

XÂY DỰNG, THẨM ĐỊNH PHƯƠNG PHÁP ĐỊNH LƯỢNG TOLPERISON HYDROCLORID TRONG VIÊN NÉN BẰNG HPLC

NGUYỄN THU PHƯƠNG, TRẦN THỊ HỒNG ANH
Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương

Từ khóa: Tolperison hydroclorid, định lượng, HPLC, thẩm định phương pháp phân tích

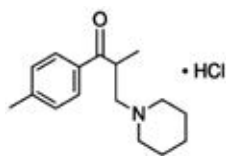
1. Đặt vấn đề

Tolperison hydroclorid có tên khoa học là 2-methyl-1-(4-methylphenyl)-3-piperidin-1-ylpropan-1-on hydroclorid.

Công thức phân tử: $C_{16}H_{23}NO \cdot HCl$

Khối lượng phân tử 281,83

Công thức cấu tạo:



Tolperison hydroclorid là thuốc có tác dụng giảm trương lực cơ vân, giãn mạch ngoại vi được dùng trong các trường hợp bệnh lý thần kinh kèm triệu chứng co rút cơ như co cơ sau viêm não, chứng liệt tủy sống co thắt, liệt nửa người, co cứng cơ do bệnh Parkinson. Các bệnh khác như xơ cứng động mạch gây tắc, bệnh Raynaud, xanh tím đầu chi [2]. Trên thị trường hiện nay có các chế phẩm chứa hoạt chất trên như Mydocalm của Gedeon Richter, Jedorazon tabs của nhà sản xuất NEW-New Gene Pharm Inc, ngoài ra có Topermak 150, Topermak 50 của Công ty Cổ phần Dược Đồng Nai.

Tuy nhiên, trong các Dược điển Mỹ, Anh, Nhật và Việt Nam hiện hành đều chưa có chuyên luận viên nén tolperison hydroclorid, chỉ trong Dược điển Nhật XVI có chuyên luận nguyên liệu tolperison hydroclorid. Do đó, việc xây dựng tiêu chuẩn cho chế phẩm viên nén tolperison hydroclorid là cần thiết để đáp ứng yêu cầu xây dựng tiêu chuẩn cơ sở và góp phần nâng cao khả năng kiểm tra chất lượng thuốc. Trong khuôn khổ bài báo này, chúng tôi muốn trình bày việc xây dựng và thẩm định quy trình phân tích định tính, định lượng tolperison hydroclorid trong chế phẩm thuốc viên nén bao film.

2. Thực nghiệm

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

2.1.1. Thiết bị và dụng cụ

Đã được hiệu chuẩn theo ISO/IEC 17025 bao gồm:

- Máy sắc ký lỏng Water với detector DAD;
- Cân phân tích Mettler Toledo AG245, độ chính xác 0,01 mg;
- Máy lắc siêu âm Branson;
- Cột Phenomenex RP18 (25 cm × 4,6 mm), 5 μm;
- Bộ lọc dùng cho sắc ký;
- Các dụng cụ thủy tinh: bình định mức, pipet chính xác và ống đong...

2.1.2. Hóa chất, dung môi và chất chuẩn

- Kali dihydrophosphat, triethylamin và acid phosphoric loại tinh khiết phân tích;
- Methanol, acetonitril và nước loại dùng cho sắc ký lỏng;
- Chất chuẩn: Tolperison.HCl, NSX: Sigma, SKS: K89274N, hàm lượng 99,80% $C_{16}H_{23}NO \cdot HCl$ (nguyên trạng).

2.2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Đối tượng nghiên cứu

- Viên nén bao film Tolperison hydroclorid, Lô SX: 001, NSX: 09/01/2017, HD: 08/01/2020, Công ty Cổ phần Dược phẩm Phúc Vinh.

Công thức bào chế 1 viên nén bao film chứa:

Tolperison hydroclorid 50 mg

Tá dược vừa đủ (KLTB viên = 154,53 mg)

- **Mẫu placebo:** Là mẫu giả dược có thành phần giống mẫu thử nhưng không có tolperison hydroclorid.

2.2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.2.1. Điều kiện sắc ký [1],[4],[5]

- Cột Phenomenex Rp 18 (250 x 4,6 mm, 5 μm)
- Detector UV: 259 nm
- Tốc độ dòng: 1,0 ml/phút
- Thể tích tiêm: 20 μl
- Độ pH 3,65: Hòa tan 1,7 g kali dihydrophosphat trong 800 ml nước cất, thêm 8 ml triethylamin, pha loãng với nước vừa đủ 1000 ml, khuấy đều. Điều chỉnh pH về 3,65 bằng acid phosphoric và lọc qua màng lọc 0,45 μm.
- Pha động: Acetonitril - đệm pH 3,65 (30 : 70)

2.2.2.2. Phương pháp xử lý mẫu [4]

- **Dung dịch chuẩn:** Cân chính xác khoảng 25,0 mg tolperison hydroclorid chuẩn vào bình định mức 50 ml, thêm 35 ml methanol, lắc siêu âm để hòa tan, pha loãng với methanol đến vạch, lắc đều. Hút chính xác 5,0 ml dung dịch trên vào bình định mức 50 ml, pha loãng với pha động đến vạch, lắc đều, lọc qua màng lọc 0,45 μm .

- **Dung dịch thử:** Cân chính xác một lượng bột thuốc tương ứng với 25,0 mg tolperison hydroclorid vào bình định mức 50 ml, thêm khoảng 35 ml methanol, lắc siêu âm để hòa tan, pha loãng với methanol đến vạch, lắc đều. Hút chính xác 5,0 ml dung dịch trên vào bình định mức 50 ml, pha loãng với pha động đến vạch, lắc đều, lọc qua màng lọc 0,45 μm .

- **Dung dịch placebo:** Cân 52,3 mg mẫu placebo vào bình định mức 50 ml, thêm khoảng 35 ml methanol, lắc siêu âm để hòa tan, thêm vừa đủ thể tích với cùng dung môi, lắc đều. Hút 5,0 ml dung dịch trên và pha loãng vừa đủ 50 ml bằng pha động, lắc đều, lọc qua màng lọc 0,45 μm .

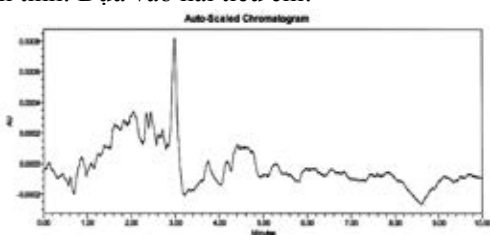
Tiến hành tiêm lần lượt các dung dịch placebo, dung dịch chuẩn, dung dịch thử vào hệ thống sắc ký. Ghi lại sắc ký đồ và xác định đáp ứng của các pic chính trên sắc ký đồ thu được.

2.2.2.3. Thẩm định phương pháp [3]

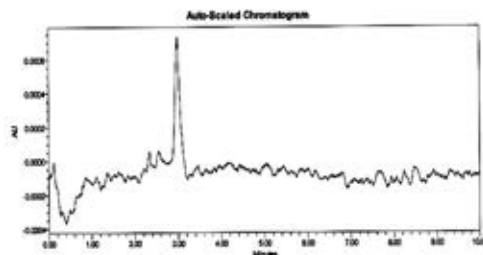
Tiến hành thẩm định phương pháp phân tích với các chỉ tiêu độ đặc hiệu, độ tuyến tính, độ đúng, khoảng xác định, độ lặp lại và độ chính xác trung gian.

2.2.2.4. Đánh giá kết quả

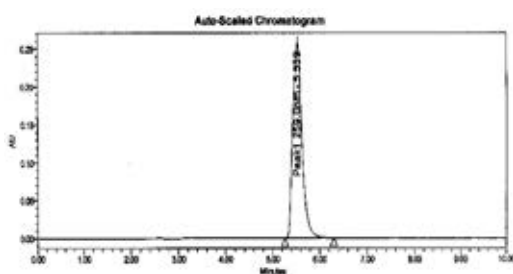
- **Định tính:** Dựa vào hai tiêu chí:



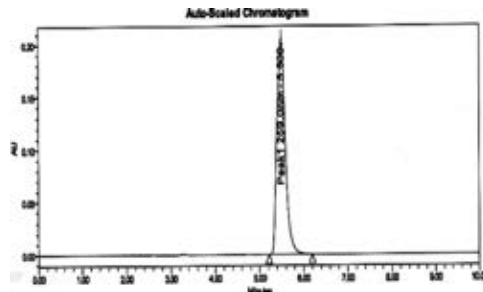
Hình 1. Sắc ký đồ của mẫu trắng



Hình 2. Sắc ký đồ của dung dịch placebo



Hình 3. Sắc ký đồ của dung dịch chuẩn



Hình 4. Sắc ký đồ của dung dịch thử

+ **Thời gian lưu:** So sánh thời gian lưu của pic thu được từ sắc ký đồ của dung dịch thử với thời gian lưu của pic tolperison hydroclorid thu được từ dung dịch chuẩn.

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

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

3. Kết quả và bàn luận

3.1. Độ đặc hiệu

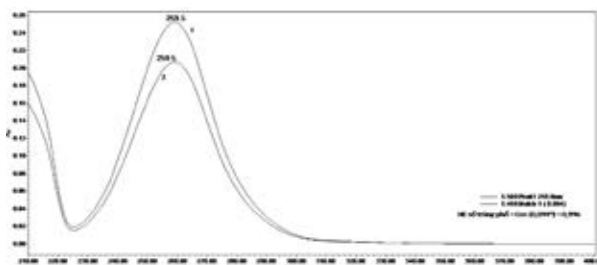
- Tiến hành sắc ký dung dịch placebo, dung dịch chuẩn tolperison hydroclorid và dung dịch thử theo quy trình phân tích.

- Trên các sắc ký đồ thu được, mẫu trắng không cho đáp ứng pic, dung dịch placebo không thấy xuất hiện pic nào có thời gian lưu tương ứng với thời gian lưu của pic chính trên sắc ký đồ của dung dịch chuẩn.

- Dung dịch thử cho 1 pic chính có thời gian lưu khoảng 5,5 phút tương ứng với thời gian lưu của pic chính trên sắc ký đồ của dung dịch chuẩn.

- Các pic tolperison hydroclorid của dung dịch chuẩn và thử đều tinh khiết, hệ số tinh khiết của cả 2 pic đều là 1,000; hệ số trùng phổ UV-VIS của pic tolperison hydroclorid của dung dịch chuẩn và thử là 0,996.

Kết quả được thể hiện ở Hình 1, Hình 2, Hình 3, Hình 4 và Hình 5.



Hình 5. Trùng phổ UV-VIS pic tolperison hydroclorid của dung dịch thử và chuẩn,
(1): phổ UV-VIS pic tolperison hydroclorid của dung dịch thử, (2): phổ UV-VIS pic tolperison hydroclorid của dung dịch chuẩn

3.2. Tính thích hợp của hệ thống sắc ký

Sử dụng dung dịch chuẩn trong phần thử độ đặc hiệu. Tiến hành sắc ký dung dịch chuẩn 06 lần với những điều kiện như mô tả ở quy trình phân tích định lượng và ghi lại thời gian lưu, diện tích pic, kết quả thể hiện trong Bảng 1.

Bảng 1. Kết quả kiểm tra tính thích hợp của hệ thống sắc ký

Stt	Thời gian lưu (phút)	Diện tích pic (mAU.s)
1	5,539	3411914
2	5,534	3401917
3	5,532	3408190
4	5,526	3405820
5	5,522	3404023
6	5,517	3413571
TB	5,528	3407573
RSD (%)	0,15	0,13

Phương pháp HPLC đã sử dụng có độ lặp lại cao, RSD của diện tích pic là 0,13% (< 2,0%); của thời gian lưu là 0,15% (< 1,0%). Pic có hệ số kéo đuôi $T = 1,2$ đạt yêu cầu ($T < 2,0$). Như vậy, phương pháp HPLC trên là phù hợp cho việc phân tích định tính, định lượng tolperison hydroclorid trong chế phẩm.

3.3. Khoảng tuyến tính

Khảo sát trên dãy dung dịch chuẩn tolperison hydroclorid đã được chuẩn bị với nồng độ từ 20 µg/ml đến 80 µg/ml, tương ứng từ 40% đến 160% so với nồng độ định lượng. Kết quả thu được thể hiện ở Bảng 2 và Hình 6.

Trong khoảng nồng độ tolperison hydroclorid từ 20 µg/ml đến 80 µg/ml, có sự tương quan tuyến tính chặt chẽ giữa nồng độ và diện tích pic với hệ số tương quan $r = 1,000$.

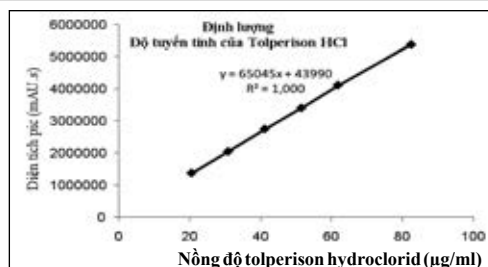
Bảng 2. Kết quả khảo sát khoảng tuyến tính

Stt	% so với nồng độ định lượng	Nồng độ Tolperison HCl (µg/ml)	Diện tích pic (mAU.s)
1	40	20,64	1370756
2	60	30,96	2045675
3	80	41,28	2747710
4	100	51,60	3400031
5	120	61,92	4112368
6	160	82,56	5382913

Phương trình hồi quy tuyến tính: $y = 65045x + 43990$

Hệ số tương quan : $r = 1,000$

% hệ số chặn ở nồng độ 100%: $Y = 1,29\%$



Hình 6. Đồ thị khảo sát khoảng tuyến tính

3.4. Độ đúng

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

Chuẩn bị các mẫu tự tạo: Cân chính xác một lượng tolperison hydroclorid chuẩn lần lượt tương ứng khoảng 20 mg; 25 mg và 30 mg tolperison hydroclorid và khoảng 52 mg placebo (lượng placebo của nửa viên) vào bình định mức 50 ml. Thêm khoảng 35 ml methanol, lắc siêu âm để hòa tan, thêm vừa đủ thể tích với cùng dung môi, lắc đều. Hút chính xác 5,0 ml dung dịch thu được chuyển vào bình định mức 50 ml, thêm pha động vừa đủ đến vạch, lắc đều, lọc qua màng lọc 0,45 µm. Thu được các dung dịch có nồng độ bằng 80%, 100%, 120% so với nồng độ định lượng. Mỗi mức nồng độ tiến hành 3 mẫu độc lập.

Dung dịch chuẩn: Là dung dịch chuẩn ở mục 3.1. Độ đặc hiệu.

Tiến hành sắc ký với những điều kiện như mô tả ở mục 2.2.2.1 và ghi lại diện tích pic, tính tỉ lệ thu hồi, kết quả được ghi lại trong Bảng 3.

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

Stt	% so với định lượng	Lượng cân mẫu placebo (mg)	Lượng chuẩn thêm vào (mg)	Diện tích pic (mAU.s)	Lượng chuẩn tìm lại (mg)	% thu hồi
1	80%	51,7	20,90	2769392	20,93	100,33
2	80%	52,1	20,85	2761476	20,87	100,28
3	80%	52,3	20,75	2769899	20,93	101,07
4	100%	51,9	25,90	3431534	25,93	100,31
5	100%	52,2	26,10	3441678	26,01	99,84
6	100%	52,5	26,25	3436034	25,96	99,11
7	120%	51,7	30,60	4071843	30,77	100,75
8	120%	52,3	30,75	4061232	30,69	100,00
9	120%	52,5	30,95	4067139	30,73	99,50
% Thu hồi trung bình = 100,13%; n = 9; RSD = 0,60%						

Tỉ lệ thu hồi của tolperison hydroclorid đạt từ 99,1% đến 101,1%, nằm trong giới hạn từ 98,0% đến 102,0% theo yêu cầu RSD đều < 2,0%. Như vậy phương pháp có độ thu hồi tốt.

3.5. Khoảng xác định

Khoảng xác định được suy ra từ kết quả phân đánh giá độ đúng và độ tuyến tính của phương pháp là từ 0,04 mg/ml đến 0,06 mg/ml (tương ứng 80% đến 120% nồng độ định lượng).

3.6. Độ chính xác

3.6.1. Độ lặp lại

Tiến hành định lượng tolperison HCl trong viên nén tolperison hydroclorid trên 06 dung dịch thử được chuẩn bị như mục 2.2.2.2 với các điều kiện sắc ký như mục 2.2.2.1. Kết quả được trình bày ở Bảng 4.

