

# **ĐỊNH LƯỢNG SUCROSE OCTASULFAT TRONG CHẾ PHẨM THUỐC UỐNG CÓ CHỨA DƯỢC CHẤT SUCRALFAT, RANITIDIN VÀ BISMUTH KALI CITRAT BẰNG PHƯƠNG PHÁP HPLC VỚI DETECTOR CHỈ SỐ KHÚC XẠ (RI)**

LÊ THỊ THIÊN HUƠNG, TRẦN THÚY HẠNH, PHẠM HỒNG MINH

*Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương*

## **1. Đặt vấn đề**

Sucralfat,  $\beta$ -D-Fructofuranosyl- $\alpha$ -D-glucopyranosid octakis (dihydroxyaluminium sulfat) với 8-10 phân tử nhôm hydroxyd và 22-31 phân tử nước, là muối nhôm của sucrose octasulfat, dùng điều trị ngăn ngừa trong loét dạ dày - tá tràng. Thuốc có tác dụng tại chỗ (ở loét) hơn là tác dụng toàn thân. Khi gặp acid dịch vị, thuốc tạo thành một phức hợp như bột hồ, bám phủ vào vùng niêm mạc bị tổn thương tạo thành một hàng rào bảo vệ, không cho pepsin, acid và dịch mật tiếp xúc ở loét, tạo điều kiện cho ổ loét có thể lành lại. Nhằm tăng hiệu quả điều trị, người ta thường sử dụng phối hợp sucralfat với ranitidin và bismuth kali citrat. Trong đó, ranitidin là một thuốc đối kháng thụ thể  $H_2$  histamin, ức chế cạnh tranh với hisamin ở các thụ thể  $H_2$  của tế bào thành dạ dày làm giảm lượng acid dạ dày tiết ra. Bismuth kali citrat có ái lực bao phủ chọn lọc lên đây ổ loét dạ dày thông qua quá trình hình thành phức hợp chelat tạo một lớp bảo vệ và còn có tác dụng diệt khuẩn *Helicobacter pylori* [2]. Chế phẩm dạng viên nén, viên nang phối hợp các dược chất nêu trên cũng đã xuất hiện trên thị trường. Để bào chế dạng phối hợp này, người ta cần tạo hạt bao ranitidin rồi mới trộn với các dược chất khác để tránh sucralfat ức chế sự hấp thụ ranitidin và bản thân bismuth kali citrat cũng ảnh hưởng đến các đặc tính của ranitidin nên tạo ra một nền mẫu phức tạp. Dạng bào chế phối hợp này hiện chưa có trong dược điển nào [1],[3],[4],[6], do đó việc kiểm nghiệm sucralfat trong các chế phẩm này cũng gặp nhiều khó khăn.

Dược điển Anh (BP) [3] và Dược điển Nhật (JP) [4] có chuyên luận riêng nguyên liệu sucralfat; Dược điển Mỹ (USP) [6] có thêm chuyên luận viên nén sucralfat. Trong các tiêu chuẩn cơ sở trước đây việc định lượng sucralfat thường thông qua việc định lượng nhôm (Al). Tuy nhiên phương pháp kiểm nghiệm này không phân biệt được sucralfat với các chế phẩm chứa Al khác. Trong BP, JP và USP, sucralfat đã được định lượng thông qua sucrose octasulfat bằng phương pháp HPLC với detector chỉ số khúc xạ (RI). Trên cơ sở các tài liệu tham khảo, chúng tôi đã tiến hành khảo sát để tối ưu hóa thành phần pha động, tiến hành xử lý mẫu phù hợp và xây dựng một quy trình định lượng sucralfat trong các

dạng bào chế phối hợp một cách đơn giản và thuận tiện nhất. Để chứng minh tính phù hợp của quy trình phân tích đã xây dựng được, chúng tôi xin giới thiệu kết quả nghiên cứu thẩm định phương pháp định lượng sucrose octasulfat trong viên nang có chứa sucralfat, ranitidin và bismuth kali citrat bằng phương pháp HPLC với detector RI đảm bảo chính xác, tin cậy, tiến hành đơn giản và nhanh chóng.

## **2. Thực nghiệm**

### **2.1. Thiết bị, dụng cụ, hoá chất và chất chuẩn**

#### **2.1.1. Thiết bị, dụng cụ**

Đã được hiệu chuẩn theo ISO/IEC 17025.

- Máy sắc ký lỏng hiệu năng cao Shimadzu SPD-M20A với detector RI (RID-10A);
- Cột Allsphere Amino (300 x 3,9 mm; 5  $\mu$ m);
- Cân phân tích Mettler Toledo AB 204 độ chính xác 0,1 mg;
- Bộ lọc dùng cho sắc ký với màng lọc 0,45  $\mu$ m;
- Các dụng cụ thủy tinh chính xác loại A: bình định mức, pipet.

#### **2.1.2. Chất chuẩn**

- *Chất chuẩn*: Kali Sucrose octasulfat của USP; Số lô: RO26LO; Hàm lượng 99,9% tính theo chế phẩm khan; Độ ẩm: 10,1%.

- *Nguyên liệu chuẩn*: Sucralfat của Northeast Pharmaceutical Group Co., Ltd (đã được kiểm tra đầy đủ và đạt yêu cầu chất lượng theo tiêu chuẩn nguyên liệu). Hàm lượng 35,2% sucrose octasulfat tính theo nguyên trạng.

#### **2.1.3. Hóa chất, thuốc thử**

##### **2.1.3.1. Hóa chất**

- Acid sulfuric loại PA của Scharlau;
- Natri hydroxyd loại PA của Merck;
- Amoni sulfat loại PA của BDH Prolabo;
- Acid phosphoric loại PA của Scharlau.

##### **2.1.3.2. Thuốc thử**

Dung dịch acid sulfuric-natri hydroxyd: Dung dịch A - dung dịch B (1 : 1)

+ Dung dịch A: Cho từ từ 12 ml acid sulfuric vào 80 ml nước, lắc liên tục. Làm nguội và thêm nước vừa đủ 100 ml.

+ Dung dịch B: Hòa tan 8,8 g natri hydroxyd trong nước vừa mới đun sôi để nguội vừa đủ 100 ml.

## 2.2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

### 2.2.1. Đối tượng nghiên cứu

- *Mẫu thử*: Viên nang có công thức bào chế như sau: Sucralfat (300 mg); Ranitidin (84 mg); Bismuth kali citrat (100 mg); Tá dược (vừa đủ 600 mg).

- *Mẫu placebo*: Trộn ranitidin (84 mg); bismuth kali citrat (100 mg) và các tá dược theo công thức bào chế (không có sucralfat).

### 2.2.2. Phương pháp nghiên cứu

#### 2.2.2.1. Điều kiện HPLC

- Cột: Allsphere Amino (300 x 3,9 mm; 5  $\mu$ m).
- Pha động: Hòa tan 76 g amoni sulfat trong 900 ml nước, pha loãng thành 1000 ml với nước và lắc đều. Điều chỉnh bằng acid phosphoric đến pH 3,5  $\pm$  0,1; lọc qua màng lọc 0,45  $\mu$ m.
- Detector chỉ số khúc xạ RI (refractive index detector).
- Tốc độ dòng : 1,0 ml/phút.
- Thể tích tiêm : 50  $\mu$ l.

#### 2.2.2.2. Phương pháp xử lý mẫu

*Dung dịch placebo*: Cân 500,0 mg mẫu placebo, tiến hành pha mẫu như đối với dung dịch thử.

*Dung dịch thử*: Cân 20 nang thuốc, tính khối lượng trung bình bột thuốc trong nang và nghiền thành bột mịn. Cân chính xác một lượng bột viên tương ứng khoảng 500 mg sucralfat vào bình định mức dung tích 25 ml, thêm chính xác 10,0 ml dung dịch acid sulfuric-natri hydroxyd (vừa thêm, vừa lắc), lắc mạnh, hòa tan bằng siêu âm cùng với lắc (giữ nhiệt độ bề siêu âm dưới 30°C) trong khoảng 5 phút. Thêm dung dịch natri hydroxyd 0,1 N, vừa thêm vừa lắc đến vừa đủ 25 ml. Lắc mạnh trong 1 phút và ly tâm 4000 vòng/phút trong 5 phút. Lấy dịch trong. Lọc qua màng lọc 0,45  $\mu$ m. (Dung dịch thử thu được phải có pH trong khoảng từ 2,5 đến 3,5).

*Dung dịch chuẩn*: Hòa tan một lượng cân chính xác chất chuẩn kali sucrose octasulfat trong pha động và pha loãng nếu cần bằng pha động để thu được dung dịch có nồng độ khoảng 10 mg/ml kali sucrose octasulfat. Lọc qua màng lọc 0,45  $\mu$ m.

#### 2.2.2.3. Cách tiến hành

*Kiểm tra khả năng thích hợp của hệ thống sắc ký:*

Tiêm 6 lần dung dịch chuẩn, số đĩa lý thuyết của pic sucrose octasulfat không được nhỏ hơn 400, hệ số đối xứng của pic sucrose octasulfat không được lớn hơn 4,0 và độ lệch chuẩn trong đối của diện tích pic sucrose octasulfat phải nhỏ hơn 2,0%.

Tiêm dung dịch chuẩn và dung dịch thử.

#### 2.2.2.4. Tính toán kết quả

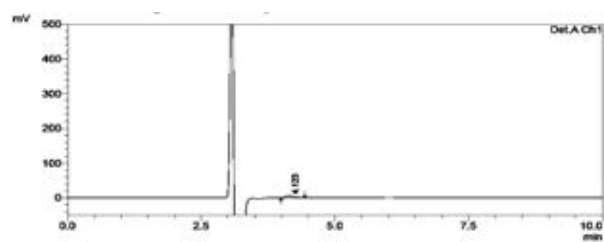
Tính toán kết quả hàm lượng sucrose octasulfat ( $C_{12}H_{14}O_{35}S_8$ ) trong chế phẩm dựa vào lượng cân chất chuẩn, hàm lượng của chất chuẩn, diện tích pic sucrose octasulfat của dung dịch chuẩn và dung dịch thử, hệ số pha loãng của dung dịch chuẩn và dung dịch thử, hệ số chuyển đổi từ kali sucrose octasulfat sang sucrose octasulfat {Ptl của Kali sucrose octasulfat hydrat ( $C_{12}H_{14}K_8O_{35}S_8 \cdot 7H_2O$ ) là 1413,64; Kali sucrose octasulfat khan ( $C_{12}H_{14}K_8O_{35}S_8$ ) là 1287,53; Sucrose octasulfat ( $C_{12}H_{14}O_{35}S_8$ ) là 974,75}.

## 3. Kết quả và bàn luận

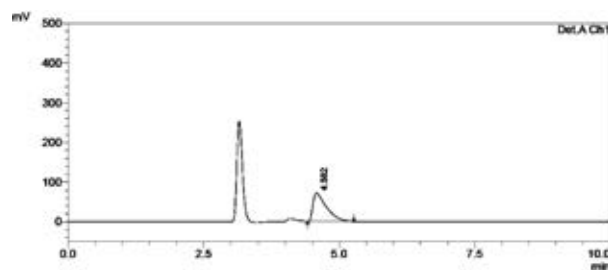
### 3.1. Chọn điều kiện sắc ký

Chúng tôi đã khảo sát (thay đổi thành phần pha động, dung môi pha mẫu, cách chuẩn bị mẫu) và lựa chọn được điều kiện sắc ký như đã nêu ở phần 2.2.2.1, sắc ký đồ thu được của dung dịch placebo, chuẩn và thử thể hiện ở Hình 1, 2 và 3.

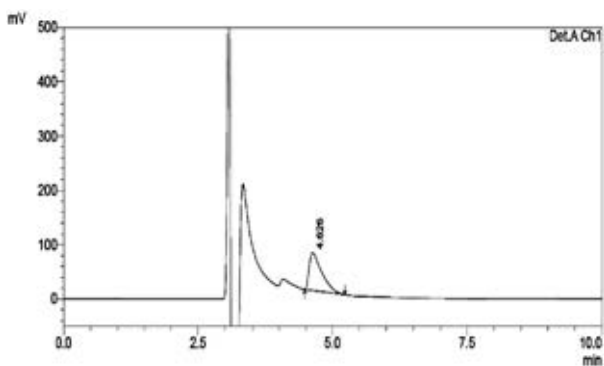
Trên sắc ký đồ chúng tôi thấy pic của sucrose octasulfat tách rõ ràng, đáp ứng yêu cầu độ thích hợp của hệ thống. Như vậy việc lựa chọn các điều kiện sắc ký là phù hợp.



Hình 1. Sắc ký đồ của mẫu placebo.



Hình 2. Sắc ký đồ định lượng sucrose octasulfat của dung dịch chuẩn.



**Hình 3.** Sắc ký đồ định lượng sucrose octasulfat của dung dịch thử.

### 3.2. Thẩm định phương pháp

#### 3.2.1. Tính đặc hiệu

Tiêm các dung dịch placebo, dung dịch chuẩn, dung dịch thử vào hệ thống sắc ký. Kết quả cho thấy:

- Thời gian lưu của pic sucrose octasulfat trên SKĐ của dung dịch chuẩn và dung dịch thử giống nhau (khoảng 4,6 phút).

- Dung dịch placebo: Không xuất hiện pic tại thời gian lưu tương ứng với pic sucrose octasulfat nên không ảnh hưởng tới kết quả định lượng sucrose octasulfat.

#### 3.2.2. Tính thích hợp của hệ thống sắc ký

- *Dung dịch chuẩn:* Cân chính xác 49,62 mg chất chuẩn kali sucrose octasulfat hòa tan trong pha động và thêm pha động vừa đủ 5 ml. Lọc qua màng lọc 0,45 μm.

Tính thích hợp của hệ thống sắc ký được xác định

bằng cách tiến hành tiêm lặp lại 6 lần dung dịch chuẩn (nồng độ sucrose octasulfat ( $C_{12}H_{14}O_{35}S_8$ ) 6,75 mg/ml). Ghi lại các giá trị về thời gian lưu, diện tích pic, số đĩa lý thuyết và hệ số đối xứng của pic. Kết quả khảo sát tính thích hợp của hệ thống sắc ký thể hiện ở **Bảng 1**.

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

STT	Thời gian lưu của sucrose octasulfat (min.)	Diện tích pic sucrose octasulfat (mAU.s)	Hệ số đối xứng (Tailing factor)	Số đĩa lý thuyết
1	4,583	1022179	1,66	2662
2	4,582	1024570	1,67	2671
3	4,595	1022571	1,67	2665
4	4,591	1018489	1,67	2664
5	4,581	1015225	1,67	2670
6	4,586	1013783	1,65	2670
<b>T.bình</b>	<b>4,586</b>	<b>1019469,5</b>	<b>1,67</b>	<b>2667</b>
<b>RSD (%)</b>	<b>0,12% &lt; 1,0%</b>	<b>0,43% &lt; 2,0%</b>	<b>&lt; 4,0</b>	<b>&gt; 400</b>

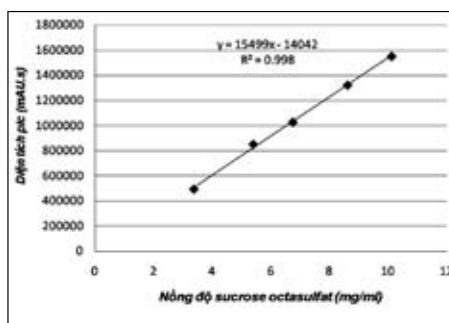
*Nhận xét:* Các số liệu thu được cho thấy hệ thống sắc ký trên phù hợp cho việc phân tích định tính và định lượng sucrose octasulfat.

#### 3.2.3. Độ tuyến tính

- *Chuẩn bị các dung dịch chuẩn:* Cân chính xác 239,6 mg; 383,4 mg; 479,2 mg; 592,2 mg và 718,8 mg nguyên liệu chuẩn (tương ứng 50%, 80%, 100%, 120% và 150% của nồng độ định lượng) vào các bình định mức riêng biệt dung tích 25 ml, tiến hành xử lý mẫu thử như mục 2.2.2.2. Kết quả được ghi lại trong **Bảng 2**.

**Bảng 2.** Kết quả khảo sát khoảng tuyến tính.

STT	Nồng độ sucrose octasulfat ( $C_{12}H_{14}O_{35}S_8$ ) (mg/ml)	Diện tích pic (mAU.s)
1	3,37	492774
2	5,40	849710
3	6,75	1026101
4	8,62	1320936
5	10,12	1550223
<b>Phương trình hồi qui: <math>y = 15499x - 14042</math> <math>r = 0,9992</math></b>		



*Nhận xét:* Với điều kiện sắc ký đã lựa chọn, trong khoảng nồng độ đã khảo sát, sucrose octasulfat có sự tương quan tuyến tính chặt chẽ giữa nồng độ với diện tích pic đáp ứng.

#### 3.2.4. Độ đúng

- *Chuẩn bị các mẫu thử:* Cân chính xác một lượng nguyên liệu chuẩn sucralfat khoảng 400 mg; 500 mg và 600 mg sucralfat - tương ứng với mẫu tự tạo chứa 80, 100 hoặc 120% lượng sucrose octasulfat so với hàm lượng ghi trên nhãn vào các bình định mức 25 ml đã có chứa sẵn khoảng 500 mg placebo, tiến hành xử lý mẫu thử như mục 2.2.2.2. Mỗi mức nồng độ làm 03 mẫu.

- *Dung dịch chuẩn:* Dung dịch chuẩn được chuẩn bị như ở mục 3.2.2. Kết quả thể hiện ở **Bảng 3**.

**Bảng 3. Kết quả khảo sát độ đúng**

Stt	Lượng thêm vào so với nhãn	Khối lượng mẫu placebo (mg)	Lượng sucrose octasulfat ( $C_{12}H_{14}O_{35}S_8$ ) thêm vào mẫu (mg)	Diện tích pic sucrose octasulfat (mAU.s)	Lượng sucrose octasulfat ( $C_{12}H_{14}O_{35}S_8$ ) tìm lại (mg)	% Thu hồi	% Thu hồi trung bình
1.	80%	500,3	139,88	836630	138,44	98,97	<b>98,99%</b>
2.	80%	501,2	136,82	822237	136,05	99,44	
3.	80%	501,8	140,76	838528	138,75	98,57	
4.	100%	499,8	164,88	991590	164,08	99,51	<b>98,99%</b>
5.	100%	500,2	169,95	1016535	168,20	98,97	
6.	100%	500,1	167,73	998297	165,19	98,49	
7.	120%	501,1	216,69	1303053	215,61	99,50	<b>98,95%</b>
8.	120%	499,1	205,18	1222892	202,35	98,62	
9.	120%	500,3	205,71	1227469	203,11	98,74	
<b>% Thu hồi trung bình = 98,98%; n = 9; RSD = 0,42%</b>							

*Nhận xét:* Kết quả trên cho thấy phương pháp có độ đúng tốt (lượng thu hồi: 98,49% - 99,51%)

### 3.2.5. Độ chính xác

#### 3.2.5.1. Độ lặp lại

Khảo sát trên viên nang với các điều kiện sắc ký và cách xử lý mẫu như ở mục 2.2.2.2, lặp lại thí nghiệm 6 lần, kết quả được trình bày trong *Bảng 4*.

