,2 ml/phút; detector khối phổ tứ cực chấp ba (ACQUITY UPLC H-Class's Quaternary Solvent Manager; Xevo TQD, Waters).

Kết quả thẩm định cho thấy, phương pháp có độ đặc hiệu cao, có giới hạn định lượng dưới nhỏ (LLOQ = 48 ng/ml), khoảng tuyến tính khá rộng (48 ng/ml đến 7500 ng/ml), có độ đúng cao (từ 80,1 –115,4 %) và độ lặp lại tốt với giá trị CV % nhỏ (9,25 đến 13,86 %), thời gian phân tích sắc ký nhanh, chất phân tích ổn định trong nền mẫu thịt gà với một thời gian dài (30 ngày). Phương pháp đưa ra đã đáp ứng các yêu cầu của phương pháp phân tích thuốc trong dịch sinh học của EMA và US-FDA [6], [9]. Chúng tôi hy vọng phương pháp này có thể áp dụng để định lượng Ractopamin hydroclorid trong các mẫu để xem xét sự nhiễm chất cảm này trong các chế phẩm từ thịt gà.

Tài liệu tham khảo

1. Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn (2002), Quyết định số 54/2002/QĐ-BNN ngày 20 tháng 6 năm 2002.
2. Nguyễn Xuân Dương (2018), *Nghiên cứu giải pháp kiểm soát chất cấm nhóm Beta- agonists (Clenbuterol, Salbutamol, Ractopamin) trong chăn nuôi lợn*, Nhà xuất bản Đại học Nông nghiệp, Luận án tiến sĩ nông nghiệp.
3. John M. Weiler, MD, Sergio Bonini, MD, Robert Coifman, MD, Timothy Craig, DO, Luis Delgado, MD (2007), American Academy of Allergy, Asthma & Immunology Work Group Report: Exercise-induced asthma, *Asthma Diagnosis and Treatment*. 119(6), pp. 1349-1358.
4. Q-B Lin, X-T Zhao, H Song, Y-L Pan (2012), Immunoaffinity chromatography purification and ultra-high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry determination of four β -agonists in beef, *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess*. 29(6), pp. 935-941.
5. In Kyung Sung, Seo Jung Park, Kyutae Kang, Min Young Kim, Seongbeom Cho (2015), Development and Application of a Method for Rapid and Simultaneous Determination of Three β -agonists (Clenbuterol, Ractopamine, and Zilpaterol) using Liquid Chromatography-tandem Mass Spectrometry, *Korean J Food Sci Anim Resour*. 35(1), pp. 121-9.
6. Kunping Yan, HuiqunZhang, WenliHui, HongliZhu, XinboLi, FangyiZhong, Xiu'eTong, ChaoChen (2016), Rapid screening of toxic salbutamol, ractopamin and clenbuterol in pork sample high- performance liquid chromatography-UV method, *Journal of Food and Drug Analysis*. 24 (2), pp.277-283.
7. European Medicines Agency, Committee for Medicinal Product for Human Use (2011), *Guideline on Bioanalytical Method Validation*.
8. Food and Drug Administration - USA (2018), *Bioanalytical Method Validation Guidance for Industry*, 1-26.

Summary

A method using ultra performance liquid chromatography tandem mass spectrometry was developed for determination of banned Ractopamin hydrochloride (RAC.HCl) substance in the chicken. The RAC.HCl was separated from chicken by SPE technique and was dissolved in the mobile phase. The LC-MS/MS method with the chromatographic conditions as follows: A new column ACQUITY UPLC® BEH C₁₈ (2.1 x 50 mm, 1.7 μ m) packed with octylsilyl silica gel for chromatography was used as stationary phase, a mixture of 85 volumes of acetonitrile and 15 volumes of 0.1 % formic acid solution was used as the mobile phase with a flow rate of 0.2 ml per minute, using a tandem quadrupole mass detector. (ACQUITY UPLC H-Class's Quaternary Solvent Manager; Xevo TQD, Waters). The experimental results proved that the assay was linear over the concentration from 48 ng/ml to 9500 ng/ml. The LLOQ was 48 ng/ml. The method was validated about the specificity, The intra-day and inter-day accuracy were within 80.1 % - 115.4 %. (CV = 9.25-13.86 %). The validation results proved that this method was suitable for determination of Ractopamin in accuracy the chicken preparation

(Ngày nhận bài: 21/01/2022; Ngày phản biện: 24/02/2022 ; Ngày duyệt đăng: 21/03/2022)

MỤC LỤC

	<i>Trang</i>
● Quản lý – Trao đổi nghiệp vụ	
- Định hướng nhiệm vụ công tác kiểm tra và giám sát chất lượng thuốc năm 2022. <i>PGS.TS. ĐOÀN CAO SON</i>	1
● Nghiên cứu khoa học	
- Xây dựng qui trình xác định giới hạn tạp chất liên quan tạp A của fenofibrat [(4-clorophenyl) (4-hydroxyphenyl)methanol] bằng phương pháp HPLC. <i>NGUYỄN THỊ HỒNG, VŨ HÀ KHUÊ, NGUYỄN THỊ LIÊN</i> ✉	2
- Xây dựng và thẩm định qui trình định lượng đồng thời desloratadin và chất bảo quản natri benzoat trong siro ho nghiên cứu bằng kỹ thuật sắc ký lỏng pha đảo. <i>NGUYỄN VIỆT CHÍNH, LÊ QUANG THẢO</i> ✉	8
- Thẩm định phương pháp thử nghiệm độc tính tế bào in vitro bằng thuốc thử MTT trên tế bào Vero 76. <i>LÊ VĂN ĐẠT, NGUYỄN THỊ LIÊN</i> ✉	18
- Nghiên cứu định lượng Ractopamin hydrochlorid tồn dư trong thịt gà bằng phương pháp LC-MS/MS. <i>NGUYỄN THỊ HỒNG VÂN, CHỬ VĂN MẾN, LÊ THỊ HƯỜNG HOA</i> ✉	24

CONTENTS

	<i>Page</i>
● Management – Professional exchange	
Objectives and activities of the drug quality control and monitoring for the year 2022. <i>Associate Prof. DOAN CAO SON, Ph.D., Director of NIDQC</i>	1
● Scientific researches	
- Developing an analytical procedure for determining the limit of related substances in fenofibrate impurity A by PR- HPLC. <i>NGUYEN THI HONG, VU HA KHUE, NGUYEN THI LIEN</i> ✉	2
- Development and validation of a RP-HPLC method for simultaneous determination of desloratadine and sodium benzoate in the experimental cough syrup. <i>NGUYEN VIET CHINH, LE QUANG THAO</i> ✉	8
- Validation of an in vitro cytotoxicity test in Vero 76 cells using MTT reagent. <i>LE VAN DAT, NGUYEN THI LIEN</i> ✉	18
- Development and validation of an LC – MS/MS method for assay of Ractopamine hydrochloride in the kitchen. <i>NGUYEN THI HONG VAN, CHU VAN MEN, LE THI HUONG HOA</i> ✉	24