3.6.2. Độ chính xác trung gian

Kiểm nghiệm viên 2 tiến hành định lượng tolperison hydroclorid trên cùng một mẫu chế phẩm, vào một ngày khác. Cách tiến hành như phần độ lặp lại. Kết quả được trình bày ở Bảng 4.

Bảng 4. Kết quả đánh giá độ lặp lại và độ chính xác trung gian của phương pháp

Stt	KNV 1 Ngày: 09/3/2017			KNV 2 Ngày: 10/3/2017		
	Khối lượng mẫu thử (g)	Diện tích pic (mAU.s)	Hàm lượng %	Khối lượng mẫu thử (g)	Diện tích pic (mAU.s)	Hàm lượng %
1	0,0799	3429661	100,63	0,0793	3370998	99,93
2	0,0809	3445763	99,85	0,0795	3356566	99,25
3	0,0812	3441703	99,37	0,0784	3346539	100,34
4	0,0798	3405577	100,05	0,0786	3352425	100,26
5	0,0795	3407474	100,48	0,0815	3501871	101,00
6	0,0804	3443766	100,42	0,0785	3366012	100,79
	TB = 100,13%; n = 6; RSD = 0,47%			TB = 100,26%; n = 6; RSD = 0,63%		
TB = 100,20%; n = 12; RSD = 0,53%						

Kết quả cho thấy phương pháp định lượng có độ chính xác cao với độ lặp lại trong ngày là 0,47% và 0,63%; độ lặp lại giữa hai KNV là 0,53%, đều đạt yêu cầu RSD phải ≤ 2,0%.

4. Kết luận

Qua khảo sát chúng tôi đã xây dựng được quy trình định tính, định lượng tolperison hydroclorid trong chế phẩm viên nén bao film bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao. Quy trình đã xây dựng đặc hiệu với hoạt chất tolperison hydroclorid, có độ tương quan tuyến tính chặt chẽ giữa nồng độ và diện tích pic đáp ứng. Đồng thời quy trình phân tích này cũng có độ đúng, độ chính xác cao, thích hợp để định tính, định lượng thành phần tolperison

hydroclorid trong chế phẩm viên nén bao film. Mặt khác quy trình phân tích này có các điều kiện về trang thiết bị, máy móc, dung môi hóa chất phù hợp với đa số các phòng thí nghiệm. Dựa trên các kết quả thu được chúng tôi đề nghị có thể áp dụng quy trình đã xây dựng trên để định lượng tolperison hydroclorid trong các chế phẩm viên nén.

Tài liệu tham khảo

1. Bộ Y tế - Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương (2010), *Đảm bảo chất lượng thuốc và một số phương pháp kiểm nghiệm thuốc* (Tài liệu đào tạo nâng cao về kiểm nghiệm thuốc).
2. Tào Duy Cần (1994), *Tra cứu tổng hợp Thuốc và Biệt dược nước ngoài*, Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật, trang 1074.
3. ICH Harmonized Tripartite guidelines, Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2, 2005, 1-13.
4. Md. Saiful Islam, Md. Rafiquzzaman, Md. Taleb Hossain, Sukalyan Kumar Kundu, Taslima Akter, Md. Abul Kalam, "Development and validation of rp-hplc method for estimation of tolperisone hydrochloride in bulk and tablet dosage form", *World journal of pharmacy and pharmaceutical sciences*, Volume 5, Issue 2, 180-190.
5. The U.S Pharmacopoeial Convention (2015), *United states Pharmacopoeia* 38, "Chromatography <621> - Liquid chromatography".

SUMMARY

A simple HPLC method for identification and quantitation of Tolperisone hydrochloride in film-coated tablets was developed with chromatographic conditions including a column packed C18 (250 x 4.6 mm, 5 μ m), detector UV at 259 nm, flow rate was 1.0 ml/min, injection volume was 20 μ l and the mobile phase consisting acetonitrile and buffer pH 3.65 (30:70). The proposed method was validated as per ICH guidelines for the parameters: specificity, linearity, accuracy, repeatability and intermediate precision. As the results, this method can be employed for routine quality control analysis of Tolperisone hydrochloride in film-coated tablet dosage form.

(Ngày nhận bài: 16/11/2017 ; Ngày phản biện: 20/3/2018 ; Ngày duyệt đăng: 29/4/2018)

ĐỊNH LƯỢNG ĐỒNG THỜI PIRACETAM VÀ CINARIZIN TRONG PHÉP THỬ ĐỘ HÒA TAN BẰNG PHƯƠNG PHÁP HPLC

PHẠM HỒNG MINH, NGUYỄN THỊ HẰNG, TRẦN THÚY HẠNH
Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương

Từ khóa: Định lượng đồng thời, piracetam, cinarizin, HPLC, độ hòa tan.

1. Đặt vấn đề

Cinarizin là một thuốc kháng histamin (H1) có tác dụng chống tiết acetylcholin và an thần, ngoài ra cinarizin cũng được dùng trong các rối loạn tiền đình. Piracetam (dẫn xuất vòng của acid gamma amino-butyric, GABA) có tác dụng trực tiếp đến não để làm tăng hoạt động của vùng đoạn não (vùng não tham gia vào cơ chế nhận thức, học tập, trí nhớ, sự tỉnh táo và ý thức). Trên thị trường hiện nay đang lưu hành khá nhiều dược phẩm chứa đồng thời piracetam và cinarizin, thuốc được chỉ định trong trường hợp thiếu năng tuần hoàn não, suy giảm trí nhớ, kém tập trung, sa sút trí tuệ do nhồi máu não nhiều ổ; các triệu chứng của rối loạn tiền đình như ù tai, chóng mặt.

Hiện nay trong một số dược điển [1],[4],[5],[6] mới chỉ có chuyên luận dược chất cinarizin/piracetam và thành phẩm dạng đơn thành phần. Phần lớn các tiêu chuẩn cơ sở của thành phẩm chứa cả 2 dược chất trên đều chưa có phương pháp định lượng đồng thời hai hoạt chất này, đặc biệt là trong phép thử độ hòa tan (hoặc chỉ

thử độ hòa tan của cinarizin, hoặc thử độ hòa tan của cả hai hoạt chất nhưng với hai hệ sắc ký khác nhau). Do môi trường thử độ hòa tan khác biệt nhiều so với pha động, bước sóng phát hiện thấp, pic piracetam ra sớm nên thường bị nhiễu bởi pic của tá dược và dung môi. Để khắc phục nhược điểm trên, chúng tôi đã tiến hành nghiên cứu, khảo sát thay đổi điều kiện sắc ký, dung môi pha mẫu để đưa ra phương pháp định lượng đồng thời hai hoạt chất piracetam và cinarizin trong phép thử độ hòa tan bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao pha đảo với detector DAD đảm bảo độ chính xác, tin cậy, và tiến hành nhanh chóng.

2. Thực nghiệm và kết quả

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

2.1.1. Thiết bị, dụng cụ:

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

- Máy HPLC Shimadzu UFLC và LC-20A với detector DAD;
- Cột sắc ký Apollo C18 (250 x 4,6 mm; 5 μ m);
- Máy thử độ hòa tan Pharmatest;
- Cân phân tích Mettler Toledo MS 105 có độ chính xác 0,01 mg;
- Bộ lọc dùng cho sắc ký với màng lọc 0,45 μ m;
- Các dụng cụ thủy tinh chính xác: Bình định mức, pipet.

2.1.2. Chất chuẩn

Chất chuẩn Piracetam, hàm lượng 99,81% nguyên trạng; SKS: WS.0113291.01 (Chuẩn làm việc của Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương).

Chất chuẩn Cinarizin, hàm lượng 100,08% (khan); ẩm 0,04%; SKS: 0103171 (Chuẩn ĐDVN của Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương).

2.1.3. Hóa chất thuốc thử

- Acetonitril loại dùng cho HPLC (Merck - Germany);
- Kali dihydrophosphat loại PA (Scharlau - Spain);
- Triethylamin loại PA (Scharlau - Spain);
- Acid hydrochloric loại PA (Merck - Germany);
- Nước RO.

2.2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Đối tượng nghiên cứu

- Viên nang Stufort cap do Công ty Cổ phần Dược phẩm Phương Đông sản xuất, công thức bào chế: Piracetam 400 mg; Cinarizin 25 mg; Lactose monohydrat 55 mg; Aerosil 5 mg; Magnesi stearat 15 mg.
- Mẫu placebo MT-0: Gồm các thành phần theo công thức bào chế nhưng không có piracetam và cinarizin.
- Mẫu placebo MT-1: Gồm các thành phần theo công thức bào chế nhưng không có piracetam.
- Mẫu placebo MT-2: Gồm các thành phần theo công thức bào chế nhưng không có cinarizin.

2.2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.2.1. Điều kiện hòa tan

- Thiết bị: Giỏ quay.
- Môi trường hòa tan: 900 ml dung dịch HCl 0,1 N.
- Tốc độ quay: 100 vòng/phút.
- Thời gian: 45 phút.

2.2.2.2. Điều kiện sắc ký

* Pha động:

- Pha động A: Acetonitril - dung dịch kali dihydrophosphat 0,05 M - triethylamin (30:70:0,2). Điều chỉnh pH tới 3,0 bằng acid phosphoric.

- Pha động B: Acetonitril - dung dịch kali dihydrophosphat 0,05 M - triethylamin (60:40:0,2). Điều chỉnh pH tới 3,0 bằng acid phosphoric.

Thời gian	Pha động A	Pha động B
0 phút	70%	30%
3 phút	0%	100%
7 phút	0%	100%
8 phút	70%	30%

* Cột Apollo RP 18 (250 x 4,6 mm; 5 μ m).

* Tốc độ: 2,0 ml /phút.

* Detector: 227 nm.

* Thể tích tiêm: 50 μ l.

2.2.2.3. Phương pháp xử lý mẫu

* *Dung dịch thử*: Sau thời gian hòa tan quy định, lấy một phần dung dịch hòa tan, lọc, bỏ 20 ml dịch lọc đầu. Pha loãng 5,0 ml dịch lọc thành 25,0 ml với pha động. Lọc qua màng lọc 0,45 μ m.

* *Dung dịch chuẩn*:

- *Dung dịch chuẩn cinarizin*: Cân chính xác khoảng 27,7 mg chuẩn cinarizin vào bình định mức 100 ml, thêm 70 ml dung dịch HCl 0,1 N, lắc siêu âm để hòa tan, thêm dung dịch HCl 0,1 N vừa đủ đến vạch, lắc đều.

- *Dung dịch chuẩn hỗn hợp*: Cân chính xác khoảng 44,4 mg chuẩn piracetam cho vào bình định mức 100 ml; thêm chính xác 10,0 ml dung dịch chuẩn cinarizin và khoảng 60 ml dung dịch HCl 0,1 N, lắc siêu âm đến khi tan hoàn toàn, thêm dung dịch HCl 0,1 N vừa đủ đến vạch, lắc đều. Pha loãng 5,0 ml dung dịch thu được thành 25,0 ml với pha động.

* *Dung dịch placebo MT-0/MT-1/MT-2*: Cân một lượng mẫu placebo MT-0/MT-1/MT-2 tương đương với một viên + 01 vỏ nang rỗng và tiến hành thử độ hòa tan theo qui trình phân tích. Sau thời gian hòa tan qui định, lấy dung dịch hòa tan trong cốc, lọc qua màng lọc 0,45 μ m. Pha loãng 5,0 ml dịch lọc thành 25,0 ml với pha động.

3. Kết quả và bàn luận

3.1. Lựa chọn điều kiện sắc ký và xây dựng quy trình phân tích

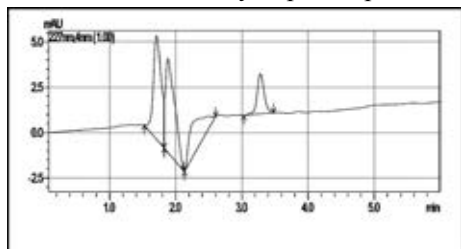
Trên cơ sở tham khảo một số tiêu chuẩn cơ sở và các được diễn, chúng tôi đã tiến hành khảo sát và lựa chọn hệ sắc ký pha đảo với pha động là (Acetonitril – dung dịch KH_2PO_4 0,05 M – triethylamin) tỷ lệ (50:50:0,2), điều chỉnh pH tới 3,0 bằng acid phosphoric, để tách 2 hoạt chất piracetam và cinarizin.

Do hoạt chất piracetam được rửa giải sớm nên bị nhiễu bởi các pic tá dược và dung môi, nên chúng tôi đã tiến hành thay đổi tỷ lệ pha động và chạy gradient dung môi để tách được pic piracetam mà thời gian lưu của cinarizin cũng không quá dài, đồng thời thay đổi cách xử lý mẫu: Pha loãng dung dịch thu được sau khi thử độ hòa tan bằng pha động để hạn chế ảnh hưởng của pic dung môi do sự khác biệt giữa dung môi pha mẫu và pha động.

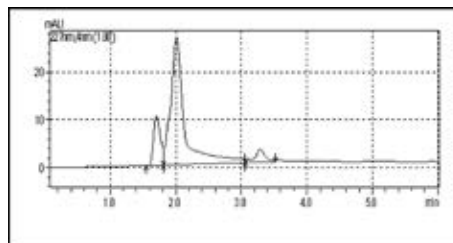
- Với hệ pha động ban đầu (chạy đẳng dòng) pha mẫu trong dung dịch HCl 0,1 N: Pic dung môi gần như bị dính hoàn toàn vào pic piracetam (Hình 1).

- Pha loãng mẫu trong pha động và tiến hành chạy gradient dung môi với các tỷ lệ khác nhau. Ban đầu đã bắt đầu tách được pic dung môi nhưng chưa hoàn toàn (Hình 2). Ở điều kiện này, độ tinh khiết của pic piracetam (purity) = 0,852753; Ảnh hưởng của mẫu placebo đối với pic piracetam ~ 7%.

- Sau quá trình khảo sát thay đổi tỷ lệ pha động, chúng tôi đã lựa chọn được điều kiện sắc ký thích hợp để định lượng đồng thời piracetam và cinnarizine trong phép thử độ hòa tan như đã nêu trong mục 2.2.2.2. Với điều kiện sắc ký lựa chọn, pic piracetam tách hoàn toàn ra khỏi pic dung môi, độ tinh khiết của pic piracetam (purity) = 0,999999 (Hình 3). Trên sắc ký đồ cho thấy pic piracetam cân đối, gọn và đã tách hoàn toàn khỏi pic dung môi. Như vậy việc lựa chọn các điều kiện sắc ký là phù hợp.

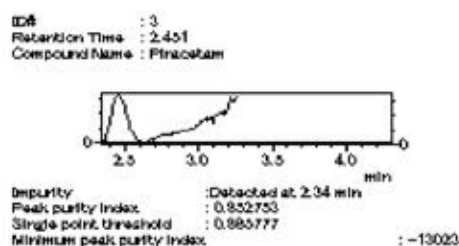
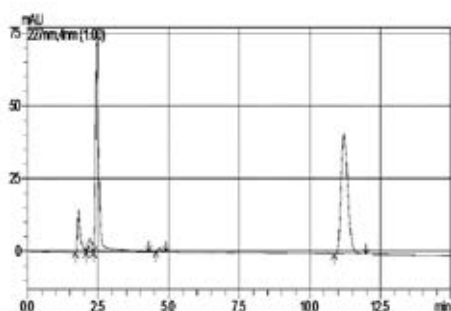


SKĐ của dung dịch Placebo MT-0

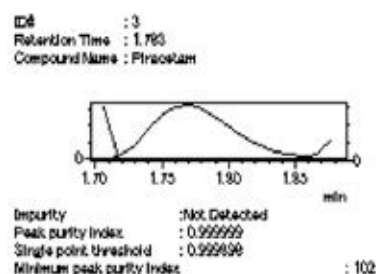
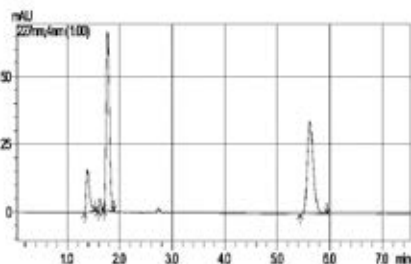


SKĐ của dung dịch thử

Hình 1. Sắc ký đồ của dung dịch chạy đẳng dòng, pha mẫu trong dung dịch HCl 0,1 N



Hình 2. Sắc ký đồ của dung dịch thử khi thay đổi tỷ lệ pha động



Hình 3. Sắc ký đồ của dung dịch thử sau khi lựa chọn được điều kiện sắc ký

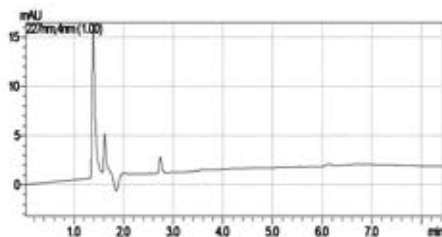
3.2. Thẩm định phương pháp

Việc thẩm định được tiến hành theo đúng hướng dẫn thẩm định qui trình phân tích của ICH (Q2) [3]. Các chỉ tiêu cần thẩm định bao gồm độ đặc hiệu, tính thích hợp của hệ thống, độ tuyến tính, độ đúng, khoảng xác định và độ chính xác (bao gồm độ lặp lại và độ chính xác trung gian).