*Nhận xét:* Kết quả ở *Bảng 4* cho thấy phương pháp có độ lặp lại tốt, có thể áp dụng để định lượng các mẫu thành phẩm.

#### 3.2.5.2. Độ chính xác trung gian

Kiểm nghiệm viên 1: Lấy kết quả ở mục 3.2.5.1 Độ lặp lại. Kiểm nghiệm viên 2 tiến hành thực nghiệm Độ lặp lại với các điều kiện như Kiểm nghiệm viên 1, nhưng khác ngày, kết quả được trình bày trong *Bảng 4*.

**Bảng 4. Kết quả khảo sát độ lặp lại và độ chính xác trung gian**

STT	Kiểm nghiệm viên 1 (Độ lặp lại)			Kiểm nghiệm viên 2		
	Lượng cân chuẩn: 49,62 mg DT pic trung bình của DD chuẩn = 1019469,5 KLTB của thuốc trong nang = 0,6112 g			Lượng cân chuẩn: 49,23 mg DT pic trung bình của DD chuẩn = 1014552 KLTB của thuốc trong nang = 0,6114 g		
	Lượng cân mẫu thử (g)	Diện tích pic	% Hàm lượng	Lượng cân mẫu thử (g)	Diện tích pic	% Hàm lượng
1	0,9494	891718	94,99	0,9048	844639	94,15
2	0,9604	898675	94,63	0,9044	846448	94,39
3	0,9531	888592	94,29	0,9113	845087	93,53
4	0,9188	860219	94,68	0,9031	846353	94,52
5	0,9088	848492	94,42	0,9022	840434	93,95
6	0,9085	848909	94,50	0,9026	845509	94,48
<b>HL TB = 94,59%; n = 6; RSD = 0,26%</b>			<b>HL TB = 94,17%; n = 6; RSD = 0,40%</b>			
<b>HL trung bình = 94,38%; n = 12; RSD = 0,40% &lt; 2,0% ; Độ chính xác trung gian đạt yêu cầu</b>						

## 4. Kết luận

Phương pháp sắc ký lỏng pha đảo detector RI, sử dụng cột Allsphere Amino (300 x 3,9 mm; 5  $\mu$ m) đã được thiết

lập để định lượng sucrose octasulfat trong chế phẩm viên nang chứa sucralfat phối hợp với ranitidin và bismuth kali citrat. Pha động được chuẩn bị bằng cách hòa tan 76 g amoni sulfat trong 900 ml nước, pha loãng thành 1000 ml với nước và lắc đều, điều chỉnh bằng acid phosphoric đến pH  $3,5 \pm 0,1$ ; tốc độ dòng 1,0 ml/phút, thể tích tiêm 50  $\mu$ l; detector RI. Phương pháp được thẩm định về tính đặc hiệu, độ thích hợp của hệ thống, độ tuyến tính, độ đúng, độ lặp lại và độ chính xác trung gian. Kết quả thẩm định cho thấy phương pháp được xây dựng hoàn toàn phù hợp cho việc định lượng sucrose octasulfat trong viên nang chứa sucralfat phối hợp với ranitidin và bismuth kali citrat và có thể áp dụng định lượng hoạt chất này trong các chế phẩm thuốc uống có thành phần tương tự.

### Tài liệu tham khảo

1. Bộ Y tế (2009), *Dược điển Việt Nam*, Lần xuất bản thứ tư, NXB Y học, Hà Nội
2. Bộ Y tế (2015), *Dược thư Quốc gia Việt Nam*, Lần xuất bản thứ hai, NXB Khoa học và Kỹ thuật, Hà Nội.
3. *Dược điển Anh* (BP), 2014.
4. *Dược điển Nhật Bản* 16 (JP. 16), 2011.
5. *Dược điển Mỹ* 38 (USP. 38), 2016.
6. Sandie Lindsay (1994), *High Performance Liquid Chromatography*, 2nd edition.

### SUMMARY

*A reversed-phase liquid chromatography method was developed assay for sucrose octasulfate in oral dosage form containing sucralfate; ranitidine and bismuth potassium citrate. The method was carried by using Allsphere Amino (300 x 3.9 mm; 5  $\mu$ m) column and dissolve 76 g of ammonium sulfate in 900 ml of water, dilute with water to 1000 ml, mix and adjust with phosphoric acid to a pH of  $3.5 \pm 0.1$  as mobile phase. The flow rate of mobile phase is maintained at 1.0 ml per minute, injection volume: 50  $\mu$ l, analyte was detected by a RI detector. The method was validated in specificity, linear range; accuracy, precision. Validation results proved that the developed method was suitable for sucrose octasulfate assay in oral dosage form containing sucralfate; ranitidine and bismuth potassium citrate.*

## XÂY DỰNG PHƯƠNG PHÁP XÁC ĐỊNH AFLATOXIN B1 TRONG DƯỢC LIỆU BẰNG LC-MS/MS

TRẦN CAO SON, LÊ THỊ HỒNG HẢO

*Viện Kiểm nghiệm an toàn vệ sinh thực phẩm Quốc gia*

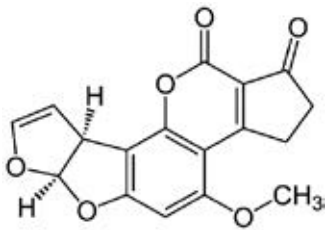
LÊ ĐÌNH CHI

*Trường Đại học Dược Hà Nội*

### 1. Đặt vấn đề

Aflatoxin là một nhóm độc tố do một số loại nấm mốc, chủ yếu thuộc chi *Aspergillus* tạo ra và đã được ghi nhận gây ra nhiều bệnh và tổn thương cơ quan ở người cũng như nhiều loài động vật khi người, động vật ăn phải thực phẩm, nông sản, thức ăn chăn nuôi nhiễm nấm mốc. Trong nhóm này, aflatoxin B1 (Công thức cấu tạo ở Hình 1) là chất có độc tính lớn nhất. Aflatoxin B1 (AFB1) là tác nhân gây ung thư nguồn gốc tự nhiên, cơ quan nghiên cứu ung thư quốc tế IARC phân loại AFB1 là tác nhân gây ung thư nhóm 1 (năm 1993) [6],[7]. Nhiễm độc AFB1 có thể biểu hiện độc tính cấp hoặc độc tính mạn như ung thư, đột biến gen, gây quái thai và ức chế miễn dịch [3]. Aflatoxin dễ hình thành trong điều kiện giàu tinh bột và các loại hạt có dầu nên nhiều

loại dược liệu như Cát căn, Hoài sơn (giàu tinh bột), Đào nhân, Hạnh nhân (có dầu) cũng có thể bị nhiễm nhóm độc tố này. Hiện tại, Dược điển Anh quy định giới hạn AFB1 cho một số loại dược liệu là 2  $\mu$ g/kg [4]. Tại Việt Nam, cho tới nay đã có một nghiên cứu khảo sát mức độ nhiễm aflatoxin trong một số dược liệu tại Thành phố Hồ Chí Minh, cho thấy có tới 39% số mẫu phát hiện nhiễm AFB1, một con số đáng lo ngại [2]. Như vậy, có thể thấy nguy cơ nhiễm aflatoxin, trong đó có AFB1, trong dược liệu trên thị trường là có thực và chưa được kiểm soát. Nghiên cứu này được tiến hành nhằm thiết lập một phương pháp phân tích AFB1 trong dược liệu bằng LC-MS/MS và bước đầu áp dụng xác định độc tố này trong một số mẫu dược liệu lưu hành trên địa bàn Hà Nội.



Hình 1. Công thức cấu tạo của AFB1

## 2. Thực nghiệm

### 2.1. Thiết bị, dụng cụ, dung môi, hóa chất và chất chuẩn

#### 2.1.1. Dung môi, hóa chất và chất chuẩn

- **Chất chuẩn:** Aflatoxin B1 SKS 011347 (hàm lượng 98,0% nguyên trạng) (Sigma – Adrich, Mỹ).

- **Dung môi, hóa chất:** methanol, acetonitril loại dùng cho HPLC; methanol, cloroform, dicloromethan, aceton, n-hexan, amoni acetat loại tinh khiết phân tích (Merck, Đức); dung dịch đệm muối phosphat (Phosphate buffered saline - PBS) (Sigma-Aldrich, Mỹ); nước cất 2 lần được lọc qua thiết bị lọc siêu sạch.

Các dung dịch, trừ khi nói rõ dung môi, đều được chuẩn bị trong nước cất 2 lần được lọc qua thiết bị lọc siêu sạch, sau khi chuẩn bị được lọc lại qua màng lọc 0,45 µm trước khi sử dụng với hệ thống sắc ký.

#### 2.1.2. Thiết bị, dụng cụ phân tích

- Hệ thống sắc ký lỏng kết nối hai lần khối phổ LC/MS-MS Agilent 1290/6064 (Agilent, Mỹ).

- Cột sắc ký C<sub>18</sub> Acquity UPLC BEH - Waters, Mỹ (100 mm x 2,1 mm; 1,7 µm).

- Cột chiết pha rắn Aflatest chứa kháng thể đơn dòng, khoảng phát hiện AFB1 từ 0,03 – 100 ppb (VICAM, Mỹ).

- Bộ dụng cụ chiết pha rắn Visiprep TM 24 (Supelco, Mỹ).

- Các thiết bị phân tích phụ trợ khác: cân phân tích, máy đo pH, thiết bị lọc nước siêu sạch...

- Dụng cụ thủy tinh chính xác loại A (binh định mức, pipet...), màng lọc 0,45 µm.

Tất cả thiết bị phân tích được hiệu chuẩn, quản lý theo tiêu chuẩn ISO/IEC 17025 và GLP.

### 2.2. Đối tượng, nội dung và phương pháp nghiên cứu

#### 2.2.1. Đối tượng nghiên cứu

Mẫu dược liệu thu mua tại phố Lãn Ông, chợ Ninh Hiệp, chợ Đồng Tâm (Hà Nội), gồm các loại: Câu kỷ tử, Liên nhục, Hoài sơn, Thổ phục linh, Đào nhân, Hạnh nhân.

#### 2.2.2. Nội dung nghiên cứu

- Xây dựng phương pháp phân tích AFB1 trong dược liệu gồm quy trình chiết AFB1 từ mẫu dược liệu và quy trình phân tích AFB1 bằng LC-MS/MS.

- Ứng dụng phương pháp xây dựng được vào kiểm tra một số mẫu dược liệu thu mua trên thị trường.

#### 2.2.3. Phương pháp nghiên cứu

- Phương pháp phân tích AFB1 được xây dựng thực nghiệm theo nguyên tắc tối ưu hóa đơn biến để xác định các điều kiện phù hợp cho việc chiết AFB1 từ nền mẫu dược liệu và phân tích trên hệ thống LC/MS-MS. Phương pháp phân tích sau khi xây dựng được thẩm định theo yêu cầu của EC [5].

- Kết quả thực nghiệm khi xây dựng, thẩm định phương pháp và phân tích mẫu thực được xử lý thống kê có sử dụng phần mềm Microsoft Excel.

## 3. Kết quả và bàn luận

### 3.1. Xây dựng quy trình chiết AFB1 từ dược liệu

Để thu được quy trình xử lý mẫu cho phép chiết được hết AFB1 từ mẫu dược liệu, dung môi chiết và các điều kiện khác của quá trình chiết bao gồm thể tích dung môi sử dụng, thời gian chiết, điều kiện làm sạch trên cột chiết pha rắn đã được khảo sát. Về dung môi chiết, quá trình khảo sát sơ bộ được thực hiện với hỗn hợp methanol – nước ở các tỷ lệ khác nhau và cloroform. Kết quả thực nghiệm cho thấy hỗn hợp methanol – nước (6:4) cho phép chiết AFB1 với hiệu suất tốt nhất ( $\geq 90\%$ , xem thêm phần thẩm định quy trình), do đó, hỗn hợp methanol – nước (6 : 4) được dùng làm dung môi chiết AFB1 từ nền mẫu. Sau đó, các thông số: thể tích hỗn hợp methanol – nước đem chiết, loại cột SPE sử dụng đều được khảo sát để chọn ra điều kiện thích hợp. Từ kết quả thực nghiệm, quy trình chiết AFB1 từ nền dược liệu được thiết lập gồm các bước như sau:

- Đồng nhất, phân tán mịn mẫu dược liệu bằng các biện pháp cơ học (nghiền, xay).

- Cân chính xác khoảng 5,0 g mẫu đã đồng nhất, làm mịn, chuyển vào bình nón nút mài 50 ml, thêm vào 1 g natri clorid và 20 ml hỗn hợp methanol – nước (6 : 4), trộn đều.

- Lắc trên máy lắc ngang trong 30 phút, với tần số lắc 140 lần/phút.

- Lọc qua giấy lọc, lấy 10,0 ml dịch lọc vào bình định mức 50 ml, thêm nước cất vừa đủ.

- Hút chính xác 10,0 ml dung dịch sau pha loãng cho chạy qua cột chiết Alfatest đã được hoạt hóa trước bằng 10 ml PBS.

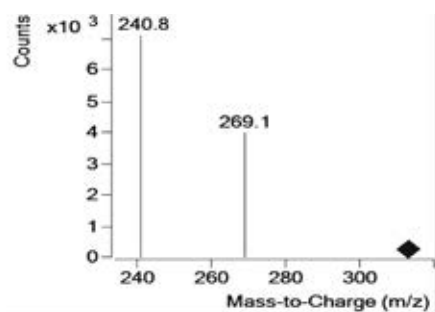
- Rửa tạp bằng cách cho 10,0 ml nước cất chạy qua cột Alfatest.

- Rửa giải AFB1 bằng 1,0 ml methanol, lấy dịch rửa giải tiêm vào hệ thống sắc ký.

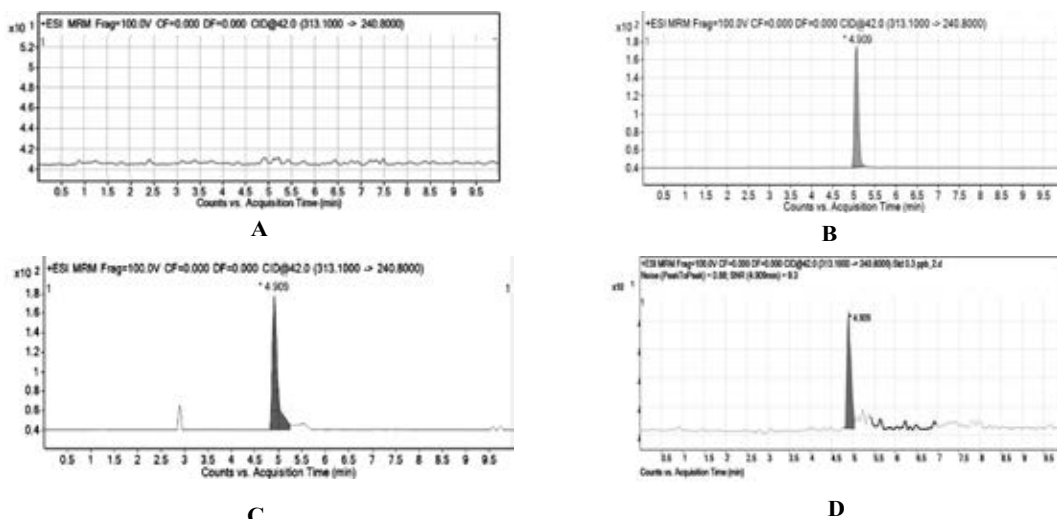
### 3.2. Xây dựng quy trình phân tích AFB1 bằng LC/MS-MS

Để phân tích AFB1 trong mẫu chế phẩm, các điều kiện của hệ thống sắc ký, điều kiện phân tích MS-MS và các thông tin sử dụng để định danh, định lượng AFB1 đã được khảo sát, lựa chọn. Hệ thống sắc ký gồm cột C<sub>18</sub> Acquity UPLC BEH (100 mm x 2,1 mm; 1,7 μm) trong điều kiện nhiệt độ phòng thí nghiệm. Pha động là hỗn hợp methanol và dung dịch amoni acetat 10 mM (thành phần theo chương trình gradient dung môi ở Bảng 1), tốc độ dòng duy trì ở 0,5 ml/phút. Detector khối phổ hai lần với nguồn ion hóa bằng phun điện tử (ESI(+)-MS/MS) sử dụng thế của nguồn ion hóa (ESI) là 5500 V. Thể tích tiêm mẫu là 5 ml. Để xây dựng đường chuẩn phân tích, sử dụng các dung dịch chuẩn AFB1 pha trong hỗn hợp methanol-nước (6 : 4) có nồng độ trong khoảng từ 0,3 đến 100 ng/ml (ppb).

Kết quả phân tích thực nghiệm trên hệ thống LC/MS-MS cho thấy khi phân tích ở các điều kiện đã chọn, AFB1 cho mảnh mẹ có m/z = 313,07 và hai mảnh con có m/z lần lượt là 240,8 và 269,1 (Hình 2).



**Hình 2.** Kết quả phổ khối các ion con thu được khi bắn phá ion mẹ (m/z = 313,07) của AFB1.



**Hình 3.** Khảo sát độ đặc hiệu của quy trình (A: nền mẫu trắng (được kiểm nghiệm không chứa AFB1), B: nền mẫu trắng thêm AFB1 chuẩn, C: được liệu có chứa AFB1, D: sắc ký đồ aflatoxin ở LOQ)

Sử dụng cả ba mảnh này để định danh AFB1 cho phép đạt số điểm định danh (Identification point – IP) là 4, phù hợp với quy định của EC về định danh bằng khối phổ hai lần [5]. Mảnh ion con m/z = 240,8 có cường độ mạnh nhất được sử dụng để định lượng AFB1.

**Bảng 1.** Chương trình gradient dung môi

Thời gian (phút)	Tỷ lệ pha động (%)	
	Dung dịch amoni acetat 10 mM	Methanol
0,0	80	20
0,5	80	20
5,5	10	90
7,0	10	90
7,5	80	20
10,0	80	20

### 3.3. Thẩm định phương pháp phân tích AFB1 trong dược liệu

#### 3.3.1. Độ đặc hiệu

Độ đặc hiệu của quy trình được đảm bảo nhờ tính đặc hiệu của detector MS-MS. AFB1 được định danh nhờ kết hợp giữa mảnh ion mẹ m/z = 313,07 và hai ion con có m/z = 240,8 và m/z = 269,1 tạo thành khi bắn phá ion mẹ. Sự xuất hiện của các mảnh này cho phép xác định sự có mặt của AFB1 với số điểm định danh (IP) là 4, phù hợp với quy định của EC [5]. Khi phân tích các mẫu trắng (mẫu dược liệu không có AFB1), mẫu trắng thêm chuẩn và mẫu dược liệu có nhiễm AFB1, kết quả thực nghiệm trên sắc ký đồ cho thấy trên mẫu trắng thêm chuẩn và mẫu chế phẩm nhiễm AFB1, pic của AFB1 được tách riêng khỏi các thành phần khác trong mẫu, trong khi trên mẫu trắng không xuất hiện pic tại thời điểm thời gian lưu của AFB1 (Hình 3).

### 3.3.2. Độ thích hợp của hệ thống sắc ký

Độ thích hợp của hệ thống sắc ký được đánh giá qua độ lặp lại về thời gian lưu và diện tích pic AFB1 khi tiêm 6 lần dung dịch chuẩn AFB1 10 ng/ml. Kết quả thực nghiệm cho thấy hệ thống sắc ký có điều kiện đã chọn thích hợp cho việc phân tích định lượng AFB1, qua độ dao động thấp về thời gian lưu (RSD = 0,1%) và diện tích pic (RSD = 0,8%) với AFB1.

### 3.3.3. Độ tuyến tính

Độ tuyến tính được đánh giá trong khoảng nồng độ AFB1 từ 0,3 ng/ml đến 100,0 ng/ml. Đáp ứng diện tích pic của AFB1 ở các nồng độ khác nhau được trình bày tại Bảng 2.

**Bảng 2. Quan hệ tuyến tính giữa diện tích pic và nồng độ AFB1**

Nồng độ AFB1 (ng/ml)	0,3	0,5	1,0	2,0	10,0	20,0	50,0	100,0
Diện tích pic AFB1 (cps.s)	57	84	156	330	1487	3760	8702	17076
Phương trình hồi quy	$y = 175,58 x - 19,746 (R^2 = 0,9978)$							

Như vậy, trong khoảng nồng độ đã khảo sát có sự tương quan tuyến tính chặt chẽ giữa diện tích pic và nồng độ AFB1.

### 3.3.4. Độ lặp lại, độ đúng

Độ lặp lại của quy trình được đánh giá thông qua kết quả phân tích độc lập 6 lần trên mẫu Câu kỹ tử xác định sơ bộ có phát hiện thấy AFB1. Độ đúng được đánh giá qua việc xác định độ thu hồi khi thêm chuẩn AFB1 vào nền mẫu được liệu không chứa AFB1 ở ba mức khối lượng khác nhau. Kết quả đánh giá độ lặp lại và độ đúng (Bảng 3) cho thấy khi phân tích AFB1 quy trình cho độ lặp lại tốt (RSD = 11,1% trên mẫu có hàm lượng AFB1 thấp, khoảng 3,7 µg/kg, trong khi quy định EC cho phép CV = 20% với hàm lượng từ > 10 µg/kg đến 100 µg/kg [5]) và độ đúng phù hợp (tỷ lệ thu hồi cho cả ba mức thêm chuẩn dao động từ 79,8 – 107,5%, nằm trong khoảng dao động của độ đúng cho phép theo quy định EC từ 70 – 110% cho mức nồng độ, hàm lượng từ trên 1 ppb tới 10 ppb, và 80 – 110% cho mức từ trên 10 ppb [5]).

**Bảng 3. Kết quả đánh giá độ lặp lại**

Chỉ tiêu	Kết quả thẩm định
<b>Độ lặp lại (n = 6)</b>	- Hàm lượng AFB1 (Trung bình ± SD): 3,73 µg/kg ± 0,42 µg/kg - RSD: 11,1%
<b>Độ đúng (3 mức, mỗi mức phân tích 3 lần)</b>	- Tỷ lệ thu hồi chung trên cả 3 mức sau 9 lần phân tích: 79,8 – 107,5% - Kết quả tìm lại cụ thể ở mỗi mức: + Mức 1 (thêm 4,0 ng AFB1, nồng độ tiêm sắc ký 2,0 ng/ml): 3,56 - 4,30 ng (89,0 – 107,5%) + Mức 2 (thêm 8,0 ng AFB1, nồng độ tiêm sắc ký 4,0 ng/ml): 6,38 - 8,24 ng (79,8 – 103,0%) + Mức 3 (thêm 16,0 ng AFB1, nồng độ tiêm sắc ký 8,0 ng/ml): 13,30 - 17,14 ng (83,1 – 107,1%)
<b>LOD</b>	- Theo hàm lượng AFB1 trong mẫu: 0,2 µg/kg - Theo nồng độ tiêm sắc ký: 0,1 ng/ml
<b>LOQ</b>	- Theo hàm lượng AFB1 trong mẫu: 0,6 µg/kg - Theo nồng độ tiêm sắc ký: 0,3 ng/ml

### 3.3.5. Giới hạn định lượng, giới hạn phát hiện

Giới hạn phát hiện (LOD) và giới hạn định lượng (LOQ) của quy trình được xác định bằng cách pha loãng dần dung dịch chuẩn AFB1, so sánh đáp ứng pic AFB1 với dao động của đường nền. Ở mức nồng độ AFB1 0,1 ng/ml, đáp ứng pic của AFB1 gấp 3 lần dao động nền (Hình 3). Như vậy, LOD của quy trình là 0,1 ng/ml, tính theo nồng độ AFB1 tiêm vào hệ thống sắc ký, tương ứng hàm lượng 0,2 mg/kg trong dược liệu. Ở mức nồng độ AFB1 0,3 ng/ml, đáp ứng của AFB1 cao hơn 10 lần so với nhiễu nền, nên LOQ với AFB1 của phương pháp là 0,3 ng/ml, tương ứng với hàm lượng 0,6 mg/kg trong dược liệu. Nếu so với một số quy định aflatoxin hiện hành trong dược liệu [1],[4], phương pháp đã xây dựng đáp ứng được yêu cầu về độ nhạy.



### 3.4. Ứng dụng phân tích AFB1 trong một số mẫu dược liệu

Trong khuôn khổ nghiên cứu này, đã có 25 mẫu dược liệu được phân tích AFB1 bằng phương pháp LC/MS-MS được xây dựng. Trong đó có 3 mẫu phát hiện nhiễm AFB1 ở trên LOQ của phương pháp, gồm một mẫu Câu kỷ tử (3,73 µg/kg), một mẫu Liên nhục (1,42 µg/kg) và một mẫu Hoài sơn (1,04 µg/kg) (Bảng 4). Đáng chú ý là mẫu Câu kỷ tử có hàm lượng AFB1 cao hơn mức 2,0 µg/kg được quy định trong Dược điển Anh [4].

**Bảng 4.** Kết quả phân tích AFB1 trên mẫu dược liệu

<i>TT</i>	<i>Tên dược liệu</i>	<i>Địa điểm lấy mẫu</i>	<i>Hàm lượng (µg/kg)</i>
1	Câu kỷ tử	Chợ Ninh Hiệp	<b>3,73</b>
2		Phố Lãn Ông	-
3	Liên nhục	Chợ Ninh Hiệp	<b>1,42</b>
4		Chợ Đồng Tâm	-
5	Hoài sơn	Chợ Ninh Hiệp	<b>1,04</b>
6		Chợ Ninh Hiệp	-
7	Thổ phục linh	Chợ Ninh Hiệp	-
8		Phố Lãn Ông	-
9	Đào nhân	Chợ Ninh Hiệp	-
10		Phố Lãn Ông	-
11	Hạnh nhân	Chợ Ninh Hiệp	-
12		Chợ Đồng Tâm	-
13	Ý dĩ	Chợ Ninh Hiệp	-
14		Phố Lãn Ông	-
15	Cam thảo	Chợ Ninh Hiệp	-
16		Chợ Đồng Tâm	-
17	Trần bì	Chợ Ninh Hiệp	-
18		Chợ Đồng Tâm	-
19	Cát căn	Phố Lãn Ông	-
20		Chợ Ninh Hiệp	-
21	Diệp hạ châu	Chợ Ninh Hiệp	-
22		Phố Lãn Ông	-
23	Thảo quả	Chợ Ninh Hiệp	-
24	Táo đen	Phố Lãn Ông	-
25	Cúc hoa	Phố Lãn Ông	-

### 3.5. Bàn luận

Những kết quả thực nghiệm khi thẩm định phương pháp đã được so sánh với quy định về năng lực phương pháp phân tích của EC [5]. Về độ đặc hiệu, quy trình đã đáp ứng được yêu cầu tối thiểu về điểm định danh (với IP = 4). Về độ lặp lại và độ đúng, như đã trình bày ở trên, phương pháp đã xây dựng cũng đáp ứng được yêu cầu của EC [5]. Như vậy, quy trình đã xây dựng cho kết quả đủ tin cậy khi áp dụng phân tích AFB1 trong dược liệu. Kết quả phân tích trên mẫu dược liệu cho thấy, dù số mẫu kiểm tra chưa nhiều (25 mẫu), đã có 3 mẫu phát hiện được AFB1, và 1 mẫu có hàm lượng AFB1 cao hơn mức 2 µg/kg. Những kết quả sơ bộ này chứng tỏ nguy cơ nhiễm aflatoxin trong dược liệu lưu hành tại Hà Nội nói riêng và Việt Nam nói chung là có thực và cần có biện pháp kiểm soát phù hợp hơn để tăng cường độ an toàn cho dược liệu.

#### 4. Kết luận

Trong nghiên cứu này, kỹ thuật LC/MS-MS, một kỹ thuật phân tích có độ nhạy, độ đặc hiệu cao, thích hợp cho phân tích vi lượng đã được áp dụng để thiết lập một quy trình phân tích AFB1 trong dược liệu. Quy trình phân tích đã được thẩm định về độ đặc hiệu, độ thích hợp của hệ thống, độ đúng, độ chính xác, xác định khoảng tuyến tính, LOD, LOQ. Kết quả thẩm định cho thấy quy trình phù hợp để phân tích AFB1 trong dược liệu với độ đặc hiệu khi định tính đạt số điểm định danh theo quy định của EC và độ đúng, độ lặp lại khi định lượng thỏa mãn yêu cầu EC quy định [5]. Quy trình đã bước đầu được ứng dụng phân tích trên 25 mẫu dược liệu và xác định được 3 mẫu có dư lượng AFB1, trong đó có 1 mẫu ở mức trên 2 µg/kg.

#### Tài liệu tham khảo

1. Bộ Y tế (2011), *Thông tư Ban hành các Quy chuẩn kỹ thuật quốc gia đối với giới hạn ô nhiễm hóa học trong thực phẩm*, số 02/2011/TT-BYT.
2. Nguyễn Đình Nga, Nguyễn Thị Kiều Khanh, Văn Phó (2012), “Khảo sát mức độ nhiễm nấm và aflatoxin B1 (AFB1) trên một số mẫu dược liệu được bán ở quận 5 – thành phố Hồ Chí Minh”, *Y Học TP Hồ Chí Minh*, 16 (1), 93–96.
3. Bbosa GS, A. Lubega, David B. Kyegombe, et al. (2013), “Chapter 12: Review of the biological and health effects of aflatoxins on body organs and body systems”, *Aflatoxins - Recent Advances and Future Prospects*, INTECH Open Access Publisher, 239-265.
4. British Pharmacopoeia 2013, *Appendix XI S.Determination of Mycotoxins in Herbal Drugs* (electronic version).
5. Commission of the European Communities (2002), Commission decision of 12 August 2002 implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results (2002/657/EC), *Official Journal of European Communities*, L221/8 - L221/35.
6. Dhanasekaran D, Panneerselvam A, Thajuddin N, Shanmugapriya S (2011), “Chapter 12: Aflatoxins and aflatoxicosis in human and animals”, *Aflatoxins – Biochemistry and Molecular Biology*, INTECH Open Access Publisher, 221–244.
7. World Health Organization, International Agency for Research on Cancer (2002), “Some traditional herbal medicines, some mycotoxins, naphthalene and styrene”, *IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risk to human*, volume 82, 171-300.

#### SUMMARY

*A selective LC-MS/MS method has been developed to determine Aflatoxin B1 (AFB1), a Mycotoxin, in herbal medicines. In this method, AFB1 was extracted from sample with Methanol - Water mixture (6 : 4), the Methanol - Water extract was then gone through the SPE column for pre-treatment before analysing by LC-MS/MS. The chromatographic procedure using Acquity UPLC BEH C18 column with a gradient elution using Methanol – 10 mM Ammonium acetate mixture as mobile phase. The ESI(+)-MS/MS detection using the primary ion ( $m/z = 313.07$ ) and 2 secondary ions ( $m/z = 240.8$  and  $269.1$ ) to identify AFB1 and the secondary ion ( $m/z = 240.8$ ) for quantitative determination of AFB1. The limit of quantification (LOQ) and limit of detection (LOD) for AFB1 of the established method were 0.6 mg/kg and 0.2 mg/kg, respectively. The method was also validated in terms of specificity, linearity, accuracy and precision, and has been proved to be reliable enough for identification and quantitative determination of AFB1 in herbal medicines.*

## NGHIÊN CỨU ĐỊNH LƯỢNG INDAPAMID TRONG HUYẾT TƯƠNG NGƯỜI BẰNG LC-MS/MS PHỤC VỤ ĐÁNH GIÁ TƯƠNG ĐƯƠNG SINH HỌC

LÊ THỊ LA, TẠ MẠNH HÙNG, ĐOÀN CAO SƠN  
Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương

### 1. Đặt vấn đề

Indapamid ( $C_{16}H_{16}ClN_3O_3S$ ; KLPT: 365,06 g/mol) là một sulfonamid lợi tiểu, có nhân indol, không thuộc nhóm thiazid, có tác dụng lợi tiểu và chống tăng huyết áp. Ở mức liều khuyến cáo sử dụng 1,5 mg/ngày; nồng độ Indapamid tối đa trong huyết tương rất nhỏ, chỉ đạt khoảng vài ng/ml [1]. Do vậy, khó có thể xác định nồng

độ Indapamid trong các mẫu huyết tương người bằng các phương pháp HPLC với các detector thông thường như UV, DAD [3],[4],... Dựa trên nguyên lý của phương pháp sắc ký lỏng - khối phổ và độ nhạy của thiết bị, chúng tôi đặt vấn đề: “Nghiên cứu định lượng Indapamid trong huyết tương người bằng LC-MS/MS phục vụ đánh giá tương đương sinh học”.

## 2. Thực nghiệm

### 2.1. Nguyên vật liệu

- *Chất chuẩn*: Các chất chuẩn của Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương bao gồm:

+ Chuẩn làm việc Indapamid, SKS: WS. 0108244, hàm lượng: 99,87%, độ ẩm: 2,33%.

+ Chuẩn ĐCVN Cloramphenicol, SKS: 0203004, hàm lượng: 99,75%, độ ẩm: 0,04%. Cloramphenicol được dùng làm chuẩn nội (IS) trong phương pháp phân tích.

- *Dung môi, hóa chất*: methanol, amoni acetat, tert-butyl methyl ether, amoniac đạt tiêu chuẩn tinh khiết dùng cho phân tích hoặc sắc ký.

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

### 2.2. Thiết bị và dụng cụ phân tích

- *Thiết bị*: Máy sắc ký lỏng khối phổ TSQ Quantum Vantage (Thermo – Mỹ); cân phân tích Sartorius CP224S (Thụy Sĩ, độ chính xác  $d = 0,1$  mg); tủ lạnh sâu  $-35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$  (Sanyo – Nhật Bản); máy ly tâm lạnh (Sigma 4-16K – Đức); máy lọc nước... Các thiết bị được quản lý và hiệu chuẩn theo các quy định của ISO/IEC -17025 và GLP.

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

### 2.3. Điều kiện phân tích

#### 2.3.1. Điều kiện sắc ký

- *Cột sắc ký*: C18; 100 x 2,1 mm; 1,7  $\mu\text{m}$ . Nhiệt độ cột 40  $^{\circ}\text{C}$ .

- *Pha động*: Methanol - dung dịch amoni acetat 10 mM (tỷ lệ thích hợp).

- *Tốc độ dòng*: 0,2 ml/phút.

- *Thể tích tiêm*: 5  $\mu\text{l}$ .

- *Nhiệt độ autosampler*: 4  $^{\circ}\text{C}$ .

#### 2.3.2. Điều kiện khối phổ

- *Kiểu khối phổ*: MS/MS, nguồn ion hóa ESI (-); chế độ quét chọn lọc mảnh phổ lần một tương ứng với cấu trúc phân tử ban đầu cho một proton và mang điện tích -1 ( $[\text{M}-\text{H}]^{-}$ ).

- Các thông số của thiết bị khối phổ để phát hiện Indapamid (INDA) và Cloramphenicol (CLR) được trình bày ở Bảng 1.

**Bảng 1.** Các thông số của detector khối phổ dùng để định lượng INDA và CLR

<i>Chất phân tích</i>	<b>INDA</b>	<b>CLR</b>
<i>Thông số</i>		
Điện thế nguồn phun	2500 V	2500 V
Nhiệt độ bay hơi dung môi	100 $^{\circ}\text{C}$	100 $^{\circ}\text{C}$
Áp suất khí bay hơi dung môi	20 psi	20 psi
Áp suất khí làm sạch tại đầu chóp thu nhận ion	1 psi	1 psi
Áp suất khí hỗ trợ bay hơi dung môi	5 psi	5 psi
Nhiệt độ mao quản	360 $^{\circ}\text{C}$	360 $^{\circ}\text{C}$
Điện thế hội tụ chùm ion	126 V	75 V
Ion ban đầu (Dalton)	$m/z = 364,0$	$m/z = 321,0$
Năng lượng phân mảnh ion	28,0 V	20,0 V
Ion hình thành (Dalton)	$m/z = 189,0$	$m/z = 152,0$

#### 2.3.3. Xử lý mẫu huyết tương, chiết tách INDA

Hút 100  $\mu\text{l}$  dung dịch chuẩn nội Cloramphenicol (pha trong methanol, nồng độ chính xác khoảng 0,25  $\mu\text{g/ml}$ ) vào 1,0 ml mẫu huyết tương (HT) đã rã đông ở nhiệt độ phòng. Thêm 0,25 ml dung dịch amoniac 0,1M; lắc 15 giây, sau đó thêm 5 ml dung môi tert-butyl methyl ether, lắc, ly tâm. Hút 3 ml lớp dung môi phía trên. Bốc hơi dung môi dưới dòng khí nitơ thu lấy cặn. Hòa tan cặn trong 0,5 ml pha động, tiêm sắc ký.

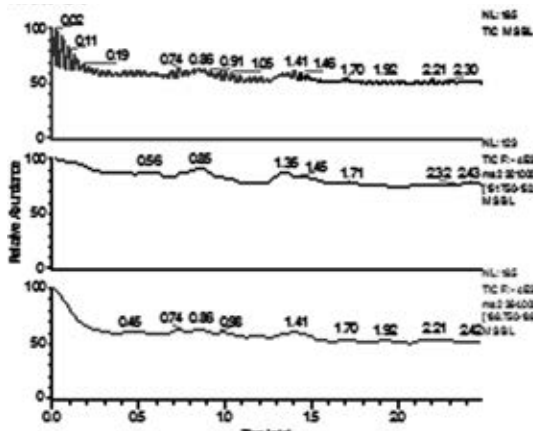
#### 2.3.4. Phương pháp tính kết quả

Xác định nồng độ INDA có trong các mẫu thử (chưa biết nồng độ) dựa vào tỷ lệ diện tích pic INDA/IS thu được từ sắc ký đồ của mẫu thử và đường chuẩn biểu thị mối tương quan giữa nồng độ INDA có trong các mẫu chuẩn với tỷ lệ diện tích pic INDA/IS của mẫu chuẩn. Tiến hành thẩm định phương pháp phân tích theo quy định của EMA và US-FDA [2],[5].