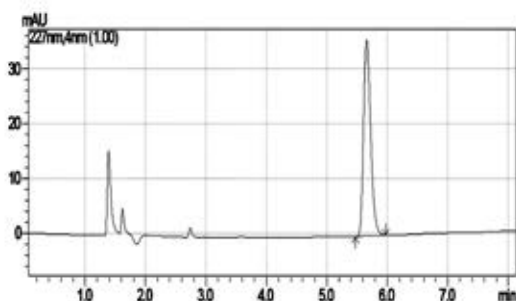
3.2.1. Tính đặc hiệu

Tiêm dung môi pha mẫu, dung dịch chuẩn, dung dịch thử và các dung dịch placebo vào hệ thống sắc ký. Kết quả cho thấy, trên sắc ký đồ của dung dịch thử cho 2 pic có thời gian lưu và phổ UV tương ứng với pic piracetam và cinnarizine trên sắc ký đồ của dung dịch chuẩn (piracetam ~ 1,8 phút; cinnarizine ~ 5,7 phút). Sắc ký đồ mẫu placebo (MT-0; MT-1; MT-2) không xuất hiện pic tại thời gian lưu tương ứng với pic piracetam và/hoặc cinnarizine. Kết quả được thể hiện trên các Hình

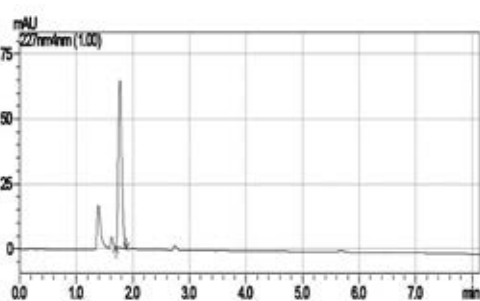
4, 5, 6, 7, 8 cho thấy phương pháp có tính đặc hiệu phù hợp cho phép định lượng đồng thời piracetam và cinnarizin bằng phương pháp HPLC trong phép thử độ hòa tan.



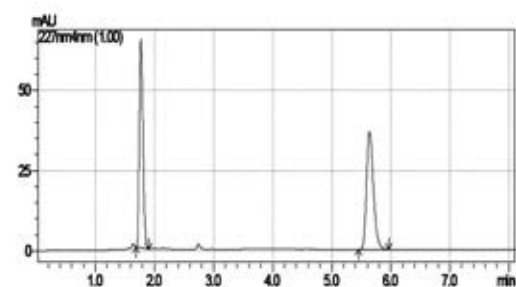
Hình 4. Sắc ký đồ của dung dịch placebo MT-0



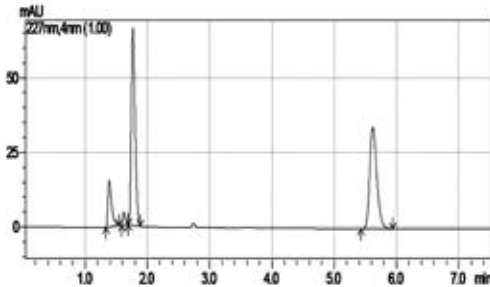
Hình 5. Sắc ký đồ của dung dịch placebo MT-1



Hình 6. Sắc ký đồ của dung dịch placebo MT-2



Hình 7. Sắc ký đồ của dung dịch chuẩn



Hình 8. Sắc ký của dung dịch thử

3.2.2. Tính thích hợp của hệ thống sắc ký

Tính thích hợp của hệ thống sắc ký được xác định bằng cách tiến hành tiêm 6 lần dung dịch chuẩn có nồng độ piracetam 80,53 mg/ml và cinnarizin 5,44 mg/ml. Ghi lại các giá trị về thời gian lưu, diện tích pic. Kết quả được thể hiện ở Bảng 1.

Bảng 1. Tính thích hợp của hệ thống sắc ký

STT	Piracetam		Cinnarizin	
	Thời gian lưu (phút)	Diện tích pic (mAU.s)	Thời gian lưu (phút)	Diện tích pic (mAU.s)
1	1,759	281312	5,610	294602
2	1,764	280978	5,618	294641
3	1,759	281263	5,617	294667
4	1,756	281334	5,621	294247
5	1,763	281276	5,632	294863
6	1,764	281847	5,637	294614
TB	1,761	281335,0	5,623	294605,7
RSD (%)	0,19	0,10	0,18	0,07

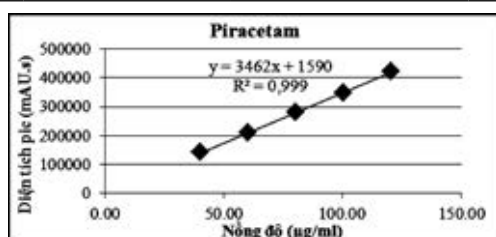
Các số liệu cho thấy, hệ thống sắc ký trên phù hợp cho việc định lượng piracetam và cinnarizin trong phép thử độ hòa tan.

3.2.3. Độ tuyến tính

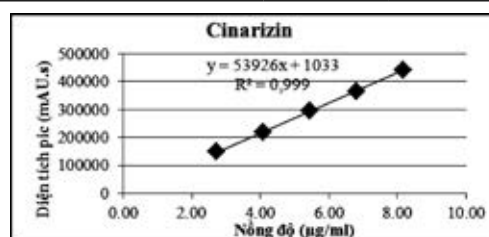
Khảo sát trên 05 dung dịch chuẩn với 5 nồng độ khác nhau (được pha loãng từ dung dịch chuẩn gốc với hệ số pha loãng khác nhau) có nồng độ 50%; 75%; 100%, 125% và 150% so với nồng độ định lượng của piracetam và cinarizin. Kết quả được ghi lại trong Bảng 2, Hình 9 và Hình 10.

Bảng 2. Kết quả khảo sát độ tuyến tính

Stt	Nồng độ % so với định lượng	Thể tích dung dịch chuẩn gốc (ml)	Hệ số pha loãng	Piracetam		Cinarizin	
				Nồng độ (µg/ml)	Diện tích pic (mAU.s)	Nồng độ (µg/ml)	Diện tích pic (mAU.s)
1	50	2,0	100	40,27	142560	2,72	148230
2	75	3,0	100	60,40	209081	4,08	220435
3	100	4,0	100	80,53	281312	5,44	294602
4	125	5,0	100	100,67	347417	6,80	366024
5	150	6,0	100	120,80	421995	8,16	441955
Phương trình hồi qui				$y = 3462x + 1590$		$y = 53926x + 1033$	
Hệ số tương quan				$r = 0,9995 > 0,998$		$r = 0,9995 > 0,998$	
% Y				$0,57\% < 2,0\%$		$0,35\% < 2,0\%$	



Hình 9. Đồ thị biểu diễn mối tương quan tuyến tính giữa nồng độ và diện tích pic Piracetam



Hình 10. Đồ thị biểu diễn mối tương quan tuyến tính giữa nồng độ và diện tích pic Cinarizin

Với điều kiện sắc ký đã lựa chọn, trong khoảng nồng độ khảo sát có sự tương quan tuyến tính chặt chẽ giữa nồng độ và diện tích pic đáp ứng.

3.2.4. Độ đúng

Chuẩn bị các mẫu thử: Chuẩn bị các mẫu tự tạo bằng cách thêm chính xác một lượng chất chuẩn piracetam và cinarizin vào mẫu placebo sao cho sau khi xử lý theo qui trình phân tích thu được các dung dịch có nồng độ 50%, 75%, 125% so với nồng độ định lượng. Mỗi mức nồng độ làm 03 mẫu. Tính tỉ lệ hoạt chất tìm thấy so với lượng thêm vào. Kết quả thể hiện ở Bảng 3.

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

Stt	Lượng thêm vào so với nhãn	Piracetam				Cinarizin			
		Lượng piracetam thực tế thêm vào các mẫu (mg)	Diện tích pic piracetam (mAU.s)	Lượng piracetam tìm lại (mg)	% Thu hồi	Lượng cinarizin thực tế thêm vào các mẫu (mg)	Diện tích pic cinarizin (mAU.s)	Lượng cinarizin tìm lại (mg)	% Thu hồi
1.	50%	4,0267	144734	4,1431	102,89	0,2719	147286	0,2718	99,99
2.	50%	4,0267	142749	4,0863	101,48	0,2719	145988	0,2694	99,11
3.	50%	4,0267	143192	4,0990	101,79	0,2719	146861	0,2711	99,70
Trung bình = 101,58%; RSD = 0,18%					Trung bình = 99,60%; RSD = 0,45%				
4.	75%	6,0401	216348	6,1932	102,53	0,4078	223618	0,4127	101,21
5.	75%	6,0401	216425	6,1954	102,57	0,4078	223485	0,4125	101,15
6.	75%	6,0401	213594	6,1143	101,23	0,4078	221100	0,4081	100,07
Trung bình = 102,11%; RSD = 0,75%					Trung bình = 100,81%; RSD = 0,64%				
7.	125%	10,0668	357578	10,2360	101,68	0,6797	369737	0,6824	100,40
8.	125%	10,0668	358397	10,2594	101,91	0,6797	373770	0,6898	101,50
9.	125%	10,0668	358539	10,2635	101,95	0,6797	373675	0,6897	101,47
Trung bình = 101,85%; RSD = 0,14%					Trung bình = 101,12%; RSD = 0,62%				

Từ kết quả thu được trong *Bảng 3* cho thấy tỉ lệ thu hồi đều trong khoảng 95,0% - 105,0% và RSD đều nhỏ hơn 2,0% phù hợp cho định lượng đồng thời piracetam và cinnarizine bằng phương pháp HPLC trong phép thử độ hòa tan.

3.2.5. Độ chính xác

3.2.5.1. Độ lặp lại

Tiến hành thử độ hòa tan trên 06 mẫu thử độc lập theo qui trình phân tích. Xác định hàm lượng piracetam và cinnarizine được hòa tan bằng phương pháp HPLC đã xây dựng. Kết quả được trình bày trong *Bảng 4*.

3.2.5.2. Độ chính xác trung gian

Cách tiến hành tương tự như phần Độ lặp lại với kiểm nghiệm viên khác, ngày khác và trên thiết bị khác.

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

Stt	Kiểm nghiệm viên 1				Kiểm nghiệm viên 2			
	Piracetam		Cinarizin		Piracetam		Cinarizin	
	Diện tích pic	% hòa tan	Diện tích pic	% hòa tan	Diện tích pic	% hòa tan	Diện tích pic	% hòa tan
1.	282242	90,89	272378	90,49	287218	93,82	285591	91,25
2.	293259	94,44	281052	93,37	288938	94,38	285688	91,28
3.	292187	94,10	275674	91,58	289179	94,46	287262	91,79
4.	291372	93,83	275013	91,36	286591	93,61	284384	90,87
5.	289058	93,09	273093	90,73	286768	93,67	283120	90,46
6.	287980	92,74	271742	90,28	287721	93,98	285736	91,30
TB	93,18%; n = 6; RSD = 1,29%		91,30%; n = 6; RSD = 1,13%		93,99%; n = 6; RSD = 0,36%		91,16%; n = 6; RSD = 0,45%	
HL Piracetam = 93,59%; n = 12; RSD = 1,06%					HL Cinarizin = 91,23%; n = 12; RSD = 0,90%			

Kết quả ở *Bảng 4* cho thấy, phương pháp định lượng đồng thời piracetam và cinnarizine bằng HPLC trong phép thử độ hòa tan có độ chính xác phù hợp.

4. Kết luận

Qui trình định lượng đồng thời piracetam và cinnarizine bằng phương pháp HPLC áp dụng cho phép thử độ hòa tan của viên nang Stufort đáp ứng yêu cầu về độ đặc hiệu, độ thích hợp của hệ thống sắc ký, độ tuyến tính, độ đúng, khoảng xác định, độ lặp lại và độ chính xác trung gian, phù hợp để áp dụng kiểm tra hàm lượng hòa tan của thành phẩm Stufort cap và có thể áp dụng cho các chế phẩm thuốc 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. Công ty Cổ phần Dược phẩm Trung ương 2, *Tiêu chuẩn Viên nang Pixcirin*.
3. *Hướng dẫn thẩm định quy trình phân tích theo ICH – Q2 (R1)*, sửa đổi năm 2005.
4. *British pharmacopoeia* 2016.
5. *Indian pharmacopoeia* 2014.
6. *Pharmacopoeia of PRC* 2010.

SUMMARY

A reversed-phase liquid chromatography method was developed for simultaneous assay of Piracetam and Cinnarizine in dissolution test of Stufort capsules. Chromatographic conditions are as follows:

- Column: Apollo RP 18 (250 x 4.6 mm; 5 μ m); Flow rate: 2.0 ml /min; Detector: 227 nm; Injection volume: 50 μ l.
- Mobile phase:
- + Mobile phase A: Acetonitrile – 0.05 M Potassium dihydrophosphate – Triethylamine (30:70:0.2). Adjust to pH 3.0 with Phosphoric acid.
- + Mobile phase B: Acetonitrile – 0.05 M Potassium dihydrophosphate – Triethylamine (60:40:0.2). Adjust to pH 3.0 with Phosphoric acid.

Time (min.)	Mobile phase A (per cent v/v)	Mobile phase B (per cent v/v)
0	70	30
3	0	100
7	0	100
8	70	30

The method was validated in system suitability, specificity, linearity, accuracy and precision. Validation results proved that the developed method was suitable for simultaneous determination of Piracetam and Cinnarizine in dissolution test.

(Ngày nhận bài: 14/12/2017 ; Ngày phản biện: 05/3/2018 ; Ngày duyệt đăng: 15/6/2018)

TỔNG HỢP VÀ TINH CHẾ 2-METHYL-4(5)-NITROIMIDAZOL ĐỂ LÀM TẠP CHUẨN SỬ DỤNG TRONG KIỂM TRA CHẤT LƯỢNG NGUYÊN LIỆU VÀ CÁC DẠNG BẢO CHẾ CỦA METRONIDAZOL

NGUYỄN VĂN GIANG
Trường Đại học Dược Hà Nội

MAI THANH HÀ, LÊ THỊ THU, LÊ HOÀNG ĐỨC, ĐOÀN CAO SƠN
Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương

Từ khóa: 2-methyl-4(5)-nitroimidazol, metronidazol, tổng hợp, tinh chế, HPLC

1. Đặt vấn đề

Metronidazol (tên khoa học là 2-(2-Methyl-5-nitro-1H-imidazol-1-yl)ethanol) là hoạt chất có các chế phẩm sử dụng rất rộng rãi trong điều trị ở Việt Nam. Các chế phẩm chứa Metronidazol được sản xuất trong nước hoặc được nhập khẩu từ nước ngoài với rất nhiều biệt dược khác nhau. Nguyên liệu Metronidazol và các dạng bào chế của metronidazol đã được đưa vào các Dược điển Anh, Mỹ, Việt Nam... 2-Methyl-4(5) nitroimidazol là sản phẩm trung gian trong quá trình tổng hợp Metronidazol và Tinidazol [1],[3],[5]. Trong các chuyên luận của Dược điển Anh, Mỹ, Việt Nam đều yêu cầu phải kiểm soát hàm lượng tạp chất này đối với nguyên liệu và dạng bào chế của Metronidazol. Thế nhưng, việc mua các tạp chuẩn của nước ngoài thường rất đắt như 2-methyl-4(5)-nitroimidazol chuẩn Châu Âu giá 79 EUR/lọ 10 mg, 2-methyl-4(5)-nitroimidazol chuẩn Mỹ giá 730\$/lọ 100 mg, đồng thời mất nhiều thời gian và thủ tục nhập khẩu phức tạp.