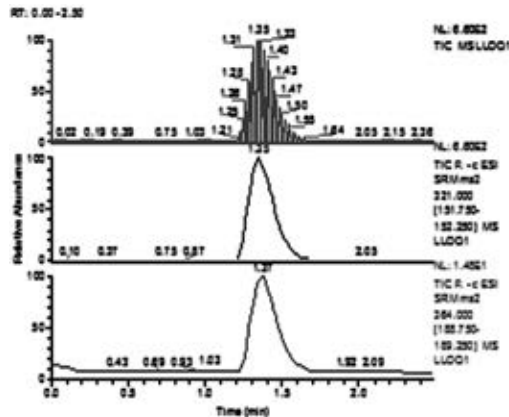
## 3. Kết quả và bàn luận

### 3.1. Độ đặc hiệu - chọn lọc của phương pháp

Phân tích các mẫu HT trắng và mẫu HT tự tạo chứa INDA nồng độ khoảng 0,5 ng/ml theo phương pháp đã xây dựng và ghi lại sắc ký đồ (Hình 1, 2).



Hình 1. SKĐ mẫu HT trắng



Hình 2. SKĐ mẫu HT trắng có CLR và INDA ở nồng độ LLOQ (0,5 ng/ml)

Trên sắc ký đồ của mẫu HT trắng (Hình 1), tại các thời điểm 1,37 và 1,35 phút (trùng với thời gian lưu của INDA và CLR trong SKĐ của mẫu chuẩn - Hình 2) không xuất hiện các pic có các mảnh phổ khối  $m/z = 364 \rightarrow 189$  (INDA) và  $m/z = 321 \rightarrow 152$  (CLR). Do vậy, phương pháp phân tích có độ đặc hiệu-chọn lọc với INDA và CLR theo các quy định của phương pháp phân tích thuốc trong dịch sinh học [2],[5].

### 3.2. Đường chuẩn và khoảng tuyến tính

Phân tích các mẫu HT chứa chuẩn INDA có nồng độ khoảng 0,5 ng/ml đến 100 ng/ml theo quy trình đã xây dựng. Xác định sự tương quan giữa nồng độ INDA có trong mẫu và tỉ lệ diện tích pic INDA/IS thu được trên SKĐ bằng phương pháp hồi qui tuyến tính, sử dụng hệ số tỷ trọng  $1/(\text{nồng độ})^2$ .

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

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

Mẫu chuẩn Nồng độ (ng/ml)	Độ đúng (%)				
	Đường chuẩn 1	Đường chuẩn 2	Đường chuẩn 3	Đường chuẩn 4	Đường chuẩn 5
0,5	96,7	97,6	102,5	93,7	103,6
1,0	101,9	103,8	100,5	109,6	93,1
2,5	105,7	96,7	92,2	110,7	98,5
5,0	108,4	108,2	90,7	95,4	100,4
9,9	109,3	107,9	92,0	97,6	102,1
29,8	108,7	103,1	103,6	101,2	101,0
59,7	83,9	90,7	107,7	93,7	100,8
99,5	85,4	91,9	110,8	98,1	100,6
Phương trình hồi quy* ( $y = ax + b$ )	$y = 0,0369x + 0,0020$	$y = 0,0338x + 0,0033$	$y = 0,0346x - 0,0015$	$y = 0,0345x + 0,0026$	$y = 0,0318x + 0,0004$
Hệ số r	0,9930	0,9970	0,9962	0,9970	0,9994

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

Kết quả thẩm định cho thấy trong khoảng nồng độ từ 0,5 ng/ml đến 100 ng/ml có sự tương quan tuyến tính giữa nồng độ INDA và tỷ lệ diện tích pic INDA/IS với hệ số tương quan xấp xỉ bằng 1 ( $r > 0,99$ ).

Nồng độ INDA xác định được từ đường chuẩn so với nồng độ lý thuyết đều nằm trong giới hạn cho phép theo quy định của phương pháp phân tích thuốc trong dịch sinh học [2],[5].

### 3.3. Giới hạn định lượng dưới của phương pháp

Phân tích các mẫu HT trắng và mẫu HT chứa INDA nồng độ chính xác khoảng 0,5 ng/ml (mẫu LLOQ). Xác định nồng độ INDA có trong các mẫu LLOQ từ đường chuẩn tiến hành làm song song trong cùng điều kiện.

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

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

STT	Mẫu trắng	Mẫu chuẩn (0,5 ng/ml)			
	Diện tích pic (IC.s)	Diện tích pic INDA (IC.s)	Diện tích pic IS (IC.s)	Nồng độ INDA tìm lại (ng/ml)	Độ đúng (%)
1	7	230	14497	0,5	<b>100,9</b>
2	6	235	14282	0,5	<b>104,2</b>
3	2	220	14543	0,5	<b>96,7</b>
4	7	230	14151	0,5	<b>103,3</b>
5	5	231	14337	0,5	<b>102,3</b>
6	4	240	14565	0,5	<b>104,5</b>
<b>TB</b>	<b>5</b>	<b>231</b>			<b>102,0</b>
<b>CV (%)</b>					<b>2,8</b>
<b>Đáp ứng trung bình của mẫu LLOQ/mẫu trắng</b>				<b>44,5</b>	

Kết quả thẩm định cho thấy đáp ứng trung bình của diện tích pic INDA trong các mẫu LLOQ đều lớn hơn 44,5 lần so với diện tích pic tạp có cùng thời gian lưu trong các mẫu trắng (qui định lớn hơn 5). Tỷ lệ giữa nồng độ INDA xác định từ đường chuẩn so với nồng độ lý thuyết có trong các mẫu LLOQ nằm trong khoảng 96,7% - 104,5% (trung bình = 102,0% và CV = 2,8%), đáp ứng yêu cầu giới hạn định lượng dưới của phương pháp phân tích thuốc trong dịch sinh học [2],[5].

### 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 LLOQ, LQC, SQC, MQC, HQC chứa INDA có nồng độ tương ứng là 0,5 ng/ml; 1,5 ng/ml; 15 ng/ml, 50 ng/ml, 80 ng/ml. Xác định hàm lượng INDA có trong các mẫu bằng đường chuẩn phân tích trong cùng điều kiện. Độ đúng của phương pháp là tỷ lệ % giữa nồng độ xác định được so với nồng độ lý thuyết. Độ lặp lại của phương pháp được biểu thị bằng giá trị CV%. Kết quả xác định độ đúng, độ lặp lại của phương pháp được trình bày ở Bảng 4.

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

Độ đúng, độ lặp lại	LLOQ (≈ 0,5 ng/ml)		LQC (≈ 1,5 ng/ml)		SQC (≈ 15 ng/ml)		MQC (≈ 50 ng/ml)		HQC (≈ 80 ng/ml)	
	Độ đúng (%)	CV (%)	Độ đúng (%)	CV (%)	Độ đúng (%)	CV (%)	Độ đúng (%)	CV (%)	Độ đúng (%)	CV (%)
Trong ngày (n = 6)	100,4	4,3	94,5	2,1	94,6	4,3	89,5	1,0	94,4	6,0
Khác ngày (n = 3)	105,6	5,8	97,8	6,8	93,4	4,3	95,9	6,1	91,8	4,8

Kết quả thẩm định cho thấy ở các khoảng nồng độ thấp, trung bình và cao, phương pháp có độ đúng trong ngày và khác ngày xấp xỉ 100%; độ lặp lại trong ngày và khác ngày với giá trị CV nhỏ hơn 7,0%; 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 EMA [2],[5].

### 3.5. Xác định tỉ lệ thu hồi của INDA và CLR

Tiến hành phân tích các lô LQC, SQC, MQC và HQC có qua chiết tách và các mẫu chuẩn pha trong pha động (không qua chiết tách) có nồng độ tương ứng cùng điều kiện. Xác định tỉ lệ thu hồi bằng cách so sánh diện tích pic

INDA và CLR trong các lô mẫu có qua chiết tách và không qua chiết tách (mẫu pha trong pha động). Kết quả xác định tỉ lệ thu hồi INDA và CLR được trình bày trong Bảng 5.

**Bảng 5. Tỉ lệ thu hồi INDA và CLR của phương pháp**

Hoạt chất	Indapamid				Cloramphenicol
	LQC	SQC	MQC	HQC	
Tỉ lệ thu hồi (%)	63,6	68,6	64,0	62,2	86,2

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

Tiến hành nghiên cứu độ ổn định của INDA trong HT trên các lô mẫu LQC và HQC. Đánh giá độ ổn định của INDA trong HT bằng cách so sánh nồng độ INDA có trong các mẫu được bảo quản và các mẫu có nồng độ tương ứng được phân tích ngay sau khi hòa tan chuẩn INDA vào HT trắng. Kết quả nghiên cứu độ ổn định của INDA được trình bày trong Bảng 6.

**Bảng 6. Kết quả nghiên cứu độ ổn định của INDA trong HT**

Độ ổn định	Mẫu	Nồng độ ban đầu (ng/ml; n = 6)	Nồng độ sau bảo quản (ng/ml; n = 6)	% Sai khác
3 chu kỳ đông - rã	LQC	1,6 ± 0,02	1,5 ± 0,05	-6,9%
	HQC	78,2 ± 3,08	70,8 ± 1,24	-9,4%
Độ ổn định thời gian ngắn (6 giờ, nhiệt độ phòng)	LQC	1,6 ± 0,02	1,5 ± 0,15	-9,1%
	HQC	78,2 ± 3,08	76,4 ± 3,77	-2,3%
Độ ổn định trong autosampler (70 giờ/4°C)	LQC	1,5 ± 0,05	1,4 ± 0,02	-9,8%
	HQC	77,9 ± 1,55	69,5 ± 2,81	-10,8%
Độ ổn định huyết tương dài ngày (-35°C ± 5°C, 71 ngày)	LQC	1,6 ± 0,02	1,7 ± 0,03	0,4%
	HQC	78,2 ± 3,08	85,1 ± 2,67	8,8%

## 4. Kết luận

Nghiên cứu đã xây dựng được phương pháp định lượng Indapamid trong huyết tương người bằng LC-MS/MS. Kết quả thẩm định cho thấy, phương pháp có giá trị giới hạn định lượng dưới nhỏ (0,5 ng/ml); khoảng tuyến tính rộng (từ 0,5 ng/ml đến 100 ng/ml); độ đúng, độ lặp lại nằm trong giới hạn cho phép, thời gian phân tích ngắn (2,5 phút cho mỗi mẫu), đáp ứng yêu cầu đối với phương pháp phân tích thuốc trong dịch sinh học của US-FDA và EMA. Phương pháp đã xây dựng có thể ứng dụng trong các nghiên cứu đánh giá tương đương sinh học đối với chế phẩm chứa hoạt chất Indapamid.

### Tài liệu tham khảo

- Bộ Y tế (2015), *Dược thư quốc gia Việt Nam*, lần xuất bản thứ 2, Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật.
- European Medicines Agency (2012), *Guideline on bioanalytical method validation*.
- G. Li, X.Zhang, Y.Tian, Z.Zhang, J.Rui, X.Chu (2013), "Pharmacokinetics and Bioequivalence Study of Two Indapamide Formulations after Single-dose Administration in Healthy Chinese Male Volunteers". *Drug Research*, 63(1):13-8.
- Tang J1, Li J, Sun J, Yin J, He Z. (2005), "Rapid and sensitive determination of indapamide in human blood by liquid chromatography with electrospray ionization mass spectrometric detection: application to a bioequivalence study". *Pharmazie* 60 (11), pp. 819-822.
- U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration (2013): *Guidance for Industry - Bioanalytical Method Validation*.

### SUMMARY

*A sensitive LC-ESI-MS/MS method for the determination of Indapamide in human plasma using Chloramphenicol as the internal standard (IS) was established. After alkalization with Ammonia solution 0.1 M, plasma samples were extracted with Tert-butyl methyl ether and separated on a C18 column with a mobile phase containing 10 mM Ammonium acetate and Methanol with suitable ratio. LC-MS/MS was operated under the selected reaction-monitoring mode (SRM) using the electro spray ionization technique in negative ion mode and the transitions of m/z 364→189 and m/z 321→152 were used to quantify Indapamide and the internal standard, respectively. Calibration curves were linear over the ranges of 0.5–100 ng/ml for Indapamide. The lower limit of quantification was 0.5 ng/ml. The intra-day and inter-day accuracy were within 89.5% - 105.6%. This method can be used for bioequivalence studies of Indapamide preparations.*

# NGHIÊN CỨU XÁC ĐỊNH METHYLENDIOXYMETHAMPHETAMIN TRONG NƯỚC TIỂU BẰNG SẮC KÝ KHÍ KHỐI PHỔ

TRẦN VIỆT HÙNG

*Viện Kiểm nghiệm thuốc TP. Hồ Chí Minh*

PHẠM QUỐC CHINH, PHẠM THỊ THU HÀ,  
NGUYỄN TIẾN VỪNG

*Viện Pháp y Quốc gia*

## 1. Đặt vấn đề

Methylenedioxyamphetamin (MDMA) còn được gọi là thuốc lắc, ecstasy; là một chất kích thích thần kinh tổng hợp nhóm amphetamin (ATS) hiện đang bị sử dụng bất hợp pháp trên thế giới trong đó có Việt Nam. Đối tượng sử dụng ATS chiếm khoảng 25-30% tổng số người nghiện, trong đó chủ yếu là thanh thiếu niên [5], là nguyên nhân gây mất trật tự an toàn và nhiều hệ lụy trong xã hội [1]. Chính vì vậy, việc phân tích xác định sự có mặt của ATS trong các mẫu giám định pháp y như nước tiểu, máu và tóc thu hút được nhiều sự quan tâm nghiên cứu của các nhà khoa học. Hiện nay, nhiều nghiên cứu trên thế giới đã áp dụng thành công sự kết hợp giữa phương pháp xử lý mẫu bằng kỹ thuật chiết pha rắn (SPE), chiết lỏng - lỏng với các phương pháp phân tích hiện đại sử dụng kỹ thuật sắc ký khí khối phổ (GC-MS), sắc ký lỏng khối phổ (LC-MS) trong việc xác định ma túy có trong dịch sinh học [2],[3]. Nghiên cứu này được thực hiện với mục tiêu xây dựng quy trình xác định MDMA trong nước tiểu sử dụng kỹ thuật SPE và GC-MS nhằm phục vụ công tác phòng chống tệ nạn ma túy và nâng cao năng lực giám định pháp y tại Việt Nam.

## 2. Thực nghiệm

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

#### 2.1.1. Thiết bị, dụng cụ

- Máy sắc ký khí khối phổ Agilent Technologies 6980N, detector MS 5975C.

- Hệ thống chiết pha rắn Agilent sử dụng cột Evidex Cartridges, 200 mg, 3 ml (Mỹ).

#### 2.1.2. Hóa chất, chất chuẩn

- Chất chuẩn MDMA (khối lượng phân tử: 193,25 g/mol): 1,0 mg/ml methanol (MeOH). Lot: FE 082712-03, USDEA Exempt/TK#61-15 (Mỹ).

- Chất chuẩn nội MA-d5 (khối lượng phân tử: 154,26): 1,0 mg/ml MeOH. Lot: FE 042012-02, USDEA Exempt/TK#61-105 (Mỹ).

- Methanol HPLC, ethyl acetat HPLC, heptafluorobutyric anhydrid (HFBA), kali hydrophosphat PA, kali dihydrophosphat PA, amoniac PA, acid hydrochloric PA... (hãng Merck, Đức).

### 2.2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

#### 2.2.1. Mẫu nghiên cứu

- Mẫu nước tiểu không nhiễm MDMA (mẫu trắng);

- Mẫu nước tiểu của người nghi ngờ sử dụng MDMA gửi đến giám định tại Viện Pháp y Quốc gia.

#### 2.2.2. Phương pháp nghiên cứu

##### 2.2.2.1. Điều kiện sắc ký

Cột sắc ký khí HP5-MS: (30 m × 250 μm × 0,25 μm). Chương trình nhiệt độ cột: Bắt đầu 80°C, giữ 3 phút, tăng 40°C/phút đến 200°C và giữ 1 phút, tiếp tục tăng 10°C/phút đến 290°C và giữ trong 10 phút. Khí mang: Heli, tốc độ dòng 1 ml/phút. Thể tích tiêm mẫu: 1 μl, chế độ không chia dòng. MS Source 230°C; MS Quad 150°C; Aux – Temperature 280°C. Nguồn ion hóa bằng va chạm điện tử (Electron impact, EI) với năng lượng 70 eV.

##### 2.2.2.2. Chuẩn bị mẫu

###### a. Các dung dịch chuẩn gốc:

- Các dung dịch chuẩn gốc có nồng độ 0,1 μg/ml và 1,0 μg/ml trong methanol được pha từ dung dịch chuẩn MDMA ban đầu nồng độ 1 mg/ml.

- Dung dịch chuẩn nội gốc có nồng độ 1,0 μg/ml trong methanol được pha từ dung dịch chuẩn MA-d5 ban đầu nồng độ 1 mg/ml.

b. *Mẫu chuẩn*: Sử dụng mẫu nước tiểu trắng thêm các dung dịch chuẩn gốc để được các mẫu có nồng độ MDMA từ 10 - 400 ng/ml và chuẩn nội MA-d5 100 ng/ml.

c. *Mẫu thử*: Sử dụng mẫu nước tiểu nghi có MDMA thêm dung dịch chuẩn nội gốc để được các mẫu có nồng độ MA-d5 100 ng/ml.

###### d. Xử lý mẫu:

- Hoạt hóa cột bằng methanol rồi đến dung dịch đệm phosphat 0,1M pH 6 mỗi loại 3 ml tốc độ 2 ml/phút.

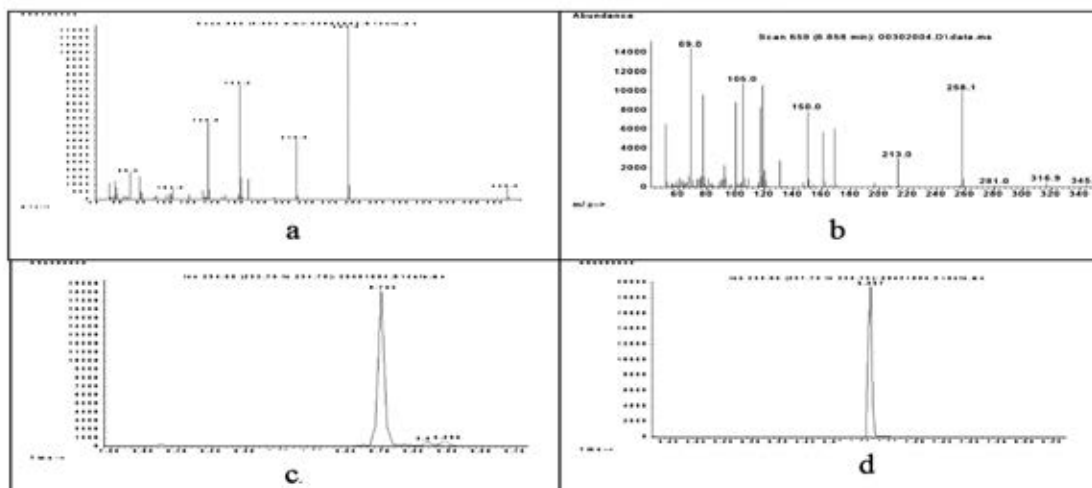
- Hút chính xác 1,0 ml mẫu nước tiểu (mẫu thử hoặc mẫu chuẩn) vào ống nghiệm, thêm 3 ml dung dịch đệm phosphat 0,1M pH 6 rồi nạp mẫu vào cột với tốc độ 2 ml/phút. Rửa cột với 10 ml nước cất và 5 ml dung dịch acid hydrochloric 0,1N tốc độ 5 ml/phút, rửa thêm với 5 ml methanol tốc độ 2 ml/phút, hút khô cột trong 1 phút. Rửa giải bằng 5 ml hỗn hợp ethyl acetat - methanol

- amoniac (80:18:2) tốc độ 2 ml/phút. Dịch rửa giải được làm khô dưới dòng khí nitơ tới khi thu được cặn khô [4]. Dẫn xuất của MDMA và MA-d5 với HFBA được tạo bằng cách thêm vào cặn 100 µl ethyl acetat và 100 µl HFBA. Ủ ở 70 °C trong 30 phút, để nguội, làm khô và hòa tan cặn bằng 100 µl methanol để tiến hành sắc ký.