Nguyên liệu 2-methyl-4(5)-nitroimidazol được tổng hợp với quy trình đơn giản bằng phản ứng nitro hóa trực tiếp 2-methylimidazol với acid nitric, phản ứng cho hiệu suất tốt. Hơn nữa, nguyên liệu 2-methylimidazol cũng được tổng hợp bằng phản ứng ngưng tụ đóng vòng từ những nguyên liệu sẵn có như glyoxal, NH_3 và acetaldehyd. Từ thực tế đó chúng tôi định hướng nghiên cứu tổng hợp và tinh chế 2-methyl-4(5)-nitroimidazol để làm nguyên liệu thiết lập tạp chuẩn, nhằm tạo ra nguồn chuẩn tạp sẵn có trong nước, đáp ứng cho công tác kiểm tra chất lượng thuốc của các công ty sản xuất cũng như công tác giám sát chất lượng thuốc của toàn bộ hệ thống kiểm nghiệm tại Việt Nam.

2. Thực nghiệm

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

2.1.1. Thiết bị, dụng cụ

Các thiết bị, dụng cụ của Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương (đã được hiệu chuẩn theo ISO/IEC 17025 và GLP) gồm:

- Máy sắc ký lỏng hiệu năng cao – Shimadzu 20A;
- Cột C8 Lichrospher (250 x 4,6 mm, 5 μm);

- Cân phân tích Mettler toledo MS 105 có độ chính xác 0,01 mg;
- Máy đo nhiệt độ nóng chảy EZ-Melt;
- Máy chuẩn độ điện lượng Coulometer 756;
- Các dụng cụ thủy tinh cần thiết cho quá trình thực nghiệm.

2.1.2. Hóa chất, dung môi, chất chuẩn

- Chất chuẩn 2-methyl-4(5) nitroimidazol (USPRS), Lot. F0C091, hàm lượng = 100% (nguyên trạng);
- 2-Methylimidazol loại PA;
- Methanol tinh khiết dùng cho sắc ký lỏng (Merck);
- Glyoxal 40% (Acros);
- Amoni hydrocarbonat loại PA (Merck);
- Acetaldehyd 99,5% (Acros);
- Nước RO.

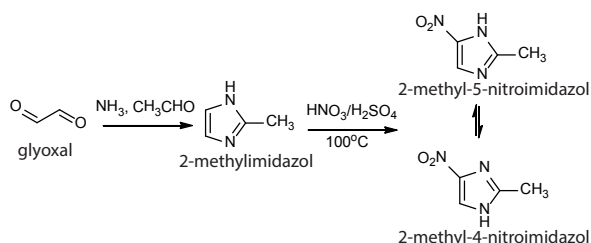
2.2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Đối tượng nghiên cứu

Hóa chất Glyoxal 40% của Acros

Tổng hợp 2-methyl-4(5)-nitroimidazol

Sơ đồ tổng hợp 2-methyl-4(5)-nitroimidazol từ glyoxal:



Hình 1. Sơ đồ phản ứng tổng hợp 2-methyl-4(5)-nitroimidazol

Quá trình tổng hợp gồm hai giai đoạn: Phản ứng ngưng tụ đóng vòng của glyoxal, acetaldehyd và NH_3 (từ nguồn NH_4HCO_3) để tổng hợp 2-methylimidazol; Giai đoạn 2 là phản ứng nitro hóa 2-methylimidazol với tác nhân sulfonitric (hỗn hợp HNO_3 và H_2SO_4) ở nhiệt độ 100°C .

2.2.2. Tinh chế

Sử dụng các kỹ thuật trong tổng hợp hữu cơ để tổng hợp và tinh chế sản phẩm. Quá trình tinh chế sản phẩm

được thực hiện bằng quá trình kết tinh phân đoạn, có sử dụng than hoạt tính để hấp phụ tạp màu.

Nhiệt độ nóng chảy được tiến hành đo trên máy EZ-Melt

Quá trình tổng hợp và tinh chế sản phẩm được tiến hành tại phòng Tổng hợp Hóa dược – Bộ môn Công nghiệp Dược – Trường Đại học Dược Hà Nội.

2.2.3. Xác định cấu trúc và nhận dạng chất

Sản phẩm tổng hợp được kiểm tra cấu trúc bằng các phương pháp phân tích phổ hiện đại như phổ hấp thụ tử ngoại, phổ hồng ngoại, phổ khối (MS), phổ cộng hưởng từ hạt nhân $^1\text{H-NMR}$ và $^{13}\text{C-NMR}$.

2.2.4. Kiểm tra chất lượng nguyên liệu sau tinh chế

Sản phẩm của quá trình tổng hợp và tinh chế sau khi xác định cấu trúc được kiểm tra chất lượng theo “Quy trình kiểm tra nguyên liệu sau tinh chế 2-methyl-4(5)-nitroimidazol”, sử dụng chuẩn Mỹ 2-methyl-4(5)-nitroimidazol (USPRS), Lot. F0C091, hàm lượng = 100% (nguyên trạng) làm chuẩn gốc.

- Hàm lượng nước: phương pháp điện lượng
- Tạp chất liên quan: phương pháp HPLC
- Định lượng: phương pháp HPLC, so sánh với chuẩn gốc

3. Kết quả và bàn luận

3.1. Quá trình tổng hợp 2-methyl-4(5)-nitroimidazol

3.1.1. Tổng hợp 2-methylimidazol

Cho vào bình cầu 2 cổ dung tích 250 ml 11,5 ml (0,1 mol) dung dịch glyoxal 40%. Làm lạnh bình cầu bằng đá muối xuống 0 – 5 °C. Sau đó thêm 30,8 g (0,7 mol) acetaldehyd 99,5%, khuấy đều. Tiếp tục thêm 15,8 g amoni bicarbonat vào bình cầu, gắn sinh hàn hồi lưu (sinh hàn được làm lạnh bằng ethanol 96% ở nhiệt độ -5°C). Khối phản ứng sau đó được đun nóng ở 60°C trong 6 h.

Sau khi thực hiện phản ứng xong, khối phản ứng được cất đến cạn.

Phần cặn được kết tinh lại trong hỗn hợp dung môi tetrahydrofuran và n-hexan (1:1) thu được 4,91 g 2-methylimidazol, tinh thể màu trắng, hiệu suất 59,87%, t_{nc} 140 – 141 °C.

3.1.2. Tổng hợp 2-methyl-4(5)-nitroimidazol

Cho 30,0 ml dung dịch acid sulfuric đặc (95 – 98%, $d = 1,84$ g/ml) vào bình cầu 2 cổ dung tích 250 ml. Làm lạnh bình cầu xuống 10°C bằng đá và thêm dần vào bình cầu 13,6 g 2-methylimidazol. Đun nóng hỗn hợp đến 100 – 120°C và thêm dần cho đến hết 24,0 ml acid nitric 65 – 68%, $d = 1,42$. Nhiệt độ trong bình cầu trong quá trình thêm HNO_3 được duy trì ở 140 – 160°C. Sau khi kết thúc quá trình trên, khối phản ứng được khuấy thêm

2 giờ ở nhiệt độ phòng và làm lạnh. Hỗn hợp lạnh này được cho từ từ vào nước đá, điều chỉnh pH về 6 bằng dung dịch NH_4OH 25% xuất hiện tủa, tiếp tục làm lạnh hỗn hợp xuống 0°C trong 2 giờ. Lọc, sấy sản phẩm ở 60°C trong 5 giờ thu được 14,32 g 2-methyl-4(5)-nitroimidazol, tinh thể trắng hơi vàng, hiệu suất 68,19%.

3.2. Tinh chế 2-methyl-4(5)-nitroimidazol

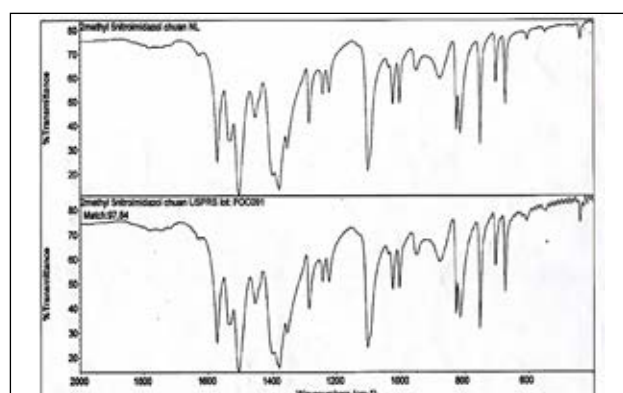
Hoà tan 5,0 g 2-methyl-4(5)-nitroimidazol trong 50 ml nước ở 80 °C, thêm 0,03 g than hoạt. Đun nóng trong 15 phút, lọc loại than. Dịch lọc được làm lạnh xuống 5 °C qua đêm thì xuất hiện tinh thể hình kim ánh vàng. Lọc lấy tủa, rửa bằng nước cất lạnh 3 lần thu được sản phẩm 2-methyl-4(5)-nitroimidazol tinh khiết.

STT	Nhiệt độ nóng chảy		Hiệu suất tinh chế (%)
	Trước tinh chế	Sau tinh chế	
1	251 - 254°C	253 - 254°C	63,45
2	251 - 254°C	253 - 254°C	62,56
3	251 - 254°C	253 - 254°C	60,56
TB		253 - 254°C	62,19

3.3. Kết quả kiểm tra cấu trúc bằng phân tích phổ

3.3.1. Phổ hồng ngoại (IR)

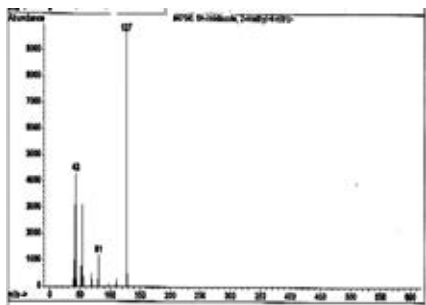
Phổ hồng ngoại của nguyên liệu 2-methyl-4(5)-nitroimidazol sau khi tinh chế trùng với phổ hồng ngoại của 2-methyl-4(5)-nitroimidazol USPRS Lot. F0C091 với hệ số match 97,84%.



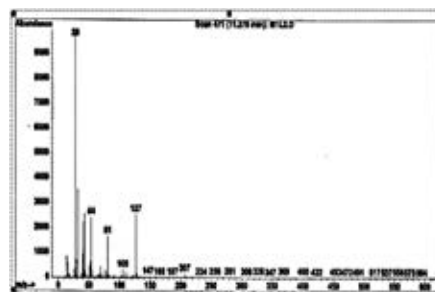
Hình 2. Phổ IR của 2-methyl-4(5)-nitroimidazol chuẩn và thử

3.3.2. Phổ khối MS

Dữ liệu phổ ESI-MS của 2-methyl-4(5)-nitroimidazol tổng hợp được có pic ion (m/z) : 127 $[\text{M}+\text{H}]^+$ tương ứng với khối lượng phân tử của 2-methyl-4(5)-nitroimidazol (CTPT $\text{C}_6\text{H}_7\text{NO}$, $M = 127,10$).



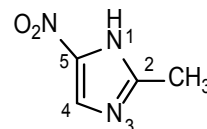
Hình 3. Phổ MS của 2-methyl-4(5)-nitroimidazol chuẩn



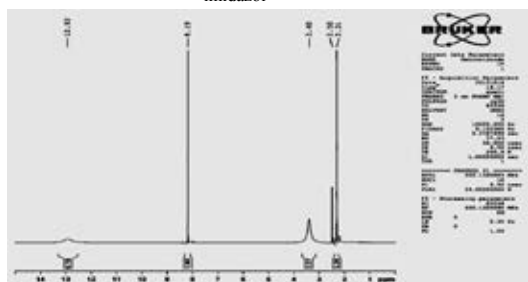
Hình 4. Phổ MS của nguyên liệu 2-methyl-4(5)-nitroimidazol sau tinh chế

3.3.3. Phổ cộng hưởng từ hạt nhân

Phân tích dữ liệu phổ cộng hưởng từ ^1H và ^{13}C của 2-methyl-4(5)-nitroimidazol tổng hợp được cho thấy xuất hiện các tín hiệu proton và carbon phù hợp với công thức cấu tạo (Hình bên).

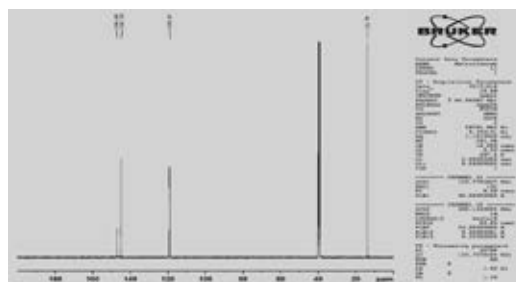


Phổ ^1H -NMR ($\text{DMSO}-d_6$), δ , ppm: 2,31 (3H, s, $\text{H}-\text{CH}_3$); 8,19 (1H, s, $\text{H}_{\text{imidazol}}$); 12,93 (1H, s, NH).



Hình 5. Phổ ^1H -NMR của 2-methyl-4(5)-nitroimidazol

Phổ ^{13}C -NMR ($\text{DMSO}-d_6$), δ , ppm: 13,78 ($\text{C}-\text{CH}_3$); 119,07 (C-4); 144,79 (C-2); 146,84 (C-5).



Hình 6. Phổ ^{13}C -NMR của 2-methyl-4(5)-nitroimidazol

Như vậy, từ kết quả phân tích dữ liệu phổ MS, NMR kết hợp với phép thử định tính phổ UV-VIS và IR so sánh với chuẩn, có thể khẳng định chất sau khi tinh chế là 2-methyl-4(5)-nitroimidazol.

3.4. Kết quả kiểm tra chất lượng nguyên liệu 2-methyl-4(5)-nitroimidazol sau tinh chế

Tham khảo phần Tạp chất liên quan trong chuyên luận Metronidazol của Dược điển Mỹ 38.

3.4.1. Xác định tạp chất liên quan: phương pháp HPLC

- **Dung dịch thử:** Hòa tan 0,03 g nguyên liệu 2-methyl-4(5)-nitroimidazol sau tinh chế trong pha động và pha loãng vừa đủ đến 20 ml. Hút 4,0 ml dung dịch này pha loãng với pha động đến vừa đủ 20,0 ml.

- **Dung dịch so sánh (a):** Hút 1,0 ml dung dịch thử pha loãng với pha động đến vừa đủ 50,0 ml (dung dịch so sánh 2,0%) và hút 5,0 ml dung dịch này pha loãng với pha động đến vừa đủ 20,0 ml (dung dịch so sánh 0,5%).

- **Dung dịch so sánh (b):** Hòa tan 5,0 mg 2-methylimidazol và 5,0 mg Metronidazol chuẩn trong pha động, thêm 5,0 ml dung dịch so sánh 2,0% và pha loãng với pha động đến vừa đủ 20,0 ml.

- **Điều kiện sắc ký:**

Máy HPLC Shimadzu 20A

Cột: C8 Purospher star (250 x 4,6 mm, 5 μm), nhiệt độ cột: 30°C

Pha động: Methanol và nước (1:4)

Dung môi pha mẫu: pha động

Detector: UV 319 nm

Tốc độ dòng: 1 ml/phút

Thể tích tiêm: 20 μl

- **Độ thích hợp của hệ thống:** Dung dịch so sánh (b):

Độ phân giải giữa 2 pic 2-methylimidazol và 2-methyl-4(5)-nitroimidazol tối thiểu là 2,0.

- **Kết quả:**

Thời gian lưu: t_R 2-methyl-4(5)-nitroimidazol = 5,2 phút

t_R 2-methylimidazol = 1,4 phút

t_R metronidazol = 7,0 phút

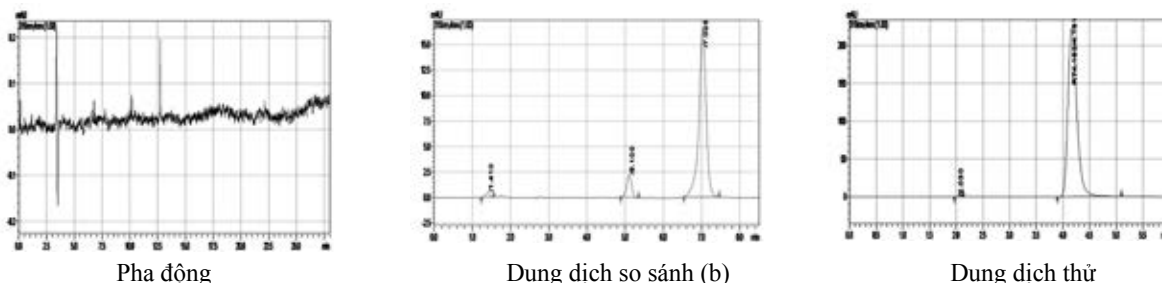
Độ phân giải: R (2-methyl-4(5)-nitroimidazol/2-methylimidazol) = 14,1

R (2-methyl-4(5)-nitroimidazol/metronidazol) = 5,5

Bảng 1. Kết quả xác định tạp trong nguyên liệu 2-methyl-4(5)-nitroimidazol sau tinh chế

Mẫu thử							
t_R tạp	Thứ 1 ($m = 30,15$ mg)		Thứ 2 ($m = 30,31$ mg)		Thứ 3 ($m = 30,08$ mg)		Trung bình
	$S_{tạp}$ (mAU.s)	% tạp	$S_{tạp}$ (mAU.s)	% tạp	$S_{tạp}$ (mAU.s)	% tạp	
Tạp 1	2027	0,01	2022	0,01	2021	0,01	0,01%

Kết quả cho thấy nguyên liệu 2-methyl-4(5)-nitroimidazol sau tinh chế có 1 pic tạp ($0,01\% < 0,5\%$), đạt yêu cầu để thiết lập chất chuẩn.