### 3. Kết quả nghiên cứu

#### 3.1. Khảo sát phổ khối của MDMA và MA-d5

Dẫn xuất của MDMA và MA-d5 với HFBA có phổ khối rõ ràng, riêng biệt. Dựa vào tính đặc trưng và mức tín hiệu, chúng tôi chọn các mảnh  $m/z = 254$  cho MDMA và  $m/z = 258$  cho MA-d5 để tiến hành phân tích sắc ký theo chế độ chọn lọc ion – Selected ion monitoring (SIM) như Hình 1.



**Hình 1.** Phổ khối và sắc ký đồ của MDMA, MA-d5 dẫn xuất HFBA  
a. Phổ khối của MDMA-HFBA ; b. Phổ khối của MA-d5-HFBA  
c. Sắc ký đồ chọn lọc ion với mảnh  $m/z = 254$  của MDMA-HFBA  
d. Sắc ký đồ chọn lọc ion với mảnh  $m/z = 258$  của MA-d5-HFBA

#### 3.2. Đánh giá phương pháp

##### 3.2.1. Độ thích hợp của hệ thống sắc ký

**Bảng 1.** Độ thích hợp của hệ thống sắc ký

STT	MDMA	
	Thời gian lưu (phút)	Diện tích pic (Abu.s)
1	8,699	296890
2	8,714	289947
3	8,740	299436
4	8,742	300987
5	8,696	293501
6	8,701	295413
<b>TB</b>	<b>8,712</b>	<b>296029</b>
<b>SD</b>	<b>0,016</b>	<b>4017,25</b>
<b>RSD (%)</b>	<b>0,18</b>	<b>1,36</b>

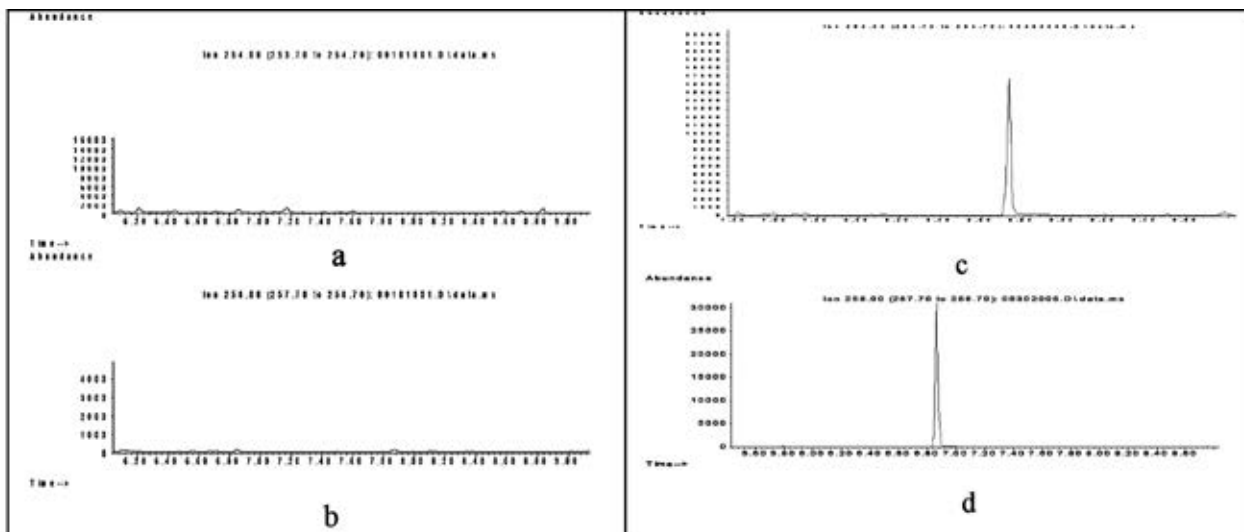
Tiêm lặp lại 6 lần dung dịch chuẩn được chuẩn bị từ mẫu chuẩn chứa 0,1 µg/ml MDMA trong methanol. Ghi lại giá trị thời gian lưu và diện tích pic. Kết quả thể hiện ở Bảng 1.

Kết quả ở Bảng 1 cho thấy thời gian lưu của pic từ 8,69 - 8,74 phút, trung bình là 8,71 phút; RSD của thời gian lưu và diện tích pic lần lượt là 0,18% và 1,36%. Thời gian lưu và diện tích pic giữa các lần phân tích không có sự khác biệt nhiều, đều có RSD < 2%. Vậy hệ thống sắc ký ổn định, đảm bảo tính chính xác để phân tích mẫu cho kết quả tin cậy.

##### 3.2.2. Độ đặc hiệu - chọn lọc

Chuẩn bị 6 mẫu nước tiểu trắng, 6 mẫu nước tiểu trắng thêm chuẩn và chuẩn nội ở nồng độ 100 ng/ml mỗi chất. Xử lý mẫu và tiến hành sắc ký theo điều kiện như trên. Sắc ký đồ của mẫu trắng và mẫu thêm chuẩn được trình bày ở Hình 2.





**Hình 2.** Sắc ký đồ của mẫu nước tiểu trắng và mẫu nước tiểu trắng thêm chuẩn  
 a. Sắc ký đồ của mẫu nước tiểu trắng với  $m/z = 254$   
 b. Sắc ký đồ của mẫu nước tiểu trắng với  $m/z = 258$   
 c. Sắc ký đồ của mẫu nước tiểu trắng thêm chuẩn và chuẩn nội với  $m/z = 254$   
 d. Sắc ký đồ của mẫu nước tiểu trắng thêm chuẩn và chuẩn nội với  $m/z = 258$

Kết quả cho thấy, trên sắc ký đồ của mẫu trắng thêm chuẩn và chuẩn nội có các pic xuất hiện ở khoảng 8,7 phút và 6,8 phút, phù hợp với giá trị thời gian lưu trên sắc ký đồ của MDMA và MA-d5 đã khảo sát. Trong khi đó trên sắc ký đồ của mẫu trắng không thấy xuất hiện bất kỳ pic nào tại các vị trí thời gian lưu tương ứng như trên. Như vậy, phương pháp có tính đặc hiệu, chọn lọc.

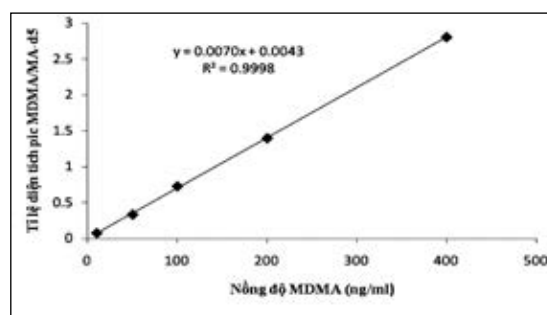
### 3.2.3. Độ tuyến tính

Để khảo sát sự phụ thuộc tuyến tính giữa nồng độ MDMA và tỉ lệ diện tích pic của MDMA/MA-d5, tiến hành sắc ký theo điều kiện đã lựa chọn sử dụng các mẫu chuẩn có nồng độ từ 10 – 400 ng/ml.

Kết quả khảo sát thể hiện ở Bảng 2, Hình 3.

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

Nồng độ MDMA (ng/ml)	Tỉ lệ diện tích pic MDMA/MA-d5
10	0,07692
50	0,33495
100	0,72818
200	1,39759
400	2,80421



**Hình 3.** Đồ thị biểu diễn sự phụ thuộc tuyến tính giữa nồng độ MDMA và tỷ lệ diện tích pic của MDMA/MA-d5

Kết quả thu được ở Bảng 2 và Hình 3 cho thấy có sự tương quan tuyến tính chặt chẽ giữa nồng độ MDMA với tỉ lệ diện tích pic MDMA/AM-d5 trong khoảng nồng độ đã khảo sát từ 10 - 400 ng/ml với hệ số tương quan r xấp xỉ bằng 1.

### 3.2.4. Độ đúng và độ lặp lại của phương pháp

Độ đúng và độ lặp lại được xác định trên 3 mẫu chuẩn có nồng độ của MDMA là 10 ng/ml; 50 ng/ml và 100 ng/ml, mỗi nồng độ thực hiện 5 lần. Xác định nồng độ MDMA trong mẫu bằng phương pháp đường chuẩn và tính độ thu hồi là tỉ lệ % giữa lượng xác định được so với lý thuyết. Kết quả được trình bày trong Bảng 3.

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

Lượng MDMA thêm vào (ng/ml)	Trung bình tỉ lệ MDMA/MA-d5	Lượng MDMA tìm lại (ng/ml)	Độ thu hồi (%)	Độ lặp lại (RSD %)
10	0,0751	10,11	101,10	3,29
50	0,3578	50,50	101,00	3,07
100	0,7424	105,44	105,44	3,02

Kết quả cho thấy phương pháp định lượng có độ đúng dao động trong khoảng 101,00% - 105,44%, độ lặp lại nhỏ với RSD từ 3,02% - 3,29%. Các kết quả này đáp ứng được yêu cầu về độ đúng, độ chính xác của phương pháp phân tích trong nước tiểu.

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

Khảo sát tín hiệu chiều cao pic MDMA ở các nồng độ giảm dần, từ kết quả thực nghiệm tìm được giới hạn phát hiện và giới hạn định lượng của MDMA nước tiểu được trình bày ở Bảng 4.

**Bảng 4. Kết quả khảo sát giới hạn định tính và giới hạn định lượng**

Giới hạn	MDMA (ng/ml)
LOD	3
LOQ	10

Giới hạn phát hiện và giới hạn định lượng của MDMA trong nước tiểu lần lượt là 3 ng/ml và 10 ng/ml cho thấy độ nhạy phân tích cao, đáp ứng được yêu cầu phân tích lượng vết.

### 3.2.6. Hiệu suất chiết

Khảo sát hiệu suất chiết đối với MDMA ở nồng độ 10 ng/ml và 100 ng/ml. Chuẩn bị mẫu chuẩn MDMA ở các nồng độ đã nêu, tiến hành chiết theo quy trình. Hiệu suất chiết được tính bằng tỷ lệ phần trăm diện tích pic của chuẩn cùng nồng độ giữa chuẩn được chiết và không chiết.

Hiệu suất chiết MDMA từ mẫu nước tiểu đạt khoảng từ 90,30% - 90,34%. Kết quả giữa các lần phân tích có độ lặp lại tốt với RSD < 3%.

**Bảng 5. Kết quả khảo sát hiệu suất chiết**

Stt	Hiệu suất chiết MDMA (%)	
	Mẫu 10 ng/ml	Mẫu 100 ng/ml
1	91,95	86,98
2	88,77	93,02
3	91,68	87,01
4	89,68	91,63
5	92,74	92,01
6	87,23	91,15
TB	90,34	90,30
RSD (%)	2,36	2,92

### 3.3. Áp dụng phân tích mẫu nước tiểu nghi ngờ nhiễm MDMA

Dựa trên quy trình đã xây dựng, áp dụng để định lượng một số mẫu nước tiểu của đối tượng nghi ngờ sử dụng MDMA. Mỗi mẫu được tiến hành lặp lại 3 lần, tính kết quả trung bình.

**Bảng 6. Kết quả định lượng trên một số mẫu nước tiểu nghi ngờ nhiễm MDMA**

STT	Họ tên	Tuổi	Nồng độ (ng/ml)
1	Trần Văn T	29	33,8
2	Nguyễn Duy T	25	(-)
3	Nguyễn Mạnh H	25	(-)
4	Nguyễn Tiến T	30	10,26
5	Nguyễn Việt D	27	(-)

Từ kết quả phân tích 5 mẫu thực tế, nhận thấy có 2 mẫu dương tính với MDMA và 3 mẫu âm tính với MDMA.

## 4. Kết luận

Đã xây dựng và thẩm định phương pháp xác định MDMA trong nước tiểu bằng sắc ký khí khối phổ với độ nhạy tốt, độ tin cậy cao và khả năng phát hiện được MDMA trong nước tiểu đến nồng độ nanogram/ml. Mẫu được xử lý bằng phương pháp chiết pha rắn; định tính và định lượng bằng sắc ký khí khối phổ. Phương pháp đã được áp dụng trong phân tích MDMA của 5 người nghi ngờ sử dụng ma túy tổng hợp. Kết quả cho thấy phương

pháp đã xây dựng phù hợp cho nghiên cứu xác định MDMA trong nước tiểu, quy trình này có thể được áp dụng cho các phòng giám định ma túy và phục vụ chuyên ngành pháp y trên toàn quốc.

### Tài liệu tham khảo

1. Quyết định 1001/QĐ-TTg năm 2011 phê duyệt “Chiến lược Quốc gia phòng, chống và kiểm soát ma túy ở Việt Nam đến năm 2020 và định hướng đến năm 2030”.
2. Huang MK, Liu C, Li JH, Huang SD (2005), “Simultaneous quantitative determination of amphetamines, ketamine, opiates and metabolites in human hair by gas chromatography/mass spectrometry”, *Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences*, 820:2, pg 165-73.
3. Dong-liang Lin, Rea-Ming Yin, Ray H. Liu (2005) “Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS) Analysis of Amphetamine, Methamphetamine, 3,4-Methylenedioxy- amphetamine and 3,4-Methylenedioxymethamphetamine in Human Hair and Hair Sections”, *Journal of Food and Drug Analysis*, Vol. 13, No. 3, Pages 193-200.
4. E.M.Thuman, M.S.Mill (1998), *Solid phase extraction, Principle and practice*, Chemical analysis, Volume 147.
5. UNODC (2013), *World Drug Report 2013*, United Nations publication, Sales No. E.13.XI.6.

### SUMMARY

*Methylenedioxymethamphetamine (MDMA) – the most common Amphetamine type stimulant which is used widely in Vietnam by drug abusers. By using solid phase extraction (SPE) technique and gas chromatography – mass spectrometry (GC- MS), a simple method was developed to analyse this kind of drug in urine samples. It takes only a short time to carry out the test. Also, this study demonstrated a very specific and sensitive method with the high accuracy, precision, the low limit of detection (LOD = 3 ng/ml) and limit of quantitation (LOQ = 10 ng/ml) as well.*

## ĐÁNH GIÁ TÁC DỤNG BẢO VỆ GAN TRÊN THỰC NGHIỆM CỦA CHẾ PHẨM TERKUMIN

PHÙNG CHÁT

Công ty Cổ phần Dược Danapha

NGUYỄN THỊ LIÊN

Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương

### 1. Đặt vấn đề

Viên nang Terkumin là chế phẩm bảo vệ gan có nguồn gốc từ thảo mộc của Công ty Cổ phần Dược Danapha. Thuốc được bào chế từ các loại dược liệu có tác dụng nhuận gan, lợi mật như cao khô Actiso, cao Biền Súc, cao khô Diệp Hạ Châu đắng và Nghệ. Terkumin được chỉ định cho các trường hợp: điều trị tăng men gan, tăng cường chức năng giải độc và bảo vệ gan tránh các tác hại do dùng nhiều rượu, bia, dược phẩm..., điều trị các triệu chứng liên quan đến bệnh lý về gan như: các tình trạng dị ứng do gan (mụn nhọt, mề đay, mẩn ngứa); ăn không tiêu, vàng da, táo bón, hỗ trợ điều trị viêm gan cấp và mạn tính. Tác dụng trên gan của từng thành phần dược liệu trong viên nang Terkumin đã được chứng minh và công bố trên các tạp chí khoa học trong và ngoài nước [2],[5],[6]. Tuy nhiên sự kết hợp giữa các thành phần vào trong nang Terkumin liệu có mang lại hiệu quả điều trị đối với các bệnh lý về gan hay không hiện chưa có nghiên cứu nào chứng minh. Vì vậy nghiên

cứu này được thực hiện nhằm đánh giá tác dụng bảo vệ gan trên mô hình thực nghiệm gây tổn thương gan cấp bằng paracetamol cho chuột nhắt trắng của chế phẩm viên nang Terkumin.

### 2. Thực nghiệm

#### 2.1. Thiết bị, dụng cụ, hóa chất

- Máy xét nghiệm sinh hóa tự động của Beckman Coulter AU 680;
- Máy cất vi thể Microm HM315;
- Kính hiển vi quang học gắn camera kết nối máy tính;
- Kit định lượng AST, ALT và bilirubin của Beckman Coulter;
- Kim cong cho uống;
- Xy lanh, găng cao su, cốc thủy tinh, chày cối sứ;
- Viên nén Efferalgan (paracetamol 500 mg) của Công ty Bristol-Myers Squibb, Pháp, số lô sản xuất: P7350, ngày sản xuất 04/06/2014, hạn dùng 04/06/2017.

## 2.2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

### 2.2.1. Động vật thí nghiệm

Chuột nhắt trắng đực dòng Swiss, trọng lượng 20-25 g, được cung cấp bởi Viện Vệ sinh dịch tễ Trung ương. Chuột được nuôi 10 con mỗi chuồng trong điều kiện phòng thí nghiệm chu kỳ 12 h sáng/tối với thức ăn nước uống theo nhu cầu. Tất cả quy trình thực hiện trên động vật thí nghiệm đều được tuân theo hướng dẫn về chăm sóc và sử dụng động vật thí nghiệm của Khoa Dược lý – Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương.

### 2.2.2. Thuốc nghiên cứu

Viên nang Terkumin của Công ty Cổ phần Dược phẩm Danapha, số lô sản xuất: 010213.

### 2.2.3. Thuốc đối chứng

Viên nén Legalon (silymarin 70 mg) của công ty Madaus, Đức, số lô sản xuất: B1302695.

### 2.2.4. Qui trình thử nghiệm

Trong nghiên cứu này, mô hình gây độc gan cấp cho chuột nhắt trắng bằng cách cho uống paracetamol liều cao 400 mg/kg thể trọng được lựa chọn. Đây là mô hình kinh điển đã được sử dụng rộng rãi cho các nghiên cứu về tác dụng bảo vệ gan cả trong nước và quốc tế [1],[2],[3],[5] với thiết kế cụ thể như sau:

#### 2.2.4.1. Chuẩn bị mẫu thử

Lựa chọn mức liều thử nghiệm: Dựa trên kết quả thử nghiệm sơ bộ và dựa trên hệ số ngoại suy liều dùng giữa người và động vật [4], chúng tôi chọn 3 mức liều thử nghiệm như sau:

+ Liều thấp: 0,86 viên/kg chuột (tương ứng với liều của người là 3,50 viên/ngày)

+ Liều trung bình: 1,72 viên/kg chuột (tương ứng với liều của người là 7,01 viên/ngày)

+ Liều cao: 3,45 viên/kg chuột (tương ứng với liều của người là 14,02 viên/ngày)

+ Thuốc đối chứng (silymarin): 100 mg/kg (tương ứng với liều của người là 6 viên (420 mg/ngày)

+ Paracetamol: 400 mg/kg

Chuẩn bị dung dịch/hỗn dịch uống:

+ Dung dịch đối chứng: nước.