Hình 7. SKĐ xác định tạp chất liên quan trong nguyên liệu 2-methyl-4(5)-nitroimidazol

3.4.2. Định lượng

- **Dung dịch thử:** Hòa tan 0,03 g mẫu thử trong pha động và pha loãng vừa đủ đến 50 ml. Hút 1,0 ml dung dịch này pha loãng với pha động đến vừa đủ 20,0 ml.

- **Dung dịch chuẩn:** Hòa tan 15,0 mg chuẩn USP 2-methyl-4(5)-nitroimidazol trong pha động và pha loãng vừa đủ đến 25 ml. Hút 1,0 ml dung dịch này pha loãng với pha động đến vừa đủ 20,0 ml.

- **Dung dịch phân giải:** Hòa tan 15,0 mg Metronidazol chuẩn và 15,0 mg 2-methylimidazol trong pha động và pha loãng vừa đủ đến 25 ml. Hút 1,0 ml dung dịch này và 1,0 ml dung dịch chuẩn pha loãng với pha động đến vừa đủ 20,0 ml.

- **Thiết bị:** Máy HPLC Shimadzu 20A

- **Cột:** C8 Phenomenex (125 x 4,6 mm, 5 μ m), nhiệt độ cột: 30°C

- **Pha động:** Methanol và nước (1:4)

- **Tốc độ dòng:** 1,0 ml/min

- **Detector:** UV 319 nm

- **Thể tích tiêm:** 20 μ l

Tiến hành song song với chuẩn USP 2-methyl-4(5)-nitroimidazol Lot: F0C091, 100% (nguyên trạng).

- **Kết quả :** Độ phân giải R (2-methyl-4(5)-nitroimidazol/metronidazol) = 5,3

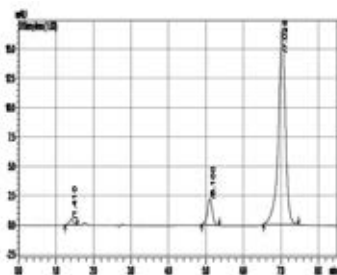
- Độ phân giải R (2-methylimidazol/2-methyl-4(5)-nitroimidazol) = 14,5

Kết quả thu được trong Hình 7, Bảng 2.

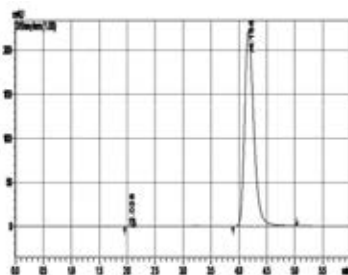
Bảng 2. Kết quả định lượng nguyên liệu 2-methyl-4(5)-nitroimidazol

Lượng cân chuẩn (mg):		Chuẩn 1: 15,35 mg; Chuẩn 2: 15,52 mg	
Diện tích pic chuẩn (mAU.s):		Chuẩn 1: 2555489; Chuẩn 2: 2586415	
Mẫu thử	Lượng cân (mg)	Diện tích pic (mAU.s)	Hàm lượng (%) nguyên trạng
Thứ 1	15,48	2571606	99,79
Thứ 2	16,20	2702740	100,21
Thứ 3	15,69	2620668	100,33
Thứ 4	15,45	2585515	100,52
Thứ 5	15,93	2651320	99,97
Thứ 6	15,76	2625265	100,06
Trung bình (%) = 100,15 ; n = 6 ; RSD = 0,26%			

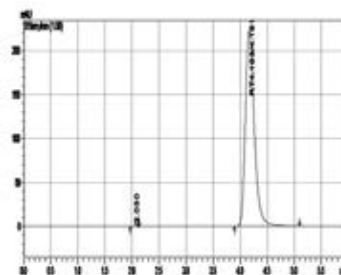
Hàm lượng nguyên liệu 2-methyl-4(5)-nitroimidazol sau tinh chế thu được là 100,15%, tính theo nguyên trạng ($n = 6$, RSD = 0,26%)



Dung dịch phân giải



Dung dịch chuẩn
2-methyl-4(5)-nitroimidazol USP



Dung dịch thử mẫu nguyên liệu sau
tinh chế 2-methyl-4(5)-nitroimidazol

Hình 8. Sắc ký đồ định lượng nguyên liệu sau tinh chế 2-methyl-4(5)-nitroimidazol

3.4.3. Hàm lượng nước

Hàm lượng nước được xác định bằng phương pháp chuẩn độ điện lượng trên thiết bị Coulometer 756 của Metrohm. Kết quả như trong Bảng 3.

Bảng 3. Kết quả xác định hàm lượng nước của nguyên liệu 2-methyl-4(5)-nitroimidazol sau tinh chế

Mẫu thử	Lượng cân mẫu thử (mg)	Hàm lượng nước (%)
1	46,33	0,8
2	46,60	0,7
3	46,82	0,8
4	59,59	0,8
5	43,30	0,8
6	45,71	0,7
Trung bình		0,8

Nhận xét: Kết quả phân tích sơ bộ trên 03 chỉ tiêu tạp chất liên quan (01 tạp < 0,5%), định lượng (100,15% > 99,0%) và hàm lượng nước (0,8% < 1,0%) cho thấy nguyên liệu 2-methyl-4(5)-nitroimidazol sau tinh chế đạt yêu cầu để thiết lập tạp chuẩn.

4. Kết luận

Như vậy, chúng tôi đã tổng hợp và tinh chế được 2-methyl-4(5)-nitroimidazol đạt yêu cầu chất lượng để làm nguyên liệu thiết lập chất chuẩn tạp dùng trong kiểm nghiệm nguyên liệu và các dạng bào chế của Metronidazol. Nguyên liệu này đang được tiếp tục nghiên cứu độ ổn định để sử dụng làm chất chuẩn.

Tài liệu tham khảo

- Bộ Y tế (2009), *Dược điển Việt Nam*, lần xuất bản thứ tư, NXB Y học, Hà Nội, trang 405-408, 614-616.
- Alsante K. M. et al. (2001), "Isolation and identification of process related impurities and degradation products from pharmaceutical drug candidates. Part 1", *American Pharmaceutical Review*, vol. 4(1), pp.70-78.
- The Bristish pharmacopoeia* (2014), pp. 811-816, 1049-1050, 1630-1631.
- The Merck index* (2009), p. 10.
- The United State Pharmacopoeia* 38 (2015), pp. 4380-4385, 5587.

SUMMARY

Controlling the pharmaceutical impurities is a significant issue to the pharmaceutical industry. Metronidazole, Tinidazole is a antibiotic which is used widely with many pharmaceutical products. For controlling Metronidazole, Tinidazole material and its products, it's essential to evaluate 2-methyl-4(5)-nitroimidazol impurity. In this work, we have synthesized and purified it to establish 2-methyl-4(5)-nitroimidazol impurity standard. The structure of synthesized 2-methyl-4(5)-nitroimidazol is determined by IR, MS and NMR. The synthesized 2-methyl-4(5)-nitroimidazol which is purified contains 100.15 % (on as is basic) by HPLC analysis, comparing with USP reference standard.

(Ngày nhận bài: 22/12/2017 ; Ngày phản biện: 28/2/2018 ; Ngày duyệt đăng: 15/6/2018)

XÂY DỰNG VÀ THẨM ĐỊNH PHƯƠNG PHÁP PHÂN TÍCH CEPHALEXIN TRONG HUYẾT TƯƠNG NGƯỜI BẰNG SẮC KÝ LỎNG HIỆU NĂNG CAO

NGÔ ĐỨC LIÊM, TRẦN HOÀNG, CAO NGỌC CƯỜNG, TẠ MẠNH HÙNG
Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương

Từ khóa: Cephalexin, tương đương sinh học, cephalosporin, tua protein, HPLC

1. Đặt vấn đề

Cephalexin ($C_{16}H_{17}N_3O_4S$) là kháng sinh cephalosporin thế hệ I, được hấp thu gần như hoàn toàn qua đường tiêu hóa, ở mức liều đơn 250 mg, 500 mg hoặc 1 g cephalexin, nồng độ đỉnh trung bình trong huyết tương đạt được khoảng 1 giờ và tương ứng vào khoảng 9, 18 hoặc 32 $\mu\text{g/ml}$ [1]. Dựa vào trạng thiết bị hiện có và tham khảo một số phương pháp phân tích đã được các tác giả công bố đồng thời áp dụng các nguyên lý của phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao [4],[5], chúng tôi đã tiến hành nghiên cứu định lượng Cephalexin trong huyết tương người bằng phương pháp HPLC kết nối detector PDA nhằm đáp ứng nhu cầu đánh giá tương đương sinh học (TĐSH) các chế phẩm chứa Cephalexin.

2. Thực nghiệm

2.1. Thiết bị, hóa chất và thuốc thử

2.1.1. Thiết bị, dụng cụ

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

- Máy sắc ký lỏng cao áp Shimadzu với detector PDA, hệ tiêm mẫu tự động;
- Cột sắc ký Phenomenex RP18 (250 x 4,6 mm, 5 μm);
- Cân phân tích Sartorius CP 224S, độ chính xác 0,1 mg;
- Cân kỹ thuật Sartorius TE 412;
- Tủ lạnh sâu $-35 \pm 5^\circ\text{C}$, máy ly tâm lạnh, micropipet;
- Ống chiết thủy tinh, bình định mức, pipet loại A.

2.1.2. Hóa chất, thuốc thử và chất chuẩn

Acetonitril loại dùng cho HPLC;
Dicloromethan, amoni acetat, acid phosphoric loại PA (Merck);
Các mẫu huyết tương trắng của Viện Huyết học và Truyền máu Trung ương;

Chất chuẩn cephalexin (CPL) - SKS: 0615016.03, hàm lượng: 93,79% (nguyên trạng) của Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương;

Chuẩn nội cefaclor (IS) - SKS: 0415042.02, hàm lượng: 92,69% (nguyên trạng) của Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương.

2.2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

- Đối tượng nghiên cứu: Các mẫu huyết tương trắng không chứa cephalexin và các mẫu huyết tương tự tạo

chứa cephalexin bằng cách cho chuẩn cephalexin vào trong mẫu huyết tương trắng với nồng độ khác nhau để khảo sát.

- Phương pháp nghiên cứu: Nghiên cứu chiết tách cephalexin từ huyết tương bằng phương pháp kết hợp tua protein với acetonitril và chiết loại tạp bằng dicloromethan sau đó xác định nồng độ cephalexin trong mẫu bằng phương pháp sắc ký lỏng kết nối detector PDA. Khảo sát các điều kiện sắc ký với các loại cột khác nhau, thành phần và tỷ lệ pha động thích hợp để cho khả năng tách tốt nhất [5].

- Thẩm định phương pháp phân tích: Tiến hành theo các chỉ tiêu qui định theo các hướng dẫn thẩm định phương pháp phân tích trong dịch sinh học US-FDA, EMEA gồm độ đặc hiệu/chọn lọc, giới hạn định lượng dưới, đường chuẩn và khoảng tuyến tính, độ đúng, độ chính xác, tỷ lệ thu hồi, độ ổn định [2],[3].

3. Kết quả và bàn luận

3.1. Xây dựng phương pháp phân tích

Sau quá trình khảo sát, xây dựng được phương pháp định lượng CPL trong các mẫu huyết tương người như sau:

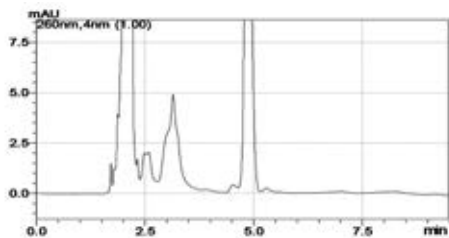
- Điều kiện sắc ký:
 - + Cột: RP18, 250 x 4,6 mm, 5 μm
 - + Nhiệt độ cột: 40°C
 - + Pha động: Acetonitril – đệm amoni acetat 0,02 M pH 3,0 (tỷ lệ thích hợp)
 - + Tốc độ dòng: 1,5 ml/phút
 - + Detector PDA: 260 nm
 - + Thể tích tiêm: 35 μl

- Phương pháp xử lý mẫu: Mẫu huyết tương để ở đông ở nhiệt độ phòng. Lấy 1 ml huyết tương, thêm 50 μl nội chuẩn, lắc xoáy 5 giây. Thêm 100 μl dung dịch H_3PO_4 1M, lắc xoáy 15 giây. Thêm 2 ml acetonitril, lắc xoáy 10 giây, ly tâm 10000 vòng/phút trong 5 phút. Lấy toàn bộ lớp dịch trong. Thêm 3 ml dicloromethan. Lắc cơ học ngang 5 phút. Ly tâm 3000 vòng/phút x 5 phút. Hút lớp dịch trên. Tiêm sắc ký.

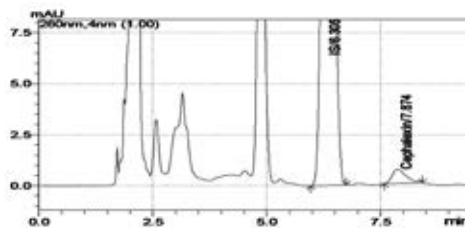
3.2. Thẩm định phương pháp phân tích

3.2.1. Độ đặc hiệu – chọn lọc của phương pháp

Phân tích mẫu huyết tương trắng, mẫu huyết tương tự tạo có pha cephalexin (0,5 $\mu\text{g/ml}$) và IS theo phương pháp đã xây dựng, ghi lại sắc ký đồ (Hình 1 và Hình 2).



Hình 1. Sắc ký đồ mẫu huyết tương trắng



Hình 2. Sắc ký đồ mẫu huyết tương tự tạo chứa chất chuẩn CPL (0,5 µg/ml) và chuẩn nội (IS)

Kết quả phân tích cho thấy, trên sắc ký đồ mẫu huyết tương trắng (Hình 1), tại các khoảng thời gian trùng với thời gian lưu của IS và CPL trong sắc ký đồ của mẫu chuẩn (khoảng 6,3 phút đối với IS và 7,9 phút đối với CPL) không thấy xuất hiện các pic tạp. Do vậy, phương pháp phân tích có độ đặc hiệu/chọn lọc với CPL theo các quy định của phương pháp phân tích thuốc trong dịch sinh học.

3.2.2. Đường chuẩn và khoảng tuyến tính

Phân tích các mẫu huyết tương chứa chuẩn CPL có nồng độ 0,5 µg/ml đến 50 µg/ml theo qui trình đã xây dựng. Xác định sự tương quan giữa nồng độ CPL trong huyết tương và tỉ lệ diện tích pic CPL/IS thu được bằng phương pháp hồi qui tuyến tính với hệ số tỷ trọng $1/(\text{nồng độ})^2$. Kết quả xác định mối tương quan tuyến tính được trình bày trong Bảng 1.

Bảng 1. Kết quả khảo sát đường chuẩn – khoảng tuyến tính của CPL

Mẫu chuẩn	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8
Nồng độ (µg/ml)	0,503	1,005	2,011	5,027	10,054	20,109	40,217	50,271
Diện tích pic CPL (mAU.s)	12080	27707	54125	131471	257499	520801	1031589	1291416
Diện tích pic IS (mAU.s)	607996	578075	587617	601782	656997	602710	590748	644064
Tỷ lệ diện tích pic CPL/IS	0,020	0,048	0,092	0,218	0,392	0,864	1,746	2,005
Độ đúng (%)	92,7	111,6	107,2	101,7	91,2	100,6	101,6	93,3
Phương trình hồi qui	$y = 0,0427 x + 0,0000 ; r = 0,9964; \text{Weight: } 1/x^2$							

Kết quả thẩm định cho thấy trong khoảng nồng độ đã khảo sát có sự tương quan tuyến tính giữa nồng độ CPL với tỷ lệ diện tích pic CPL/IS với hệ số tương quan xấp xỉ bằng 1. Nồng độ CPL xác định từ đường chuẩn so với giá trị lý thuyết đều đạt độ đúng từ 91,2% đến 111,6% và nằm trong giới hạn cho phép theo quy định các hướng dẫn thẩm định phương pháp phân tích thuốc trong dịch sinh học.