+ Liều cao: Nghiền 5 viên nang Terkumin trong nước để thu được 14,5 ml.

+ Liều trung bình: Hút 6 ml hỗn dịch liều cao thêm 6 ml nước trộn đều.

+ Liều thấp: Hút 5 ml hỗn dịch liều trung bình thêm 5 ml nước, trộn đều.

+ Silymarin: Nghiền 1 viên silymarin trong nước để thu được 7 ml.

+ Paracetamol: Pha 1 viên trong nước để thu được 25 ml.

#### 2.2.4.2. Bố trí thí nghiệm

Thí nghiệm được tiến hành trên 60 chuột, chia ngẫu nhiên thành 6 nhóm (1 nhóm chứng sinh học, 1 nhóm gây mô hình và 3 nhóm uống Terkumin với các mức liều khác nhau, 1 nhóm uống silymarin), mỗi nhóm 10 chuột. Bố trí thí nghiệm theo Bảng 1.

**Bảng 1. Phân nhóm chuột và liều thuốc cho mỗi nhóm**

STT	Nhóm	Số chuột	Ngày thứ 1-7	Ngày thứ 8
1	Chứng sinh học	10	0,2 ml nước/20 g	0,2 ml nước/10 g chuột
2	Gây mô hình	10	0,2 ml nước/20 g	Uống nước/thuốc giống như ở ngày 7  2 giờ sau cho chuột uống paracetamol 400 mg/kg với thể tích 0,2 ml/10g
3	Liều thấp	10	0,2 ml hỗn dịch liều thấp/20 g	
4	Liều trung bình	10	0,2 ml hỗn dịch liều trung bình/20 g	
5	Liều cao	10	0,2 ml hỗn dịch liều cao/20 g	
6	Thuốc đối chứng	10	0,2 ml hỗn dịch silymarin/20 g	

Mỗi mức liều cho uống một lần trong ngày vào khoảng 9 giờ sáng.

Ở ngày thứ 10, sau 48 h gây độc bằng paracetamol, lấy máu chuột để làm xét nghiệm các chỉ số sinh hóa AST, ALT và bilirubin, đồng thời lấy ngẫu nhiên 3 chuột/nhóm để làm giải phẫu mô bệnh học gan.

#### 2.2.5. Xử lý kết quả

Dữ liệu được xử lý theo phương pháp thống kê dùng trong sinh học bằng phần mềm Prism phiên bản 5.0 (Graph Pad Software, USA). Giá trị  $P < 0,05$  được coi là có ý nghĩa thống kê.

## 3. Kết quả

### 3.1. Thử nghiệm chuột

Chỉ số cân nặng được trình bày dưới dạng giá trị trung bình (mean) ± độ lệch chuẩn (SD). Dữ liệu được phân tích bằng phép phân tích biến 1 chiều (one-way ANOVA) và được phân tích tiếp để so sánh sự khác biệt giữa các nhóm bằng test Newman-Keuls.

**Bảng 2. Kết quả trọng lượng chuột**

STT	Nhóm 1 (chứng sinh học)	Nhóm 2 (gây mô hình)	Nhóm 3 (liều thấp)	Nhóm 4 (liều trung bình)	Nhóm 5 (liều cao)	Nhóm 6 (thuốc đối chứng)
Ngày thứ 1	18,7 ± 0,7	18,7 ± 0,4	18,2 ± 0,5	18,4 ± 0,8	18,3 ± 0,7	18,4 ± 1,2
Ngày thứ 3	21,2 ± 1,4	20,4 ± 0,7	21,1 ± 1,5	20,9 ± 1,4	21,4 ± 1,0	21,2 ± 1,1
Ngày thứ 5	23,0 ± 1,0	22,4 ± 1,1	23,4 ± 2,0	22,5 ± 1,2	23,1 ± 1,2	23,0 ± 2,3
Ngày thứ 7	24,3 ± 1,2	24,1 ± 1,4	25,1 ± 2,3	23,7 ± 1,1	24,2 ± 1,4	24,5 ± 2,8
Ngày thứ 8	26,2 ± 1,2	26,3 ± 1,6	26,9 ± 2,4	25,7 ± 1,2	26,2 ± 1,2	26,4 ± 3,9
Ngày thứ 10	28,9 ± 1,8	24,9 ± 2,7 (P* < 0,05)	26,6 ± 2,4 (P* > 0,05) (P& > 0,05) (P# > 0,05)	26,3 ± 2,6 (P* > 0,05) (P& > 0,05) (P# > 0,05)	26,1 ± 1,5 (P* > 0,05) (P& > 0,05) (P# > 0,05)	26,4 ± 3,7 (P* > 0,05) (P& > 0,05)

P\* so sánh với nhóm 1 (nhóm chứng sinh học);

P& so sánh với nhóm 2 (nhóm gây mô hình);

P# so sánh với nhóm 6 (nhóm thuốc đối chứng).

**Nhận xét:** Theo dõi cân nặng của chuột trong quá trình thí nghiệm cho thấy, cân nặng trung bình của 6 nhóm trước khi đưa vào thử nghiệm không có sự khác biệt có ý nghĩa (P > 0,05).

Sau 8 ngày thử nghiệm, cân nặng trung bình của chuột đều tăng so với trước thử nghiệm ở cả 6 nhóm.

Ở ngày thứ 10: Sau khi gây độc bằng paracetamol cân nặng của chuột ở nhóm gây mô hình giảm có ý nghĩa thống kê so với nhóm chứng sinh học (P < 0,05). Ở 3 nhóm thử và nhóm thuốc đối chứng cân nặng chuột chỉ thay đổi nhẹ không đáng kể (P > 0,05). Không có sự khác biệt có ý nghĩa giữa 3 nhóm thử, nhóm thuốc đối chứng và nhóm chứng sinh học (P > 0,05).

### 3.2. Kết quả theo dõi các chỉ số sinh hóa

**Bảng 3. Kết quả sinh hóa**

Chỉ số	Nhóm 1 (chứng sinh học)	Nhóm 2 (gây mô hình)	Nhóm 3 (liều thấp)	Nhóm 4 (liều trung bình)	Nhóm 5 (liều cao)	Nhóm 6 (thuốc đối chứng)
AST (U/l)	199,2 ± 45,7	454,6 ± 183,1 (P* < 0,05)	327,3 ± 160,5 (P* > 0,05) (P& > 0,05) (P# > 0,05)	231,7 ± 196,1 (P* > 0,05) (P& < 0,05) (P# > 0,05)	273,1 ± 164,7 (P* > 0,05) (P& < 0,05) (P# > 0,05)	247,5 ± 220,4 (P* > 0,05) (P& < 0,05)
ALT (U/l)	67,4 ± 32,9	251,2 ± 151,7 (P* < 0,001)	168,5 ± 55,9 (P* < 0,05) (P& < 0,05) (P# > 0,05)	148,0 ± 76,2 (P* > 0,05) (P& < 0,05) (P# > 0,05)	142,9 ± 47,3 (P* > 0,05) (P& < 0,05) (P# > 0,05)	129,9 ± 43,0 (P* > 0,05) (P& < 0,01)
Bilirubin (µmol/l)	1,0 ± 0,5	3,3 ± 2,7 (P* < 0,01)	1,9 ± 0,9 (P* > 0,05) (P& < 0,05) (P# > 0,05)	1,3 ± 0,5 (P* > 0,05) (P& < 0,01) (P# > 0,05)	1,8 ± 0,5 (P* > 0,05) (P& < 0,05) (P# > 0,05)	1,6 ± 0,4 (P* > 0,05) (P& < 0,05)

P\* so sánh với nhóm 1 (nhóm chứng sinh học);

P& so sánh với nhóm 2 (nhóm gây mô hình);

P# so sánh với nhóm 6 (nhóm thuốc đối chứng).

Chỉ số sinh hóa được trình bày dưới dạng giá trị trung bình (mean)  $\pm$  sai số chuẩn (SEM). Dữ liệu được phân tích bằng phép phân tích biến 1 chiều (one-way ANOVA) và được phân tích tiếp để so sánh sự khác biệt giữa các nhóm bằng test Newman-Keuls.

**Nhận xét:** Chỉ số men gan AST ở nhóm gây mô hình tăng 2,28 lần so với nhóm chứng sinh học ( $P < 0,05$ ). Terkumin ở cả 2 liều trung bình và liều cao đều có tác dụng làm giảm chỉ số AST xuống còn khoảng 60% so với nhóm gây mô hình ( $P < 0,05$ ) và không còn khác biệt có ý nghĩa thống kê so với nhóm chứng ( $P > 0,05$ ). Nồng độ AST ở 2 nhóm liều trung bình và liều cao là tương đương so với nhóm uống silymarin. Nhóm liều thấp có làm giảm chỉ số AST, tuy nhiên không có sự khác biệt so với nhóm gây mô hình ( $P > 0,05$ ).

Chỉ số men gan ALT ở nhóm gây mô hình tăng 3,73 lần so với nhóm chứng sinh học ( $P < 0,001$ ). Cả 3 liều Terkumin đều có tác dụng làm giảm chỉ số ALT xuống còn khoảng một nửa so với nhóm gây mô hình ( $P < 0,05$ ). Tuy nhiên ở nhóm uống liều thấp chỉ số ALT vẫn còn cao hơn có ý nghĩa so với nhóm chứng sinh học ( $P < 0,05$ ). Nồng độ AST ở 2 nhóm liều trung bình và liều cao là tương đương so với nhóm uống silymarin.

Chỉ số bilirubin toàn phần tăng cao ở nhóm gây mô hình so với nhóm chứng (3,3 lần,  $P < 0,01$ ). Cả 3 liều Terkumin đều có tác dụng làm giảm chỉ số bilirubin xuống còn khoảng một nửa so với nhóm gây mô hình ( $P < 0,05$  và  $P < 0,01$ ). Không có sự khác biệt có ý nghĩa giữa 3 nhóm uống Terkumin và nhóm chứng sinh học ( $P > 0,05$ ).

### 3.3. Kết quả mô bệnh học

Ở ngày thử nghiệm cuối cùng (ngày thứ 10), sau khi lấy máu, tiến hành mổ lấy gan mỗi nhóm 3 con, tổng cộng 18 con để làm tiêu bản mô học. Kết quả giải phẫu bệnh học như sau:

#### 3.3.1. Về đại thể

Các nhóm 1, 3, 4, 5, 6 kích thước gan có hình thái bình thường. Gan màu đỏ tươi, vỏ gan nhẵn, không thấy nốt, cục. Diện cắt mềm, đồng nhất, không thấy ổ hoại tử, chảy máu. Đường mật không thấy sỏi, không hoại tử. Riêng nhóm 2 có một vài điểm xuất huyết nhỏ.

#### 3.3.2. Về vi thể

**Nhóm chứng sinh học:** Cấu trúc mô gan không bị đảo lộn, nhận rõ các tiểu thùy gan, khoảng cửa. Các tế bào gan sắp xếp theo hướng xuyên tâm, không hoại tử, không bị thoái hóa, không có nhân bất thường, không lắng đọng glycogen. Các tĩnh mạch trung tâm tiểu thùy sung huyết. Vùng khoảng cửa không xâm nhập viêm, không thấy quá sản các ống mật. Kết luận: Nhu mô gan không thấy tổn thương.

**Nhóm gây mô hình:** Trong nhu mô gan có nhiều ổ hoại tử tế bào gan. Các ổ hoại tử có kích thước không đều. Trong các ổ hoại tử thấy các tế bào gan thoái hóa, hoại tử với nhiều mảnh vụn tế bào, nhiều tế bào viêm cấp tính lẫn ít lympho bào, xơ tăng sinh nhẹ. Kết luận: Viêm gan hoại tử dạng ổ.

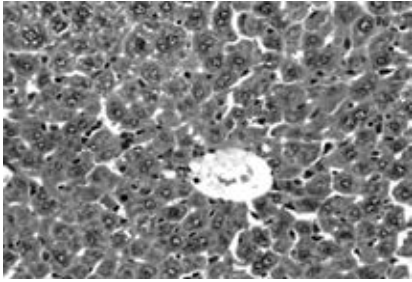
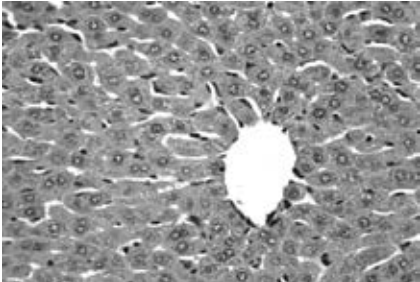
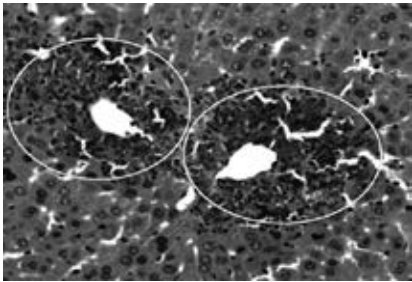
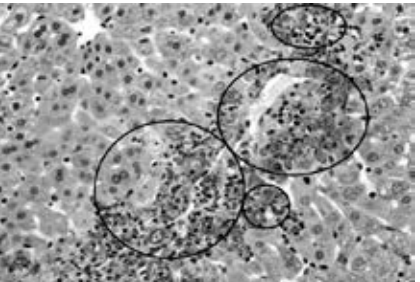
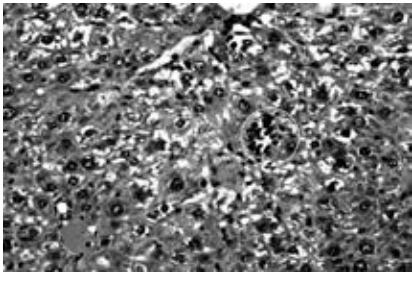
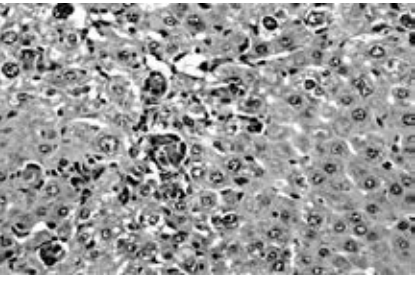
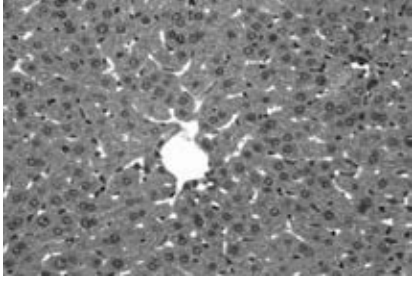
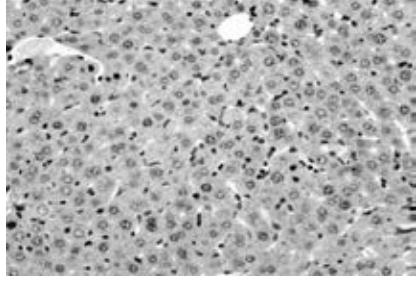
**Nhóm liều thấp:** Trong nhu mô gan thấy có một số ổ xâm nhập của các tế bào viêm. Các tế bào gan thoái hóa ở các mức độ khác nhau, từ thoái hóa mất nhân đến thoái hóa nước, thoái hóa hạt, tập trung thành vùng, chủ yếu quanh các ổ viêm. Khoảng cửa không thấy tăng sinh xơ, xâm nhập ít tế bào viêm một nhân. Kết luận: Viêm gan dạng ổ.

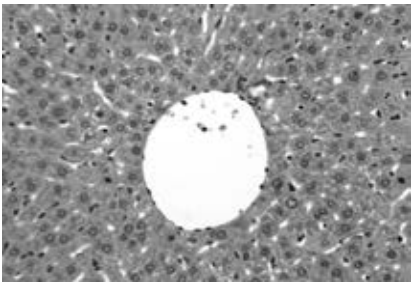
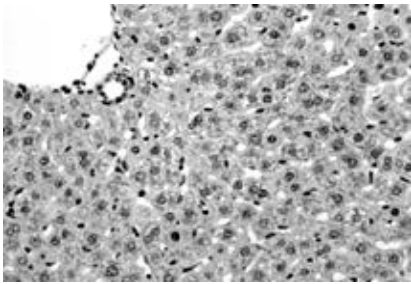
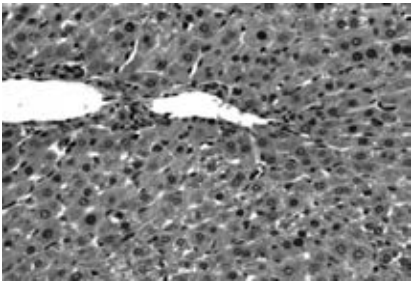
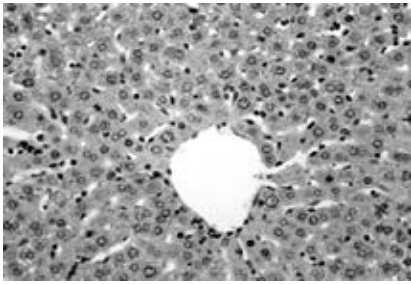
**Nhóm liều trung bình:** Trên các mảnh cắt từ mô gan cho thấy: Cấu trúc gan không bị đảo lộn, nhận rõ các tiểu thùy với tĩnh mạch trung tâm và các bè gan sắp xếp hướng tâm. Các tế bào gan hình tròn hay đa diện, có nhân nhỏ, đều nhau, không thấy hoại tử, không thấy xâm nhập viêm. Một số tế bào gan thoái hóa mức độ nhẹ (chủ yếu là thoái hóa nước, thoái hóa hạt) không thấy lắng đọng glycogen. Các khoảng cửa không tăng sinh xơ, không tăng sinh ống mật, không thấy xâm nhập tế bào viêm. Kết luận: Nhu mô gan không thấy tổn thương.

**Nhóm liều cao:** Cấu trúc mô gan không bị đảo lộn, nhận rõ các tiểu thùy gan, khoảng cửa. Các tế bào gan sắp xếp theo hướng xuyên tâm, không hoại tử, không có nhân bất thường, không lắng đọng quá mức glycogen. Có một tỷ lệ thấp ( $< 2\%$  các tế bào gan thoái hóa nước nhẹ). Vùng khoảng cửa không tăng sinh xơ, không xâm nhập viêm, không thấy quá sản các ống mật. Kết luận: Nhu mô gan không thấy tổn thương.

**Nhóm thuốc đối chứng:** Trên các mảnh cắt từ mô gan cho thấy: Cấu trúc gan không bị đảo lộn, nhận rõ các tiểu thùy với tĩnh mạch trung tâm và các bè gan sắp xếp hướng tâm. Các tế bào gan hình tròn hay đa diện, có nhân nhỏ, đều nhau, không thấy hoại tử, không thấy

xâm nhập viêm. Một số tế bào gan thoái hóa mức độ nhẹ (chủ yếu là thoái hóa nước, thoái hóa hạt) không thấy lắng đọng glycogen. Các khoảng cửa không tăng sinh xơ, không tăng sinh ống mật, không thấy xâm nhập tế bào viêm. Kết luận: Nhu mô gan không thấy tổn thương.

TT	Nhóm	Hình ảnh mô gan đại diện của nhóm	
		Nhuộm HE × 400	Nhuộm PAS × 400
1	Chứng sinh học	 <p>Nhu mô gan có cấu trúc hình thái trong giới hạn bình thường</p>	 <p>Các tế bào gan không thoái hóa, không lắng đọng glycogen</p>
2	Gây mô hình	 <p>Trong nhu mô gan có ổ hoại tử tế bào gan</p>	 <p>Trong các ổ hoại tử có các tế bào gan thoái hóa, lắng đọng glycogen (vòng tròn)</p>
3	Liều thấp	 <p>Ổ xâm nhập tế bào viêm trong nhu mô gan (vòng tròn)</p>	 <p>Các tế bào gan thoái hóa, lắng đọng glycogen</p>
4	Liều trung bình	 <p>Mô gan vùng tĩnh mạch trung tâm tiểu thùy không thấy tổn thương</p>	 <p>Các tế bào gan không bị tổn thương</p>

5	<b>Liều cao</b>	 <p data-bbox="420 414 892 472">Nhu mô gan có cấu trúc hình thái trong giới hạn bình thường</p>	 <p data-bbox="962 414 1308 472">Các tế bào gan không lắng đọng glycogen</p>
6	<b>Thuốc đối chứng</b>	 <p data-bbox="420 788 892 846">Nhu mô gan có cấu trúc hình thái trong giới hạn bình thường</p>	 <p data-bbox="962 788 1308 846">Các tế bào gan không lắng đọng glycogen</p>

**Hình 1.** Hình ảnh mô gan đại diện từng nhóm chuột thử nghiệm

#### 4. Kết luận

Viên nang Terkumin của Công ty Cổ phần Dược Danapha đã được thử nghiệm tác dụng bảo vệ gan trên mô hình gây độc cấp cho chuột nhắt trắng bằng paracetamol. Kết quả sinh hóa và mô bệnh học trên thực nghiệm cho thấy: viên nang Terkumin ở 3 mức liều 0,86; 1,72 và 3,45 viên/kg chuột/ngày (tương ứng với 3 mức liều 3,50; 7,01 và 14,02 viên/người/ngày) [4] có tác dụng hạn chế tổn thương tế bào gan do paracetamol liều cao gây ra thể hiện trên chỉ số men gan AST, ALT, bilirubin và cấu trúc mô học của gan. Tuy nhiên ở mức liều thấp (0,86 viên/kg chuột/ngày) tác dụng bảo vệ gan của nang Terkumin chưa triệt để. Ở mức liều trung bình và liều cao (1,72 và 3,45 viên/kg chuột/ngày) tác dụng bảo vệ gan của viên nang Terkumin tốt hơn so với liều thấp và tương đương với tác dụng bảo vệ gan của silymarin liều 100 mg/kg chuột/ngày.

#### Tài liệu tham khảo

1. Đỗ Thị Oanh, Phạm Thanh Kỳ, Nguyễn Trọng Thông, Phạm Thị Vân Anh (2014). Nghiên cứu tác dụng bảo vệ gan và chống oxy hóa của cao Sói Nhật trên thực nghiệm. *Tạp chí Dược học*. 54(462): 26-36.
2. El Morsy EM, Kamel R (2014). Protective effect of artichoke leaf extract against paracetamol-induced hepatotoxicity in rats. *Pharm Biol*. 53(2): 167-73.
3. Olaleye MT, Rocha BT. 2008. Acetaminophen-induced liver damage in mice: effects of some medicinal plants on the oxidative defense system. *Exp Toxicol Pathol*. 59(5): 319-27.
4. Sharma V1, McNeill JH. 2009. To scale or not to scale: the principles of dose extrapolation. *Br J Pharmacol*. 157(6): 907-21.
5. Somanawat K, Thong-Ngam D, Klaikeaw N. 2013. Curcumin attenuated paracetamol overdose induced hepatitis. *World J Gastroenterol*. 19(12): 1962-7.
6. Yakugaku Zasshi. (1990). Protective effects of various methanol extracts of crude drugs on experimental hepatic injury induced by carbon tetrachloride in rats. *Article in Japanese*. 110(12): 950-7.

#### SUMMARY

*In present study, Terkumin capsules manufactured by Danapha Pharmaceutical Joint Stock company were investigated for hepatoprotective effect using a model of paracetamol- induced hepatotoxicity in mice. Repeated administration of Terkumin (0.86, 1.72 and 3.45 capsules/kg) one a day significantly prevented the increase in alanine aminotransaminase (ALT), aspartate aminotransferase (AST) and total bilirubin induced by a high dose of paracetamol. In addition, Terkumin capsules showed highly protective effects on liver tissue structures in compared to the untreated group. These data suggest that Tekumin capsules may be useful for hepatic diseases.*



# SỬ DỤNG PHƯƠNG PHÁP SẮC KÝ LỎNG HIỆU NĂNG CAO TRONG TÁCH CÁC HỢP CHẤT ĐỐI QUANG

(Bài tổng hợp từ các nguồn tài liệu nước ngoài đã được công bố)

VŨ QUỲNH TRANG, TRẦN THỊ HỒNG ANH,  
TRẦN THÚY HẠNH, NGUYỄN THU PHƯƠNG

Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương

## 1. Tầm quan trọng của việc tách các hợp chất đối quang

Có ít nhất khoảng 40% dược chất trên thị trường được phẩm có tính hoạt quang như Lipitor (artovastatin), Zocor (simvastatin), Plavix (clopidogrel)... Trong đó một số lượng lớn vẫn tồn tại ở dạng racemic, dạng hỗn hợp các đồng phân quang học như Norvasc (amlodipin), Ogestro (lansoprazol)...[4].

Ngày nay, các đồng phân đối quang được xem như các chất riêng biệt có hoạt tính sinh học, tác dụng dược lý, dược động học và độc tính khác nhau. Một đồng phân có thể có hoạt tính điều trị nhưng chất đối quang của chúng có thể không có, cường độ yếu hơn hoặc gây ra những tác dụng không mong muốn. Ngay cả khi những tác dụng phụ không nghiêm trọng, thì những đồng phân bất hoạt vẫn chuyển hóa và tạo ra những chất không cần thiết cho cơ thể.

Một vài ví dụ như cặp đối quang của Naproxen (NSAID), đồng phân này có tác dụng hơn đồng phân kia tới 28 lần. Hoặc như một đồng phân của dopamin, thuốc điều trị Parkinson, có tác dụng trên các tế bào thần kinh và kiểm soát sự rung lắc trong khi đồng phân còn lại gây độc trên các tế bào thần kinh. Hoặc người ta hay nhắc tới thảm họa “Thalidomid” như một trong những ví dụ tiêu biểu nhất trong lịch sử phát triển của ngành Dược [1]. Tại thời điểm nó được kê đơn rộng rãi với tác dụng an thần, giảm các triệu chứng nghén cho phụ nữ có thai, hoạt chất này lại tồn tại ở dạng racemic mà người ta không biết rằng đồng phân (R) của thalidomid có tác dụng an thần trong khi đồng phân (S) lại gây quái thai. Nó đã để lại nỗi đau cho cả một thế hệ và đi vào lịch sử với tên gọi “thảm họa thalidomid” [2].

Có thể thấy rằng việc sử dụng đúng đồng phân có hoạt tính vừa giảm tác dụng phụ (trong trường hợp đồng phân còn lại gây ra tác dụng không mong muốn), vừa giảm một nửa liều đối với bệnh nhân, tránh lãng phí trong sản xuất.

Với những lợi ích rõ ràng như vậy, từ năm 1992, FDA và ủy ban châu Âu về thuốc đăng kí độc quyền

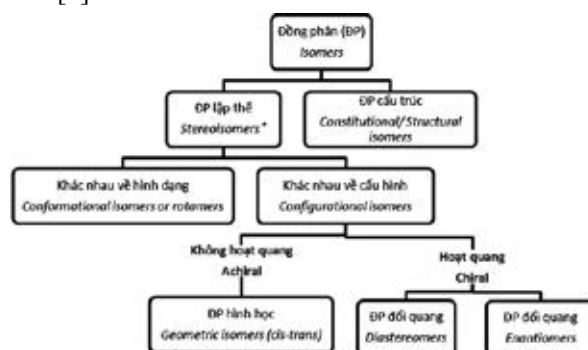
đã yêu cầu rằng mỗi chất có đồng phân đối quang phải được nghiên cứu một cách riêng rẽ trước khi quyết định đưa thuốc ra thị trường dưới dạng tinh khiết quang học hay dạng racemic. Yêu cầu này đã đòi hỏi mạnh mẽ các phương pháp tách các chất hoạt quang. Tuy nhiên việc tách các hoạt chất đối quang lại gặp rất nhiều khó khăn. Trong các phương pháp phân tách đồng phân đối quang, sắc ký lỏng cao áp (HPLC) là phương pháp được sử dụng phổ biến nhất do có thể tách được nhiều chất [6].

Vậy các đồng phân đối quang là gì? Những khó khăn khi tách chúng ra khỏi hỗn hợp? Nguyên tắc tách các đồng phân đối quang? Các loại pha tĩnh thường dùng để tách các đồng phân đối quang trong sắc ký lỏng? Chúng tôi sẽ trình bày các nội dung trên trong bài báo này.

## 2. Khái niệm các đồng phân đối quang

### 2.1. Đồng phân (isomers)

Là các chất có cùng công thức phân tử nhưng khác nhau về cấu trúc, chúng được phân loại theo sơ đồ ở Hình 1 [5].



Hình 1. Sơ đồ phân loại đồng phân

Stereoisomers\*: Đồng phân lập thể là các hợp chất cùng công thức phân tử nhưng khác nhau về cách sắp xếp trong không gian của các nguyên tử.

### 2.2. Tính hoạt quang (Chirality)

Những hợp chất hữu cơ có ít nhất 1 Carbon bất đối (C\*) là những hợp chất có tính hoạt quang. Bản thân từ

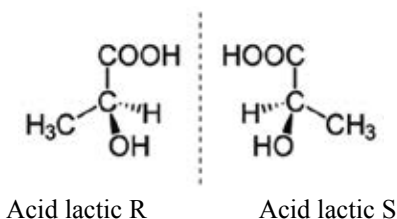
*Chirality* xuất phát từ từ “*Cheir*” trong tiếng Hy Lạp có nghĩa là bàn tay, tay trái (Sinister-S) và tay phải (Rectus-R) giống nhau nhưng không thể đặt trùng khít. Những chất có tính hoạt quang sẽ tạo ra các đồng phân khác nhau và thường đi theo cặp. Có hai loại đồng phân đối quang là Enantiomer và Diastereomer [5].

### 2.3. Enantiomer

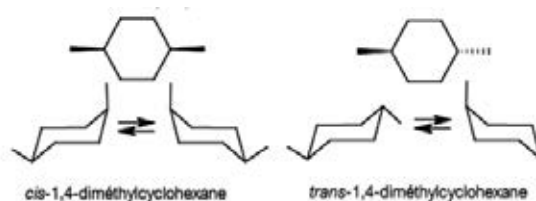
Là những đồng phân đối quang của nhau, giống nhau như hình ảnh của nhau qua gương, không thể đặt trùng khít (Hình 2). Những chất này có đặc điểm giống nhau về tính chất vật lý, hóa học nhưng có thể khác nhau về hoạt tính sinh học. Vì giống nhau như vậy nên các đồng phân này rất khó tách rời.

### 2.4. Diastereomer

Là những đồng phân đối quang của nhau nhưng hình ảnh của chúng không giống nhau như hình ảnh qua gương (Hình 3).



Hình 2. Ví dụ về các Enantiomer



Hình 3. Ví dụ về các Diastereomer

Những chất này có đặc điểm có ít nhất hai Carbon bất đối, chúng khác nhau về tính chất vật lý, hóa học ví dụ như điểm nóng chảy, tính tan, các phản ứng hóa học... do đó có thể tách riêng bằng các phương pháp vật lý.

Trong phạm vi bài báo này, chúng tôi chỉ đề cập tới việc tách các enantiomers theo các nội dung sau:

- Nguyên tắc cơ bản trong việc tách các enantiomers.
- Các chất chọn lọc với chất đối quang (Chiral selector) (các nhóm để tách) và phương pháp phân tách trực tiếp các đồng phân đối quang.
- Các pha tĩnh đối quang, CSP (Chiral stationary phase): các cột thông dụng, các chất phù hợp với cột....

### 3. Nguyên tắc cơ bản của chiral HPLC

Sở dĩ những hợp chất đối quang khó tách ra khỏi nhau là vì chúng giống nhau về cả tính chất vật lý, hóa học. Để tách riêng các đồng phân này có thể có hai cách là tách trực tiếp và tách gián tiếp [3].

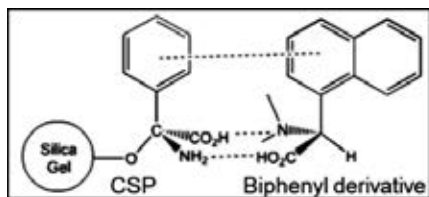
Tách gián tiếp là dùng các thuốc thử để tạo dẫn xuất rồi sau đó tách riêng từng đồng phân. Cách này đòi hỏi các thuốc thử tạo dẫn xuất cũng phải đảm bảo tính khiết quang học, phải đảm bảo rằng không xảy ra quá trình racemic hóa khi tạo dẫn xuất [6].

Hoặc có một cách khác đơn giản hơn để tách các đồng phân quang học là tách trực tiếp, dùng các chất

chọn lọc với các chất hoạt quang (chiral selector). Các chất chọn lọc với các chất hoạt quang là những chất có khả năng gắn chọn lọc với một đồng phân để tạo sự khác biệt giữa hai dạng đồng phân đối quang để từ đó có thể tách riêng chúng.

Trong phương pháp tách trực tiếp các chất hoạt quang, có thể có hai cách như sau: thêm các chất chọn lọc với các chất hoạt quang vào pha động trong trường hợp sử dụng pha tĩnh không hoạt quang. Hoặc cách thứ hai là có thể gắn các chất chọn lọc các chất hoạt quang vào pha tĩnh của cột, các pha tĩnh này được gọi là pha tĩnh hoạt quang (Chiral Stationary Phase – CSP). Để các chất chọn lọc hoạt quang (chiral selector) này liên kết với hoạt chất, cần ít nhất 3 loại trong các liên kết sau: liên kết hydro, tương tác cho – nhận điện tử  $\pi$ - $\pi$ , tương tác ion, tương tác lưỡng cực, tương tác phân cực, khả năng tạo phức, tương tác Van der Waals\*. Nếu chỉ có một trong các tương tác này sẽ không đủ để nhận biết các đồng phân đối quang do đó cần có thêm các liên kết khác [6].

Tương tác Van der Waals\* tạo nên bởi lực liên kết nội phân tử hoặc là lực nội nguyên tử gây ra một lực hút tạm thời gây ra giữa các lưỡng cực trong các phân tử không phân cực và các nguyên tử do sự phân bố bất đối xứng các electron nhờ sự di chuyển của chúng.



**Hình 4.** Ví dụ: Trong trường hợp này tồn tại các tương tác giữa các nhân thơm, giữa nhóm carboxylic - nhóm amin và liên kết hydro. Có thể thấy dẫn chất của biphenyl có 1 Carbon bất đối nên sẽ tồn tại hai dạng đồng phân quang học. Đồng phân R (hình vẽ) có sự sắp xếp các nhóm thể trong không gian phù hợp với CSP do đó sẽ tạo liên kết với chiral selector. Đồng phân còn lại do sự cản trở không gian sẽ không liên kết được với chiral selector. Do đó có thể tạo sự khác biệt và tách riêng chúng.

#### 4. Phương pháp thêm chất chọn lọc chất đối quang vào pha động

Trong trường hợp sử dụng pha tĩnh không đối quang, ta có thể tách các đồng phân đối quang của một chất bằng cách thêm một chất có khả năng gắn chọn lọc với một đồng phân đối quang để tách riêng chúng. Ví dụ trường hợp tách hai đồng phân đối quang của Levofloxacin, trong chuyên luận USP, ion  $\text{Cu}^{2+}$  được thêm vào pha động để tạo phức chọn lọc với đồng phân quay trái của levofloxacin và tách riêng đồng phân này bằng pha tĩnh C18 [1],[3].

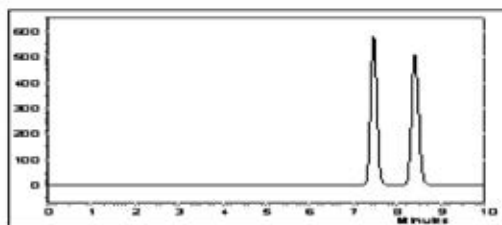
#### 5. Phương pháp sử dụng các loại pha tĩnh hoạt quang (CSP)

Phương pháp này sử dụng các chất chọn lọc chất đối quang gắn vào pha tĩnh để tăng khả năng tách của cột. Một số CSP thường sử dụng như dạng polymer tổng hợp từ carbohydrat, dạng Pirkle hay Brush, Cyclodextrin, pha tĩnh gồm các phân tử sinh học hay dạng pha tĩnh là các Protein,

##### 5.1. Dạng polymer tổng hợp từ carbohydrat

Thông dụng và phổ biến nhất trong dạng này là các polysaccharid. Những polysaccharid này thường là những dẫn chất của cellulose hoặc amylose, được bao trên nền silica. Những dẫn chất này có rất nhiều nhóm OH, đây là một nguồn dồi dào để tạo các liên kết hydro. Vòng no của polysaccharid có thể chi ưu tiên cho một enantiomer tạo liên kết, do đó ta sẽ tách được hai đồng phân. Những dạng cột này có thể dùng cho sắc ký pha thuận, sắc ký lỏng siêu tới hạn và sắc ký pha đảo. Hạn chế của loại cột này là không tương thích được với nhiều loại dung môi, pha động dùng trong trường hợp này đa phần là các dung môi không phân cực (ví dụ như hexan hay heptan), có thể thêm một dung môi phân cực như isopropanol hoặc ethanol để điều chỉnh. Cấu trúc của các chất này có khả năng ảnh hưởng tới thời gian lưu và độ phân giải của chất được tách [3].

Những cột hiện nay trên thị trường trong nhóm này như Chiralpak AD, AD-RH, AS, AS-RH và các cột Chiralcel OD, OD-RH, OJ, OJ-RH. Để khắc phục sự hạn chế về sử dụng pha động, những chiral selector polysaccharid này được gắn chặt trên nền silica, ví dụ như cột Chiralpak IA và IB, cho phép sử dụng được nhiều loại dung môi phân cực hơn.