3.2.3. Giới hạn định lượng dưới (LLOQ) của phương pháp

Phân tích các mẫu huyết tương trắng và mẫu huyết tương chứa CPL có nồng độ khoảng 0,5 µg/ml (mẫu LLOQ). Xác định nồng độ CPL 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 trong Bảng 2.

Bảng 2. Kết quả xác định giá trị LLOQ của phương pháp

STT	Mẫu trắng	Mẫu chuẩn (0,5 µg/ml)				
	Diện tích pic (mAU.s)	Diện tích pic CPL (mAU.s)	Diện tích pic IS (mAU.s)	Tỷ lệ CPL/IS	Nồng độ CPL tìm thấy (µg/ml)	Độ đúng (%)
1	0	15245	625599	0,024	0,449	89,3
2	0	14466	634774	0,023	0,411	81,8
3	0	15949	573078	0,028	0,530	105,5
4	0	17097	588885	0,029	0,559	111,1
5	0	15069	569104	0,026	0,498	99,1
6	0	17589	653564	0,027	0,509	101,2
TB					0,493	98,0
CV (%)					11,0	11,0

Kết quả thẩm định cho thấy tỷ lệ giữa diện tích pic CPL trong các mẫu LLOQ đều lớn hơn 5 lần với diện tích pic tạp có cùng thời gian lưu trong các mẫu trắng. Tỷ lệ giữa nồng độ CPL xác định từ đường chuẩn so với nồng độ lý thuyết trong các mẫu LLOQ nằm trong khoảng từ 80 – 120%, giá trị CV (%) ≤ 20 đáp ứng yêu cầu giới hạn định lượng dưới của phương pháp phân tích thuốc trong dịch sinh học.

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

Tiến hành thẩm định độ đúng, độ lặp lại trên 3 lô mẫu thử nồng độ thấp (LQC), nồng độ khoảng giữa đường chuẩn (MQC), và nồng độ cao (HQC) chứa CPL có nồng độ tương ứng là 1,5; 25; 35 µg/ml. Xác định hàm lượng CPL 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 3.

Bảng 3. Kết quả thẩm định độ đúng, độ lặp lại trong ngày và khác ngày

Độ đúng, độ lặp lại	Mẫu LQC (1,5 µg/ml)		Mẫu MQC (25 µg/ml)		Mẫu HQC (35 µg/ml)	
	<i>Độ đúng (%)</i>	<i>CV (%)</i>	<i>Độ đúng (%)</i>	<i>CV (%)</i>	<i>Độ đúng (%)</i>	<i>CV (%)</i>
Trong ngày (n = 6)	94,4	4,2	100,4	2,2	103,5	2,3
Khác ngày (n = 3)	99,9	7,3	99,8	2,7	105,2	4,1

Kết quả thẩm định cho thấy ở các khoảng nồng độ thấp, trung bình và cao phương pháp có độ đúng trong ngày, khác ngày dao động trong khoảng 94,4% - 105,2%; độ lặp lại trong ngày và khác ngày với giá trị CV < 15%; đáp ứng yêu cầu chỉ tiêu độ đúng, độ lặp lại của phương pháp phân tích thuốc trong dịch sinh học theo hướng dẫn của US – FDA và EMEA.

3.2.5. Xác định tỷ lệ thu hồi hoạt chất

Xác định tỷ lệ thu hồi CPL và IS bằng cách so sánh diện tích pic CPL và IS trong các lô mẫu có qua chiết tách và không qua chiết tách (mẫu pha trong nước). Kết quả xác định được tỷ lệ thu hồi chuẩn IS là 89,4% (CV < 5%). Tỷ lệ thu hồi của CPL ở cả ba khoảng nồng độ thấp, trung bình, và cao được trình bày ở Bảng 4.

Bảng 4. Kết quả xác định tỷ lệ thu hồi CPL

STT	Diện tích pic của CPL (mAU.s)					
	LQC (≈ 1,5 µg/ml)		MQC (≈ 25 µg/ml)		HQC (≈ 35 µg/ml)	
	<i>Mẫu HT</i>	<i>Mẫu pha trong nước</i>	<i>Mẫu HT</i>	<i>Mẫu pha trong nước</i>	<i>Mẫu HT</i>	<i>Mẫu pha trong nước</i>
1	42553	44567	621471	722341	892240	1012146
2	39317	44448	635508	724050	886272	1014426
3	41306	44453	627169	721812	887304	1019330
4	39916	44623	629889	722362	878567	1010711
5	40279	44106	626066	723135	888003	1008852
6	37980	44855	645023	722088	893084	1013061
TB	40225	44509	630854	722631	887578	1013088
CV (%)	3,9	0,6	1,3	0,1	0,6	0,4
Tỷ lệ thu hồi*	99,0%		95,6%		96,0%	

(*) Giá trị đã được hiệu chỉnh theo hệ số pha loãng: $TLTH = S_{HT} / S_{nước} * 1150/1050 * 100$

Kết quả nghiên cứu cho thấy phương pháp có tỷ lệ thu hồi hoạt chất > 90%, ổn định và lặp lại qua các lần phân tích (CV < 5%).

3.2.6. Nghiên cứu độ ổn định của hoạt chất trong quá trình xử lý, phân tích, bảo quản mẫu huyết tương

Đánh giá độ ổn định của CPL trong quá trình xử lý phân tích và bảo quản mẫu huyết tương bằng cách so sánh kết quả xác định nồng độ CPL có trong các mẫu huyết tương được bảo quản sau những khoảng thời gian xác định so với kết quả xác định nồng độ CPL ban đầu trong các mẫu huyết tương. Kết quả nghiên cứu độ ổn định của CPL trong huyết tương ở cả hai khoảng nồng độ thấp và cao được trình bày trong Bảng 5.

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

Độ ổn định	Mẫu	Nồng độ trung bình ban đầu ($\mu\text{g/ml}$; $n = 6$)	Nồng độ trung bình sau thời gian ổn định ($\mu\text{g/ml}$; $n = 6$)	% Sai khác
3 chu kỳ đông – rã đông	LQC	1,5	1,4	- 9,6
	HQC	33,3	32,7	- 1,8
Độ ổn định dài ngày ($-35^{\circ}\text{C} \pm -5^{\circ}\text{C}$, 34 ngày)	LQC	1,5	1,4	-8,8
	HQC	33,3	30,3	-8,9
Độ ổn định thời gian ngắn (6 giờ, nhiệt độ phòng)	LQC	1,5	1,3	-9,8
	HQC	33,3	31,4	-5,5
Độ ổn định trong autosampler (18 giờ/ 4°C)	LQC	1,6	1,7	1,4
	HQC	35,5	35,9	1,2

4. Kết luận

Nghiên cứu đã xây dựng được phương pháp định lượng cephalixin trong huyết tương người bằng phương pháp HPLC kết nối detector PDA. Kết quả thẩm định cho thấy phương pháp có giá trị giới hạn định lượng nhỏ ($0,5 \mu\text{g/ml}$); khoảng tuyến tính rộng ($0,5 \mu\text{g/ml}$ đến $50 \mu\text{g/ml}$); độ đúng đạt cao ($94,4\% - 105,2\%$); độ lặp lại với giá trị CV $< 15\%$ đáp ứng yêu cầu đối với phương pháp phân tích thuốc trong dịch sinh học của US – FDA, EMEA. Phương pháp đã xây dựng có thể ứng dụng trong các nghiên cứu đánh giá sinh khả dụng và tương đương sinh học đối với chế phẩm chứa hoạt chất cephalixin.

Tài liệu tham khảo

1. Bộ Y tế (2015), *Dược thư Quốc gia Việt Nam*, Lần xuất bản thứ 2, Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật.
2. European Medicines Agency, Committee for Medicinal Products for human use (2012). *Guideline on bioanalytical method validation*.
3. U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration (2013): *Guidance for Industry - Bioanalytical Method Validation*.
4. *United state pharmacopoeia* 38, (2016).
5. Anika Pecavar, Andrej Šmidovnik, Dušan Milivojevic, Mirko Prošek (2005), “A reversed phase high-performance liquid chromatography method for determination of cephalixin in human plasma”, *Journal of High Resolution Chromatography*, Volume 20, Issue 12.

SUMMARY

A simple, specific and sensitive HPLC method has been developed for determination of Cephalixin in human plasma. Cefaclor was used as an internal standard. The analyte and the internal standard were extracted from human plasma by the protein precipitation method with Acetonitrile and liquid-liquid extraction method with Dichloromethane. The chromatographic conditions were achieved on the type of column (C18: 250 x 4.6 mm; 5 μm) with PDA detector at wavelength 260 nm. The mobile phase included Acetonitrile, 0.02 M Ammonium acetate buffer (pH 3.0) with suitable ratio at a flow rate of 1.5 ml per min. The method was validated over concentration range from 0.5 to 50 μg per ml. The intra and inter-day precision and accuracy were within between 90.0 % and 110.0 %. This method can be used for BA-BE studies of Cephalixin preparations.

(Ngày nhận bài: 07/11/2017 ; Ngày phản biện: 28/3/2018 ; Ngày duyệt đăng: 15/6/2018)

XÂY DỰNG PHƯƠNG PHÁP ĐỊNH LƯỢNG HYDROXYPROLIN BẰNG HPLC VỚI DETECTOR HUỖNH QUANG ĐỂ XÁC ĐỊNH HÀM LƯỢNG COLLAGEN TOÀN PHẦN TRONG THỰC PHẨM CHỨC NĂNG

LÊ ĐÌNH CHI, TÔNG THỊ THANH VƯỢNG
Trường Đại học Dược Hà Nội

Từ khóa: Hydroxyprolin, collagen, thực phẩm chức năng, HPLC

1. Đặt vấn đề

Collagen là một loại protein hay có mặt trong các mô thịt và mô liên kết của động vật có vú [4]. Collagen được sử dụng phổ biến trong lĩnh vực công nghiệp thực phẩm (làm chất gây đông, tạo độ dẻo, ngăn chặn mất nước...), mỹ phẩm (làm chất giữ ẩm cho da, giảm nếp nhăn trong phẫu thuật thẩm mỹ), và đặc biệt được công bố đưa vào thành phần của ngày càng nhiều loại thực phẩm chức năng. Vì vậy, việc ban hành một phương pháp phân tích có đủ độ chính xác, độ đúng và độ tin cậy để xác định hàm lượng collagen trong các chế phẩm công bố chứa thành phần này là một yêu cầu thực tế trong kiểm nghiệm. Đã có nhiều phương pháp phân tích collagen được công bố, nhưng đơn giản và có độ đặc hiệu cao là tiến hành thủy phân hoàn toàn collagen, sau đó phân tích hydroxyprolin, sản phẩm thủy phân có thành phần ổn định trong cấu tạo của collagen ($13,4 \pm 0,24\%$) [5] và đặc trưng cho thành phần cấu trúc protein này, bằng các kỹ thuật khác nhau như đo quang [2], sắc ký lỏng hiệu năng cao [3]. Từ hàm lượng hydroxyprolin, chuyển đổi qua hệ số 7,46 sẽ thu được hàm lượng collagen trong mẫu [5]. Trong nghiên cứu này, một phương pháp phân tích collagen toàn phần trong một số thực phẩm chức năng đã được xây dựng bao gồm quá trình thủy phân collagen trong môi trường acid và quá trình định lượng sản phẩm thủy phân hydroxyprolin bằng HPLC.

2. Thực nghiệm

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

2.1.1. Thiết bị, dụng cụ

- Cột sắc ký Alltech Alltima C18 (250 x 4,6 mm, 5 μ m);
- Máy sắc ký lỏng hiệu năng cao Hitachi (Nhật) được trang bị detector huỳnh quang;
- Máy đo pH Metrohm 691 (Đức);
- Bộ lọc nước siêu tinh khiết Elga (Đức);
- Cân phân tích Sartorius TE 214S có độ chính xác tới 0,1 mg (Đức);
- Dụng cụ thủy tinh chính xác loại A (bình định mức, pipet...), màng lọc có đường kính lỗ lọc 0,45 μ m.

2.1.2. Hóa chất, chất chuẩn

- Chất đối chiếu: Hydroxyprolin (Sigma-Aldrich,

hàm lượng 99,0% theo nguyên trạng);

- Hóa chất tinh khiết phân tích: Acid hydrochloric, acid phosphoric, EDTA, triethylamin, 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamat (AHC), natri tetraborat, natri hydroxyd (Merck, Đức);

- Dung môi tinh khiết sắc ký: Acetonitril (Merck, Đức);

- Dung dịch thuốc thử AHC: Chuẩn bị dung dịch 10 mM của AHC trong acetonitril;

- Dung dịch đệm tạo dẫn xuất: Chuẩn bị dung dịch đệm natri tetraborat 0,2 M pH 8,8;

- Dung dịch đệm cho pha động HPLC: Hòa tan 11,48 g natri acetat, 1 mg EDTA vào 900 ml nước, thêm 1 ml triethylamin, chỉnh pH về 5,0 bằng acid phosphoric đặc và thêm nước đủ 1000 ml.

2.2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Đối tượng nghiên cứu

+ Các mẫu thực phẩm chức năng dạng nang cứng hoặc bột có công bố chứa collagen trên nhãn (mã hóa lần lượt là mẫu M1, M2, M3, M4, M5, M6) mua trên thị trường, các mẫu này đều không nói rõ hàm lượng collagen cụ thể trong từng viên hoặc gói bột.

2.2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.2.1. Xử lý mẫu

Cân chính xác khoảng 0,1000 g mẫu đã nghiền mịn, đồng nhất vào ống nghiệm có nắp xoáy, vừa sục khí ni to vào ống vừa nhỏ từ từ 3 ml dung dịch acid hydrochloric 4 N. Đậy nắp, lắc xoáy trong 30 giây, rồi thủy phân ở nhiệt độ 125°C trong 24 giờ. Để nguội về nhiệt độ phòng, thêm vào ống 3 ml dung dịch natri hydroxyd 4N. Dùng nước cất chuyển toàn bộ lượng dung dịch trong ống nghiệm sang bình định mức 50 ml, dùng nước tráng rửa ống nghiệm, chuyển dịch rửa sang bình định mức và thêm nước vừa đủ đến vạch. Lọc qua giấy lọc và màng lọc 0,45 μ m. Dùng dịch lọc này làm dung dịch mẫu để định lượng hydroxyprolin.

2.2.2.2. Điều kiện sắc ký

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

- Cột Alltech Alltima C18 (250 x 4,6 mm, 5 μ m) duy trì ở nhiệt độ phòng.

- Hệ thống sắc ký lỏng Hitachi LaChrom trang bị detector huỳnh quang Hitachi L-7480 (bước sóng kích thích 250 nm, bước sóng phát xạ 395 nm).

- Thể tích tiêm mẫu: 20 μ l.

- Pha động: Acetonitril – dung dịch đệm – nước, theo chương trình gradient dung môi (Bảng 1), tốc độ dòng duy trì ở 1 ml/phút.

- Dung dịch chuẩn: Hydroxyprolin chuẩn được hòa tan trong nước ở nồng độ 1 mg/ml để làm dung dịch gốc, sau đó pha loãng chính xác tới các nồng độ mong muốn để xây dựng đường chuẩn cho phân tích mẫu và thẩm định phương pháp.

- Dung dịch thử: Sử dụng dịch lọc thu được sau quá trình xử lý mẫu theo 2.2.2.1.

- Mẫu trắng: Cân khoảng 0,1 g thực phẩm chức năng không chứa collagen đã nghiền mịn, tiến hành xử lý như ở mục 2.2.2.1 cho tới khi thu được dịch lọc.

- Tạo dẫn xuất cho hydroxyprolin: Hút 10 μ l dung dịch chuẩn hydroxyprolin hoặc dung dịch mẫu vào ống phản ứng, thêm 10 μ l thuốc thử AHC, 80 μ l dung dịch đệm natri tetraborat 0,2 M pH 8,8. Lắc xoáy 10 giây, để trong bể cách thủy ở 55°C trong 10 phút, làm nguội nhanh về nhiệt độ phòng và tiêm vào hệ thống sắc ký.

Bảng 1. Chương trình gradient dung môi

Thời gian (phút)	Đệm (%)	ACN (%)	Nước (%)
0,01	100	0	0
0,50	95	5	0
15,00	90	10	0
20,00	67	33	0
20,01	0	60	40
25,00	0	40	60
25,01	100	0	0
30,00	100	0	0

3. Kết quả và bàn luận

3.1. Thẩm định phương pháp

- **Độ đặc hiệu:** Phân tích dung dịch chuẩn hydroxyprolin bằng các điều kiện sắc ký đã chọn, trên sắc ký đồ thu được pic của dẫn xuất hydroxyprolin-AHC với thời gian lưu khoảng 10 phút. Trên sắc ký đồ mẫu trắng không xuất hiện pic này, trong khi đó trên sắc ký đồ mẫu thực phẩm chức năng công bố chứa collagen cũng xuất hiện pic hydroxyprolin-AHC ở cùng thời gian lưu so với dung dịch chuẩn (Hình 1). Như vậy, quy trình được xây dựng cho phép phân tích được một cách đặc hiệu hydroxyprolin để làm cơ sở ngoại suy ra hàm lượng collagen trong chế phẩm.

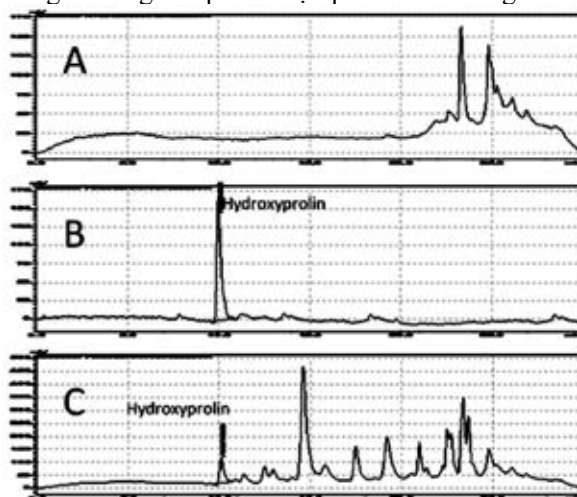
- **Độ thích hợp của hệ thống sắc ký:** Được đánh giá qua phân tích 6 lần trên dung dịch chuẩn hydroxyprolin 30 μ g/ml. Độ lặp lại về diện tích pic và thời gian di chuyển của pic đều tốt thể hiện qua độ lệch chuẩn tương đối đều nhỏ hơn 2,0% (Bảng 2).

- **Khoảng tuyến tính:** Chuẩn hydroxyprolin được chuẩn bị thành 6 dung dịch có nồng độ dao động từ 3,1 đến 116,4 μ g/ml. Kết quả thực nghiệm (Bảng 3) cho thấy trong khoảng nồng độ này có quan hệ tuyến tính chặt chẽ giữa nồng độ lý thuyết của mỗi đồng phân đối quang của hydroxyprolin và diện tích pic trên sắc ký đồ.

- **Độ lặp lại trong ngày và độ chính xác trung gian:** Được đánh giá qua độ lặp lại của hàm lượng hydroxyprolin trên mẫu M1 sau 6 lần phân tích độc lập trong ngày và khác ngày. Kết quả thực nghiệm cho thấy hàm lượng xác định được của hydroxyprolin có độ lặp lại tốt trong ngày và khác ngày (RSD < 2,0%) (Bảng 3).

- **Độ đúng:** Được đánh giá qua độ thu hồi khi thêm chuẩn hydroxyprolin vào nền mẫu ở 3 nồng độ khác nhau, kết quả thực nghiệm cho thấy độ thu hồi tại các mức thêm chuẩn đều đạt yêu cầu của AOAC (Bảng 3).

Phương pháp cũng đã được tiến hành xác định giới hạn phát hiện (LOD) và giới hạn định lượng (LOQ) cho hydroxyprolin (Bảng 3). Như vậy, kết quả thẩm định cho thấy phương pháp đã xây dựng phù hợp với mục đích định lượng hydroxyprolin để đánh giá hàm lượng collagen trong chế phẩm thực phẩm chức năng.



Hình 1. Một số sắc ký đồ đại diện

A. Mẫu trắng; B. Dung dịch chuẩn hydroxyprolin;
C. Dung dịch thử của mẫu M3

Bảng 2. Kết quả đánh giá độ phù hợp của hệ thống sắc ký

Lần tiêm	Diện tích pic (mV.s)	Thời gian lưu (phút)
1	805172	10,219
2	816008	10,074
3	801376	9,987
4	796259	9,993
5	805440	9,962
6	800215	9,947;
Trung bình	804078; n = 6; RSD = 0,8%	10,03; n = 6; RSD = 1,0%

Bảng 3. Tóm tắt kết quả thẩm định phương pháp một số chỉ tiêu

Chỉ tiêu thẩm định	Kết quả thẩm định
Khoảng tuyến tính: - Khoảng nồng độ - Phương trình hồi quy - Hệ số tương quan	3,1 – 116,4 µg/ml $y = 158367x + 116989$ $r = 0,99985$
Độ lặp lại trong ngày (n = 6)	Hàm lượng hydroxyprolin (mg/g) = $10,31 \pm 0,16$ (TB $\pm$ SD); RSD = 1,6%
Độ chính xác trung gian (n = 6, phân tích khác ngày)	Hàm lượng hydroxyprolin trong mẫu (mg/g) = $10,32 \pm 0,19$ (TB $\pm$ SD); RSD = 1,9%
	Nhận xét: Khi đánh giá độ lặp lại trong ngày và độ chính xác trung gian, kết quả hàm lượng xác định bằng thực nghiệm của cả 3 hoạt chất đều có RSD < 2,0%. Như vậy, phương pháp có độ chính xác tốt khi định lượng hydroxyprolin
Độ đúng (Thêm chuẩn hydroxyprolin vào nền mẫu chế phẩm thực ở 3 mức khác nhau, mỗi nồng độ 3 lần, xác định tỷ lệ (%) tìm lại được so với lượng thêm vào)	Mức 1: 0,42 mg (nồng độ: 8,4 µg/ml): Tỷ lệ thu hồi: 95,4 – 97,9%; RSD = 1,3% Mức 2: 0,85 mg (nồng độ: 17,0 µg/ml): Tỷ lệ thu hồi: 95,9 – 98,1%; RSD = 1,2% Mức 3: 1,69 mg (nồng độ: 33,8 µg/ml): Tỷ lệ thu hồi: 94,9 – 97,6%; RSD = 1,5%
	Nhận xét: Theo quy định về thẩm định phương pháp của AOAC [1], tỷ lệ thu hồi phải nằm trong khoảng 80 - 110% với nồng độ từ 10 ppm tới < 100 ppm, như vậy phương pháp có độ đúng đạt yêu cầu khi định lượng hydroxyprolin
Giới hạn phát hiện	Hàm lượng hydroxyprolin trong mẫu = 0,31 mg/g (tương đương 2,31 mg collagen/g chế phẩm)
Giới hạn định lượng	Hàm lượng hydroxyprolin trong mẫu = 1,04 mg/g (tương đương 7,76 mg collagen/g chế phẩm)

3.2. Ứng dụng trên mẫu thực phẩm chức năng

Bước đầu ứng dụng phương pháp đã xây dựng trên một số thực phẩm chức năng dạng rắn (bột, nang cứng), kết quả định lượng hydroxyprolin sau thủy phân và quy đổi ra collagen được trình bày trong Bảng 4. Các mẫu M1 đến M6 đều được mua trên thị trường, không có nhãn phụ tiếng Việt, chỉ công bố chung chung có chứa collagen mà không nêu rõ tỷ lệ, hàm lượng. Kết quả phân tích cho thấy cả 6 mẫu đều có collagen nhưng tỷ lệ rất khác nhau. Điều này cho thấy chất lượng của thực phẩm chức năng chứa collagen nói riêng cũng như của thực phẩm chức năng nói chung trên thị trường Việt Nam còn có sự dao động lớn về thành phần, chất lượng, chắc chắn sẽ ảnh hưởng tới hiệu quả sử dụng.

Bảng 4. Kết quả xác định hàm lượng collagen trong một số thực phẩm chức năng

STT	Mã sản phẩm	Dạng bào chế	Hàm lượng hydroxyprolin định lượng được (mg/g)	Hàm lượng collagen quy đổi (mg/g)
1	M1	Nang cứng	10,3	76,8
2	M2	Nang cứng	52,2	389,3
3	M3	Bột	6,7	49,6
4	M4	Nang cứng	7,9	58,9
5	M5	Nang cứng	33,3	248,7
6	M6	Bột	14,3	106,3

4. Kết luận

Phương pháp định lượng hydroxyprolin bằng HPLC với detector huỳnh quang đã được xây dựng nhằm xác định hàm lượng collagen trong thực phẩm chức năng thông qua lượng hydroxyprolin giải phóng ra khi thủy phân collagen bằng acid. Phương pháp đã được thẩm định về độ đặc hiệu, độ đúng, độ chính xác, đánh giá khoảng tuyến tính và xác định giới hạn phát hiện, giới hạn định lượng. Kết quả thẩm định đã chứng minh phương pháp thích hợp với mục đích ứng dụng và đã được dùng để xác định hàm lượng collagen trong một số chế phẩm dạng bột và nang cứng. Những kết quả ban đầu trên các chế phẩm thực phẩm chức năng cho thấy có sự khác biệt rất lớn về hàm lượng collagen giữa chúng, thể hiện sự không đồng đều đáng kể về chất lượng giữa các chế phẩm này.

Tài liệu tham khảo

1. AOAC (2012), “Appendix F: Guidelines for standard method performance requirements”, *AOAC official methods of analysis*, 9.
2. K.Darwin, S.Udenfriend (1960), “A Specific Method for the Analysis of Hydroxyproline in Tissues and Urine”, *Analytical Biochemistry*, pp. 228-239.
3. J. Henderson et al. (2000), “Rapid, Accurate, Sensitive, and Reproducible HPLC Analysis of Amino Acids”, *Agilent technologies*. 5980.
4. P.Fratzl (2008), *Collagen Structure and Mechanics*, Springer Science+Business Media, 516, 1-2.
5. R.Neuman, M.Logan (1950), “The determination of collagen and elastin in tissues”, *J. Biol. Chem.* 186, 549-556.

SUMMARY

A simple HPLC method has been developed for the assay of Hydroxyproline released from Collagen after acidic hydrolysis. This method was carried out in a C18 column, with a mixture of acetat buffer – Acetonitrile – Water as mobile phase using gradient elution. The detection of Hydroxyproline was done with a fluorescent detector (exciting wavelength: 250 nm, emitting wavelength: 395 nm) after derivatization with 6-Aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamate. The method was validated in terms of system suitability, specificity, linearity and precision, and the obtained validation results are suitable for the separation of enantiomers of Hydroxyprolin. After validation, the method was applied to determine the collagen content in several nutrition supplement products.

(Ngày nhận bài: 14/12/2017 ; Ngày phản biện: 01/3/2018 ; Ngày duyệt đăng: 09/4/2018)

ĐÁNH GIÁ ĐỘC TÍNH CẤP VÀ BÁN TRƯỜNG DIỄN CỦA VIÊN GOUT TÂM BÌNH

TRẦN THỊ THANH HUẾ, NGUYỄN THỊ LIÊN, ĐOÀN CAO SON
Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương

Từ khóa: Thử độc tính cấp, thử độc tính bán trường diễn, viên gout Tâm Bình

1. Đặt vấn đề

Thuốc đông y, thuốc từ dược liệu đã được sử dụng từ lâu đời ở Việt Nam cũng như nhiều nước châu Á và thế giới và thực sự đã có những đóng góp quan trọng trong công tác chăm sóc sức khỏe, phòng bệnh và chữa bệnh trong cộng đồng. Để góp phần xây dựng nguyên tắc để đánh giá tính an toàn, hiệu quả, tạo điều kiện đánh giá thống nhất kết quả nghiên cứu, Bộ Y tế đã ban hành hướng dẫn “Thử nghiệm tiền lâm sàng và lâm sàng thuốc Đông y, thuốc từ dược liệu” (ban hành kèm theo Quyết định số 141/QĐ-K2ĐT ngày 27/10/2015) [2]. Trong đó, nghiên cứu độc tính cấp và bán trường diễn là chỉ tiêu quan trọng để bước đầu đánh giá tính an toàn của các thuốc Đông y, thuốc từ

dược liệu. Trong nghiên cứu này chúng tôi tiến hành đánh giá độc tính cấp và độc tính bán trường diễn của sản phẩm có nguồn gốc dược liệu được phân phối rộng rãi trên thị trường đó là “Viên gout Tâm Bình” do Công ty TNHH SX & TM Dược phẩm Tâm Bình sản xuất.

2. Thực nghiệm

2.1. Thiết bị, dụng cụ, hóa chất

- Máy xét nghiệm sinh hóa (Beckman Coulter AU 680, Mỹ);
- Máy xét nghiệm huyết học (Sysmex XS-1000I, Nhật Bản);
- Máy li tâm lạnh (Eppendorf 5804 R, Đức);

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

2.2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Động vật thí nghiệm

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

Thỏ trưởng thành khỏe mạnh, cả 2 giống (đực và cái), cân nặng 2,0 - 2,5 kg, đạt tiêu chuẩn thí nghiệm do Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương cung cấp.

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

2.2.2. Thuốc nghiên cứu

Thực phẩm chức năng “Viên gout Tâm Bình” do Công ty TNHH SX & TM Dược phẩm Tâm Bình sản xuất, lô sản xuất: 09012016, hạn dùng: 09/01/2019. Thành phần: Lá Sói rừng, Hy thiêm, Tỳ giải, Cốt khí củ, Mã tiền chế, Đương qui, Độc hoạt, Thỏ phục linh, Ngưu tất, Đỗ trọng, phụ liệu khác.

2.2.3. Phương pháp nghiên cứu

2.2.3.1. Thử độc tính cấp [1],[2],[3]

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

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

Chuẩn bị mẫu thử: Cân chính xác một lượng bột thuốc trong nang. Nghiền kỹ trong cối sứ, cho nước cất từ từ vào, khuấy trộn thành hỗn dịch đồng nhất, sau đó thêm nước vừa đủ để thu được hỗn dịch chứa 0,25 g mẫu thử/ml nước (hỗn dịch thử).

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

Theo dõi biểu hiện của chuột (về thể trạng, hành vi, vận động, tình trạng ăn, uống, phân, nước tiểu,...) sau khi uống trong 24 giờ đầu và theo dõi hoạt động của chuột trong thời gian 7 ngày sau khi uống.

2.2.3.2. Thử độc tính bán trường diễn [2],[5],[6]

Nghiên cứu độc tính bán trường diễn được tiến hành trên 3 nhóm thỏ gồm 1 nhóm chứng và 2 nhóm thử, mỗi nhóm 7 con. Hai nhóm thử được cho uống mẫu thử với liều 0,375 viên/kg thỏ (5 ml hỗn dịch B/kg thỏ) và liều 0,750 viên/kg thỏ (5 ml hỗn dịch A/kg thỏ). Nhóm chứng: cho uống nước hàng ngày (dùng để tham chiếu). Cho thỏ uống bằng cách bơm thuốc qua ống thông (sonde) được luồn từ miệng vào thẳng dạ dày thỏ. Thời gian uống liên tục 28 ngày.

Mẫu thử: Chuẩn bị 2 hỗn dịch có nồng độ khác nhau.

- Hỗn dịch A (nồng độ 0,150 viên/ml): Nghiền lượng bột thuốc có trong 24 viên gout Tâm Bình trong cối sứ, cho nước cất từ từ vào, khuấy trộn thành hỗn dịch đồng nhất, sau đó thêm nước vừa đủ 160 ml.

- Hỗn dịch B (nồng độ 0,075 viên/ml): Lấy 40 ml hỗn dịch A thêm 80 ml nước, trộn đều thu được 120 ml hỗn dịch B.

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

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

3. Kết quả và bàn luận

3.1. Độc tính cấp

Trước tiên chúng tôi tiến hành nghiên cứu sơ bộ để tìm mức liều không làm chết chuột thí nghiệm và mức liều làm chết 100% số chuột thí nghiệm. Qua thử nghiệm này, chúng tôi đã tìm được liều không gây chết chuột là 2,5 g mẫu thử/kg chuột, liều gây chết 100% số chuột thử nghiệm là 7,5 g mẫu thử/kg chuột.