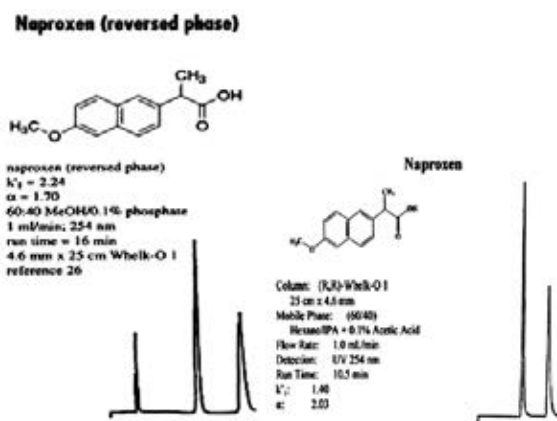


**Hình 5.** Ví dụ: tách Naproxen sử dụng cột Chiralpak AD-H, pha động Hexan/IPA/TFA (80:20:0,1), tốc độ dòng 1,0 ml/phút

##### 5.2. Dạng Pirkle hay Brush

Dạng pha tĩnh này hay còn được gọi là loại cho nhận (donor-acceptor type stationary phase). Các chiral selector thường là các chất có kích thước phân tử nhỏ được gắn vào nền silica. Những chất này có nhân thơm, có độ phân cực cao và những nhóm tạo được liên kết hydro, thường sử dụng dinitrobenzoylphenyl (DNBP) và các dẫn chất của nó. Những hoạt chất được phân tách ở đây cũng phải có nhân thơm trong cấu trúc (ví dụ như nhóm thuốc NSAIDs). Liên kết nổi bật giữa pha tĩnh và hoạt chất ở đây là liên kết  $\pi$ - $\pi$  vì cả hai đều có mật độ liên kết  $\pi$  đậm đặc. Loại pha tĩnh này hầu hết được dùng cho sắc ký pha thuận và sắc ký siêu tới hạn, rất ít dùng cho sắc ký pha đảo và chỉ dùng cho các chất có nhân thơm [3].

Những cột loại này trên thị trường như là cột Whelk-O 1, Whelk-O 2, ULMO, Phenomenex Chirex.

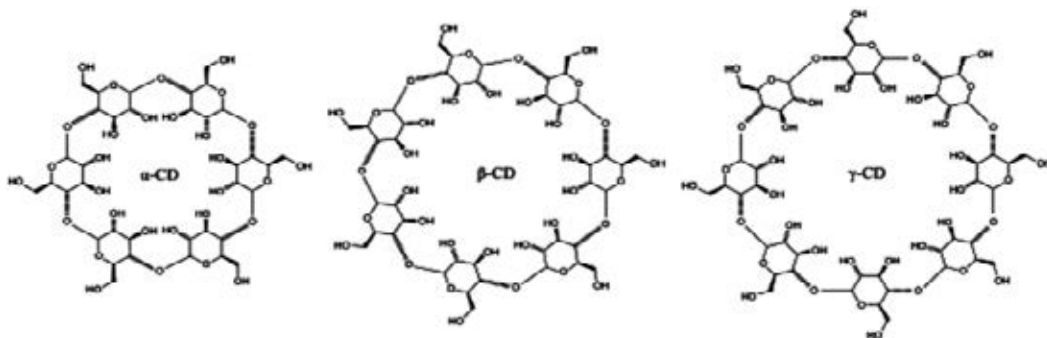


**Hình 6.** Ví dụ về việc sử dụng cột loại Pirkle để tách naproxen dùng pha đảo và pha thuận.

### 5.3. Cyclodextrin

Cyclodextrin là phân tử có tính hoạt quang được tạo thành bởi ít nhất 6 phân tử glucose liên kết với nhau tạo thành vòng tròn. Dựa vào số lượng phân tử glucose mà người ta phân loại cyclodextrin:  $\alpha$ - cyclodextrin có 6,  $\beta$ - cyclodextrin có 7 và  $\gamma$ - cyclodextrin có 8 phân tử glucose. Cyclodextrin với ít hơn 6 hoặc nhiều hơn 8 phân tử glucose thì không bền vững. Cyclodextrin tương tác với các hoạt chất cần tách bằng cách tạo phức. Tất cả các phần của hoạt chất cần phân tích sẽ “lọt” vào bên trong vòng cyclodextrin để tạo phức dựa trên tương tác của phần không phân cực của hoạt chất với phần không phân cực của cyclodextrin. Do đó hạn chế của loại pha tĩnh này là các chất phân tích phải có các nhóm kỵ nước và có vòng thơm để vào được bên trong vòng cyclodextrin [3].

Các cột loại này bao gồm: ORpak CDA ( $\alpha$ ), ORpak CDB ( $\beta$ ), ORpak CDC ( $\gamma$ ) của JM Sciences.



Hình 7. Các loại cyclodextrin

### 5.4. Pha tĩnh gồm các phân tử sinh học

Loại pha tĩnh này được cấu tạo từ các phân tử macrolide gắn trên nền silica. Các chất này có rất nhiều “trung tâm” có tính hoạt quang với nhiều “lỗ hổng” cho các chất phân tích gắn vào và tương tác. Các tương tác thường thấy ở loại này là tương tác  $\pi$ - $\pi$ , liên kết hydro, tương tác ion, khả năng tạo phức. Dạng pha tĩnh này dùng trong sắc ký pha đảo, pha thuận, cho các chất hữu cơ phân cực.

Các cột thuộc dạng này bao gồm: Chirobiotic V và V2 (Vancomycin), Chirobiotic T và T2 (Teicoplanin), Chirobiotic R (Ristocetin A) của Astec.

### 5.5. Dạng pha tĩnh là các Protein

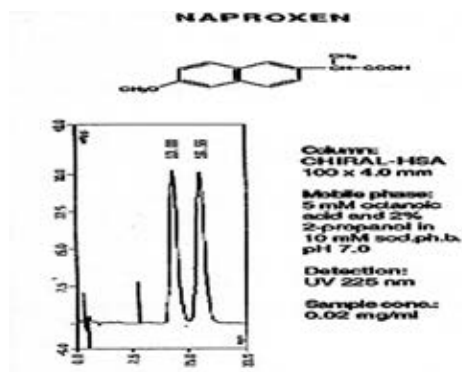
Dạng này được cấu tạo từ các phân tử protein tự nhiên gắn vào silica. Các protein có nhiều trung tâm có tính hoạt quang và tương tác mạnh với các chất phân tích hoạt quang có phân tử nhỏ. Các tương tác thường thấy của dạng này bao gồm tương tác của các nhóm kỵ nước, tương tác tĩnh điện và liên kết hydro. Hạn chế của loại pha tĩnh này là chỉ dùng cho sắc ký pha đảo, chất phân tích phải có khả năng ion hóa như các amin hay acid [3].



Naproxen

Hình 8. Tách đồng phân naproxen \*

(\*): Cột CHIROBIOTIC V (250x4,6 mm);  
Pha động: THF – 0,1% TEAA(10:90), pH 7;  
Tốc độ 1,0 ml/min; Nhiệt độ: 25°C, phát hiện ở bước sóng 254 nm; C mẫu thử 5 mg/ml.



Hình 9. Phân tích Naproxen \*\*

(\*\*): Sử dụng pha tĩnh là các protein tự nhiên (Human Serum Albumin CSP)

Các cột trên thị trường bao gồm: Chiral AGP ( $\alpha$ -glycoprotein) của ChromTech, HSA (human serum albumin) của ChromTech và BSA (bovine serum albumin) của Regis Technologies.

## 6. Kết luận

Trong khuôn khổ của bài viết chúng tôi đã đề cập đến những khái niệm cơ bản nhất về lĩnh vực tuy không còn mới mẻ trên thế giới nhưng vẫn chưa quen thuộc ở Việt Nam: lĩnh vực dùng HPLC để tách những hợp chất đồng phân đối quang (chiral HPLC). Dựa vào cơ chế tách của từng loại cột chúng ta sẽ có cơ sở lựa chọn cột phù hợp cho từng loại hợp chất, để giúp ngành dược nói chung và ngành kiểm nghiệm dược nói riêng kiểm soát chất lượng thuốc tốt hơn.

### Tài liệu tham khảo

1. Christine Aurigemma (2006), *Chiral Separation: A Tutorial*.
2. J.K.Aronson (2006), *Meyler's side effect of drug, fifteenth edition*, Elsevier B.V.
3. Gerald Gubitz and Martin G. Schmid (2004), *Chiral separations Method and protocol*, Humana Press.
4. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3614593/>
5. <https://www.khanacademy.org/science/organic-chemistry/stereochemistry-topic>.
6. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16444017>.
7. United States Pharmacopoeia 38 (2016).

### SUMMARY

*The concept of chiral isn't new one. The discovery of chiral with their opposite pharmacological activity (benefits/interest and harmful) in several active substances putting important question about Chiral separation in analysing and drug quality control.*

*Chromatographic techniques as the High-performance liquid chromatography have been used for enantiomer separation for about two decades. It shows to be powerful to chromatographic method.*

*This review gives a short overview of basic concepts in chiral and chiral separation principles in HPLC and their application.*

## **DANH MỤC THUỐC KHÔNG ĐẠT CHẤT LƯỢNG ĐÃ ĐƯỢC BỘ Y TẾ XỬ LÝ TỪ 01/12/2016 ĐẾN 31/5/2017**

*HÀ THỊ MINH CHÂU  
Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương*

Để tăng cường giám sát các cơ sở sản xuất, kinh doanh trong việc thực hiện thu hồi thuốc vi phạm chất lượng, đồng thời giúp cho các đồng nghiệp có thêm thông tin về những hoạt chất và các tên thuốc cần lưu ý về chất lượng, chúng tôi tập hợp danh mục các thuốc vi phạm chất lượng từ 01/12/2016 đến 31/5/2017 mà Bộ Y tế đã ra văn bản thông báo thuốc giả, thuốc bị thu hồi, rút số đăng ký của thuốc và đình chỉ lưu hành: 06 thuốc bị đình chỉ và thu hồi, rút số đăng ký của 28 thuốc.

Chi tiết về danh mục thuốc xin xem ở Bảng dưới đây:

**Danh mục đình chỉ lưu hành thuốc từ ngày 01/12/2016 đến ngày 31/5/2017**

STT	Tên thuốc	Số lô	Ngày sản xuất	Hạn dùng	Số đăng ký	Tên cơ sở sản xuất	Tên cơ sở đơn vị nhập khẩu	Chỉ tiêu không đạt	Văn bản xử lý	Hình thức xử lý
1	Viên nén Miratel 40 (Telmisartan 40mg)	MIV05		05/02/2018	VN-12172-11	Công ty Microcle Labs (P) Ltd. India	Công ty Cổ phần xuất nhập khẩu Y tế TP. Hồ Chí Minh (Yteco)	Khối lượng trung bình viên và độ hòa tan	Công văn: số 253/QLD-CL ngày 13/01/2017	Đình chỉ lưu hành và thu hồi toàn quốc
2	Viên nang cứng Franlex 500 (Cephalexin 500mg)	16005		07/11/2019	VD-15916-11		Công ty Liên doanh Dược phẩm Éloge France Việt nam	Độ hòa tan	Công văn: số 1630/QLD-CL ngày 16/02/2017	Đình chỉ lưu hành và thu hồi toàn quốc
3	Viên nén Enalapril 10 mg (Enalapril maleat 10mg)	03/060815		06/08/18	VD-15254-11		Công ty Cổ phần Dược Trung ương 3	Tạp chất liên quan	Công văn: số 2360/QLD-CL ngày 01/03/2017	Đình chỉ lưu hành và thu hồi toàn quốc
4	Viên nén bao tan trong ruột Esalep (Esomeprazole 40mg)	0416	19/02/1016	18/02/2018	VN-12168-11	Công ty Reman Drug Laboratories Ltd. Bangladesh	Công ty Cổ phần xuất nhập khẩu Thương mại Dược phẩm Phú Long	Độ hòa tan	Công văn: số 2695/QLD-CL ngày 09/03/2017	Đình chỉ lưu hành và thu hồi toàn quốc
5	Viên nang Ampicilin 500	270516		13/05/19	VD-16903-12		Công ty Cổ phần Dược phẩm Hà Tây	Định lượng	Công văn: số 2867/QLD-CL ngày 14/03/2017	Đình chỉ lưu hành và thu hồi toàn quốc
6	Viên nén Berberin BM	252015	3/10/2015	3/10/2017	V1314-H12-10		Công ty Cổ phần Dược phẩm Hà Nam	Định lượng	Công văn: số 4523/QLD-CL ngày 07/04/2017	Đình chỉ lưu hành và thu hồi toàn quốc

**Danh mục thuốc bị rút số đăng ký từ ngày 01/12/2016 đến ngày 31/05/2017**

STT	Tên thuốc	Số đăng ký	Tên cơ sở sản xuất	Tên cơ sở đăng ký	Văn bản xử lý	Hình thức xử lý
1	Propido	VN-4961-10	M/S Prayash Healthcare Pvt. Ltd	Ambatal Sarabhai Enterprises Ltd	Quyết định số 616/QĐ-QLD ngày 28/12/2016	Rút SDK, đình chỉ lưu hành và thu hồi
2	Praymetfo	VN-12148-11	Như trên	Như trên	Như trên	Như trên
3	Silysan	VN-12835-11	Như trên	Như trên	Như trên	Như trên
4	Lartim	VN-13477-11	Như trên	Như trên	Như trên	Như trên
5	Foloup	VN-14729-12	Như trên	Như trên	Như trên	Như trên
6	Praymed Tablet	VN-15524-12	Như trên	Như trên	Như trên	Như trên
7	Omeprazole - 20 mg	VN-16989-13	Như trên	CT Cổ phần Cá sấu vàng	Như trên	Như trên
8	Praycide 100	VN-17318-13	Như trên	Như trên	Như trên	Như trên
9	Praycide 200	VN-17319-13	Như trên	Như trên	Như trên	Như trên
10	Ketorac	VN-5167-10	Như trên	CT TNHH Dược phẩm Tân Thịnh	Như trên	Như trên
11	Praril	VN-5168-10	Như trên	Như trên	Như trên	Như trên
12	Cexil	VN-19077-15	Như trên	CT TNHH Dược phẩm VNP	Như trên	Như trên
13	Freemove	VN-19430-15	Như trên	Như trên	Như trên	Như trên
14	Nocough	VN-19596-16	Như trên	Như trên	Như trên	Như trên
15	Ginful	VN-17685-14	Như trên	CT TNHH Dược phẩm Lê Khải	Như trên	Như trên
16	Vitamom	VN-15382-12	Như trên	CT TNHH Thương mại Dược phẩm Việt Á	Như trên	Như trên
17	Zulipid 10	VN-17403-13	Như trên	CT TNHH TM Dược phẩm quốc tế Minh Việt	Như trên	Như trên
18	Dupraz 20	VN-19458-15	Như trên	CT TNHH Dược phẩm Sana	Như trên	Như trên
19	Prakuff	VN-19633-16	Như trên	CT TNHH Dược phẩm Sana	Như trên	Như trên
20	Pintenol	VN-19925-16	Như trên	CT TNHH Dược phẩm Sana	Như trên	Như trên
21	Arcoxia 30mg	VN-16833-13	Frosst Iberica S.A	Merck Sharp & Dohme (Asia) Ltd.	Quyết định số 169/QĐ-QLD ngày 05/05/2017	Rút SDK, đình chỉ lưu hành và thu hồi
22	Fortzaar 100/25	VN-16837-13	Merck Sharp & Dohme Ltd.	Như trên	Như trên	Như trên
23	Kastrazol	QLĐB-495-15	Công ty Cổ phần BV Pharma	Công ty Cổ phần BV Pharma	Như trên	Như trên
24	Imetoxim_UL 1g	VD-22159-15	Chi nhánh 3 - Công ty Cổ phần Dược phẩm Imexpharm tại Bình Dương	Công ty Cổ phần Dược phẩm Imexpharm	Như trên	Như trên
25	Imezidim_UL 1g	VD-22160-15	Như trên	Công ty Cổ phần Dược phẩm Imexpharm	Như trên	Như trên
26	Livpar Inij	VN-20067-16	Dai Han Pharm. Co., Ltd	Pharmix corporation	Như trên	Như trên
27	Xenical	VN-18892-15	Roche S.p.A	F. Hoffmann-La Roche Ltd.	Như trên	Như trên
28	Cubicin	VN-17837-14	Hospira, Inc.	Astra Zeneca Singapore Pte., Ltd.	Như trên	Như trên

# MỤC LỤC

Trang

- **Nghiên cứu khoa học**
  - Định lượng Sucrose octasulfat trong chế phẩm thuốc uống có chứa dược chất Sucralfat, Ranitidin và Bismuth kali citrat bằng phương pháp HPLC với detector chỉ số khúc xạ (RI).  
*LÊ THỊ THIÊN HUƠNG, TRẦN THÚY HẠNH, PHẠM HỒNG MINH* 1
  - Xây dựng phương pháp xác định Aflatoxin B1 trong dược liệu bằng LC-MS/MS.  
*LÊ ĐÌNH CHI, TRẦN CAO SƠN, LÊ THỊ HỒNG HẢO* 5
  - Nghiên cứu định lượng Indapamid trong huyết tương người bằng LC-MS/MS phục vụ đánh giá tương đương sinh học.  
*LÊ THỊ LA, TẠ MẠNH HÙNG, ĐOÀN CAO SƠN* 10
  - Nghiên cứu xác định Methylendioxyamphetamin trong nước tiểu bằng sắc ký khí khối phổ.  
*PHẠM QUỐC CHINH, PHẠM THỊ THU HẠ, TRẦN VIỆT HÙNG, NGUYỄN TIẾN VŨNG* 15
  - Đánh giá tác dụng bảo vệ gan trên thực nghiệm của chế phẩm Terkumin.  
*NGUYỄN THỊ LIÊN, PHÙNG CHẤT* 19
- **Thông tin khoa học - Tin tức**
  - Sử dụng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao trong tách các hợp chất đối quang.  
*VŨ QUỲNH TRANG, TRẦN THỊ HỒNG ANH, TRẦN THÚY HẠNH, NGUYỄN THU PHƯƠNG* 25
  - Danh mục thuốc không đạt chất lượng đã được Bộ Y tế xử lý từ tháng 12/2016 đến tháng 5/2017.  
*HÀ THỊ MINH CHÁU* 29

# CONTENTS

Page

- **Scientific researches**
  - Quantitation of Sucrose octasulfate in oral preparations containing Sucralfate, Ranitidine and Bismuth potassium citrate by HPLC method with refractive index detector (RI).  
*LÊ THỊ THIÊN HUƠNG, TRẦN THÚY HẠNH, PHẠM HỒNG MINH* 1
  - Development of LC-MS/MS method to determine Aflatoxin B1 in herbal medicines.  
*LÊ ĐÌNH CHI, TRẦN CAO SƠN, LÊ THỊ HỒNG HẢO* 5
  - Study on determination of Indapamide in human plasma by LC-MS/MS for bioequivalence assessment.  
*LÊ THỊ LA, TẠ MẠNH HÙNG, ĐOÀN CAO SƠN* 10
  - Study on determination of Methylendioxyamphetamin in urine by Gas Chromatography - Mass Spectrometry.  
*PHẠM QUỐC CHINH, PHẠM THỊ THU HẠ, TRẦN VIỆT HÙNG, NGUYỄN TIẾN VŨNG* 15
  - Evaluation of protective effect on liver of Terkumin capsules preparations.  
*NGUYỄN THỊ LIÊN, PHÙNG CHẤT* 19
- **Technical information – News**
  - Using High-Performance Liquid Chromatography in the separation of enantiomer substances.  
*VŨ QUỲNH TRANG, TRẦN THỊ HỒNG ANH, TRẦN THÚY HẠNH, NGUYỄN THU PHƯƠNG* 25
  - Substandard pharmaceuticals recalled from December 2016 to May 2017 on decision of Ministry of Health.  
*HÀ THỊ MINH CHÁU* 29