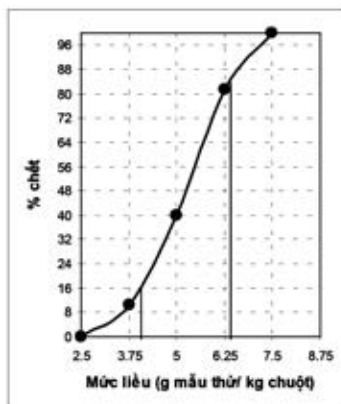
Tiếp đó ở thử nghiệm chính thức, chúng tôi cho chuột uống với 5 mức liều tăng dần như ở Bảng 1.

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

Mức liều	Liều thử (g mẫu thử/kg chuột)	Số chuột chết/ số thực tế	Số chuột chết/ số kỳ vọng	% Chết
1	2,50	0/10	0/27	0
2	3,75	2/8	2/17	10,53
3	5,00	4/6	6/9	40,00
4	6,25	7/3	13/3	81,25
5	7,50	10/0	23/0	100

Sau khi uống thuốc, chuột có các biểu hiện ngộ độc tùy theo mức liều uống. Ở mức liều thấp (2,5 g/kg chuột) không nhận thấy có biểu hiện ngộ độc, ở mức liều trong khoảng từ 3,75 g đến 7,5 g mẫu thử/kg chuột, chuột có biểu hiện mệt mỏi, số chuột chết có biểu hiện co giật. Số chuột không chết ở các mức liều trên có biểu hiện giảm hoạt động, mệt mỏi. Sau 24 giờ, số chuột không chết ăn uống hoạt động bình thường trở lại.

Đồ thị số liệu độc tính cấp thực nghiệm của viên gout Tâm Bình được thể hiện ở Hình 1.



Hình 1. Đồ thị số liệu độc tính cấp

LD₅₀ được tính theo phương pháp Behrens [2] theo công thức:

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

Trong đó:

A: Liều gây chết a % ĐVTN

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

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

d: khoảng cách giữa các liều (g)

Dựa trên bảng số liệu ta có:

$$a = 40,00\%$$

$$b = 81,25\%$$

$$A = 5,00 \text{ (g/kg chuột)}$$

$$d = 1,25 \text{ (g/kg chuột)}$$

Như vậy:

$$LD_{50} = 5,00 + (50 - 40) \times 1,25 / (81,25 - 40,00)$$

$$LD_{50} = 5,303 \text{ g mẫu thử/kg chuột.}$$

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

Trong đó: k: Hệ số Behrens = 0,66

n: Số chuột trong mỗi nhóm

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

Với LD₈₄ và LD₁₆ là các mức liều gây chết 84% và 16% động vật thí nghiệm trên đồ thị số liệu độc tính cấp.

Theo đồ thị, ta có: LD₁₆ = 4,0 g mẫu thử/kg chuột, LD₈₄ = 6,5 g mẫu thử/kg chuột.

Giá trị s = (6,5 - 4,0) / 2 = 1,25 g mẫu thử/kg chuột.

Sai số chuẩn: $(Es_{LD50})^2 = ksd / n = 0,66 \times 1,25 \times 1,25 / 10$ nên $S_{LD50} = 0,321 \text{ g mẫu thử/kg chuột}$

Vậy $LD_{50} = (5,303 \pm 0,321) \text{ g mẫu thử/kg chuột.}$

3.2. Độc tính bán trường diễn

Trước tiên chúng tôi lựa chọn mức liều thử nghiệm cho nghiên cứu thử độc tính bán trường diễn của sản phẩm viên gout Tâm Bình dựa trên liều sử dụng tối đa trên người là 6 viên/người/ngày) và sử dụng hệ số chuyển đổi liều giữa thỏ và người là 3,1 [6] để lựa chọn 2 mức liều thử nghiệm là 0,375 viên/kg thỏ (tương ứng với mức liều dự kiến cho người là 6 viên/người 50 kg/ngày) và 0,750 viên/kg thỏ (cao gấp 2 lần liều dự kiến cho người).

3.2.1. Kết quả theo dõi cân nặng thỏ

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

Bảng 2. Số liệu cân nặng thử

Nhóm (n = 7)	Kết quả cân nặng (kg)					P
	Trước TN (m ₀)	Sau 1 tuần (m ₁)	Sau 2 tuần (m ₂)	Sau 3 tuần (m ₃)	Sau 4 tuần (m ₄)	
Chứng (C)	2,12 ± 0,27	2,23 ± 0,22	2,29 ± 0,19	2,36 ± 0,12	2,40 ± 0,13	P _{trước-sau} < 0,05
% so với trước thử nghiệm		105,8%	108,8%	112,7%	114,8%	
Thử 1 (T1)	2,08 ± 0,09	2,19 ± 0,10	2,23 ± 0,14	2,28 ± 0,10	2,37 ± 0,12	P _{trước-sau} < 0,05 P _{trước (T1-C)} > 0,05 P _{sau (T1-C)} > 0,05
% so với trước thử nghiệm		105,6%	107,4%	110,0%	114,5%	
Thử 2 (T2)	2,13 ± 0,14	2,21 ± 0,17	2,31 ± 0,17	2,37 ± 0,19	2,45 ± 0,15	P _{trước-sau} < 0,05 P _{trước (T2-C)} > 0,05 P _{sau (T2-C)} > 0,05
% so với trước thử nghiệm		103,8%	108,6%	111,0%	114,8%	

3.2.2. Kết quả theo dõi các chỉ số huyết học

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

Bảng 3. Kết quả theo dõi các chỉ số huyết học thử của các nhóm thử nghiệm

Chỉ số		Hồng cầu (x 10 ¹² /lít)	Bạch cầu (x 10 ⁹ /lít)	Tiểu cầu (x 10 ⁹ /lít)	Hematocrit (%)	Hemoglobin (g/dl)
Chứng (n = 7)	Trước TN	5,5 ± 0,8	9,0 ± 2,1	462,7 ± 145,5	37,8 ± 5,4	11,3 ± 1,6
	Giữa TN	5,6 ± 0,4	10,6 ± 1,0	419,9 ± 69,2	39,6 ± 2,0	11,6 ± 0,9
	Sau TN	6,1 ± 0,4	9,6 ± 2,2	420,7 ± 50,3	42,1 ± 1,6	12,7 ± 0,6
Thử 1 (n = 7)	Trước TN	5,3 ± 0,4	8,7 ± 1,2	573,9 ± 63,3	37,0 ± 2,0	10,9 ± 0,5
	Giữa TN	5,7 ± 0,5	9,3 ± 1,9	367,6 ± 63,4	38,8 ± 2,7	12,0 ± 0,9
	Sau TN	5,9 ± 0,4	9,5 ± 2,9	397,1 ± 50,3	40,4 ± 2,1	12,2 ± 1,1
Thử 2 (n = 7)	Trước TN	5,5 ± 0,5	10,5 ± 2,8	502,3 ± 146,2	36,9 ± 2,4	11,2 ± 0,7
	Giữa TN	5,8 ± 0,4	9,8 ± 2,1	432,3 ± 72,7	38,1 ± 2,0	11,5 ± 0,7
	Sau TN	6,1 ± 0,3	9,9 ± 1,3	470,7 ± 92,9	40,9 ± 1,8	12,6 ± 0,4

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

Chỉ số		Hồng cầu	Bạch cầu	Tiểu cầu	Hematocrit	Hemoglobin
P	Trước TN					
	P _{C-T1}	0,554	0,750	0,089	0,729	0,577
	P _{C-T2}	0,893	0,271	0,621	0,705	0,966
Giữa TN	P _{C-T1}	0,552	0,150	0,166	0,505	0,378
	P _{C-T2}	0,414	0,404	0,749	0,179	0,875
Sau TN	P _{C-T1}	0,300	0,927	0,398	0,123	0,296
	P _{C-T2}	0,900	0,796	0,234	0,229	0,710

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

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

Bảng 5. Kết quả theo dõi các chỉ số sinh hóa (gan, thận) của thỏ của các nhóm thử nghiệm

Chỉ số Nhóm		AST (U/lit)	ALT (U/lit)	Bilirubin toàn phần ($\mu\text{mol/lit}$)	Protein toàn phần (g/lit)	Cholesterol (mmol/l)	Creatinin ($\mu\text{mol/l}$)	Urea (mmol/l)
Chứng (n = 7)	Trước TN	29,9 $\pm$ 14,0	59,9 $\pm$ 20,6	0,9 $\pm$ 0,4	56,7 $\pm$ 2,4	1,6 $\pm$ 0,6	72,6 $\pm$ 5,5	4,9 $\pm$ 0,5
	Giữa TN	35,4 $\pm$ 12,1	61,4 $\pm$ 6,4	1,2 $\pm$ 0,4	61,2 $\pm$ 5,6	1,5 $\pm$ 0,5	72,7 $\pm$ 16,4	4,9 $\pm$ 0,9
	Sau TN	23,9 $\pm$ 6,7	47,9 $\pm$ 17,5	1,2 $\pm$ 0,8	57,9 $\pm$ 4,9	1,4 $\pm$ 0,6	90,1 $\pm$ 12,2	5,4 $\pm$ 0,9
Thử 1 (n = 7)	Trước TN	41,5 $\pm$ 12,6	69,9 $\pm$ 18,3	1,3 $\pm$ 0,4	58,6 $\pm$ 2,6	1,9 $\pm$ 0,5	76,4 $\pm$ 6,2	5,3 $\pm$ 1,1
	Giữa TN	40,3 $\pm$ 9,8	63,3 $\pm$ 14,6	1,3 $\pm$ 0,4	63,6 $\pm$ 5,5	1,2 $\pm$ 0,3	86,4 $\pm$ 9,7	4,4 $\pm$ 1,6
	Sau TN	33,3 $\pm$ 11,4	56,1 $\pm$ 15,2	1,5 $\pm$ 0,6	60,7 $\pm$ 5,4	1,5 $\pm$ 0,4	84,0 $\pm$ 12,9	5,7 $\pm$ 0,6
Thử 2 (n = 7)	Trước TN	31,3 $\pm$ 9,5	64,4 $\pm$ 27,0	1,2 $\pm$ 0,5	56,2 $\pm$ 2,5	2,2 $\pm$ 0,7	71,1 $\pm$ 4,8	4,7 $\pm$ 0,5
	Giữa TN	43,1 $\pm$ 18,4	74,3 $\pm$ 20,1	1,2 $\pm$ 0,5	64,4 $\pm$ 3,1	1,2 $\pm$ 0,3	81,3 $\pm$ 8,2	4,5 $\pm$ 1,2
	Sau TN	34,3 $\pm$ 19,6	64,7 $\pm$ 29,0	1,2 $\pm$ 0,3	59,8 $\pm$ 4,3	1,5 $\pm$ 0,6	86,9 $\pm$ 10,9	5,4 $\pm$ 0,7

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

Chỉ số p		AST	ALT	Bilirubin toàn phần	Protein toàn phần	Cholesterol	Creatinin	Urea
Trước TN	P_{C-T1}	0,131	0,353	0,128	0,186	0,347	0,241	0,473
	P_{C-T2}	0,835	0,728	0,305	0,717	0,123	0,595	0,489
Giữa TN	P_{C-T1}	0,426	0,763	0,606	0,431	0,160	0,082	0,454
	P_{C-T2}	0,373	0,149	0,895	0,200	0,208	0,240	0,420
Sau TN	P_{C-T1}	0,084	0,363	0,495	0,321	0,676	0,381	0,523
	P_{C-T2}	0,223	0,212	0,966	0,437	0,661	0,608	0,939

3.2.4. Quan sát đại thể

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

3.2.5. Quan sát vi thể

Lấy mẫu tiêu bản gan, thận trên 3 thỏ ngẫu nhiên trong từng nhóm thí nghiệm và nhóm chứng, tiêu bản quan sát vi thể. Tiêu bản gan và thận được cố định bằng Formalin 10%, nhuộm bằng dung dịch nhuộm

Hematoxylin eosin (He) và Perioric acid Shiff (PAS) và quan sát dưới kính hiển vi điện tử độ phóng đại 100 và 400. Các thỏ thử nghiệm đều có gan và thận không bị tổn thương, hình ảnh cấu trúc trong giới hạn bình thường. Không có các triệu chứng bất thường liên quan đến mẫu thử với 2 mức liều khác nhau so với nhóm chứng.

Cấu trúc gan không bị đảo lộn, nhận rõ các tiểu thùy với tĩnh mạch trung tâm và các 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 có khả năng hồi phục (bao gồm thoái hóa nước và thoái hóa hạt), một số tế bào lắng đọng glycogen trong bào tương. Các khoảng cửa không tăng sinh xơ, không tăng sinh ống mật, không thấy xâm nhập tế bào viêm.

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

4. Kết luận

Kết quả thu được trong nghiên cứu này cho thấy mẫu thử viên gout Tâm Bình có $LD_{50} = (5,303 \pm 0,321)$ g mẫu thử/kg chuột. Theo phân loại độc tính

của GHS [3], mẫu thử viên gout Tâm Bình có độc tính thấp dưới ngưỡng phân loại.

Khi cho thử uống mẫu thử với 2 mức liều là 0,375 viên/kg thể trọng/ngày (tương ứng với mức liều tối đa dùng cho người là 6 viên/người/ngày) và mức liều 0,750 viên/kg thể trọng/ngày (cao gấp 3 lần so với liều tối đa dùng cho người), trong 28 ngày không thấy có ảnh hưởng có ý nghĩa thống kê đến thể trạng, chức năng tạo máu và mô bệnh học gan thận trong suốt quá trình uống. Không nhận thấy sự bất thường và khác nhau về hình dạng bên ngoài, màu sắc của các tổ chức tim, gan, thận, phổi và hệ tiêu hóa khi quan sát đại thể cũng như cấu trúc của gan, thận khi quan sát vi thể của thử giữa nhóm chứng và 2 nhóm thử.

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

Tài liệu tham khảo

1. Đỗ Trung Đàm (2014), *Phương pháp xác định độc tính cấp của thuốc*, NXB. Y học, Hà Nội.
2. *Hướng dẫn thử nghiệm tiền lâm sàng thuốc Đông y, thuốc từ dược liệu* (Ban hành kèm theo Quyết định số 141/QĐ-K2ĐT ngày 27/10/2015 của Bộ Y tế).
3. Behrens B. and Kaber G. (1983), *Mathematics for Naturalists and Agriculturalists*, PWN, Warszawa, p.218.
4. GHS 6th Edition (2015), *Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS)*, United Nations.
5. OECD guidelines for testing of chemical (2008), *Repeated dose 28 - days Oral Toxicity study in Rodents*, OECD 407.
6. Sharma V. and McNeill J. H. (2009), To scale or not to scale: The principles of dose extrapolation, *British Journal of Pharmacology*, 157, 907–921.

SUMMARY

“Vien gout Tam Binh” capsules manufactured by Tam Binh Pharmaceutical Trading Production Company Limited, was evaluated for acute and repeated dose toxicity in mice and rabbits, respectively. The acute toxicity results indicated that LD_{50} of “Vien gout Tam Binh” in mice according to the method of Behrens is (5.303 ± 0.321) g/kg body weight for single dose oral administration (equivalent to 43.1 capsules/50 kg body weight human/day). In the repeated - dose toxicity study, rabbits were administered “Vien gout Tam Binh” with the doses of 0.375 capsules and 0.750 capsules/kg/day for 28 days (equivalent to the dose using on human and the dose of 2 times more than one using on human). Blood sample were taken on day 0, day 14 and day 28 of experiment for hematological, biochemical exams. Liver and kidney samples were taken on day 28 for histopathological determinations. After 14 and 28 days, blood and tissue samples were taken for hematological, biochemical and histopathological determinations. The repeated dose toxicity results revealed that there were no significant differences in hematological and serum biochemical values between control and treatment animals. Furthermore, no histopathological changes in the liver and kidney of rabbits treated with “Vien gout Tam Binh” were observed.

(Ngày nhận bài: 29/11/2017; Ngày phản biện: 01/3/2018 ; Ngày duyệt đăng: 15/6/2018)

THUỐC KHÔNG ĐẠT CHẤT LƯỢNG ĐÃ ĐƯỢC BỘ Y TẾ XỬ LÝ TỪ 01/12/2017 ĐẾN 31/5/2018

HÀ THỊ MINH CHÁU
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 01/12/2017 đến 31/5/2018 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: 16 thuốc bị đình chỉ và thu hồi, 03 thuốc giả và rút số đăng ký của 24 thuốc.

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

Danh mục đình chỉ lưu hành thuốc từ ngày 01/12/2017 đến ngày 31/05/2018

Số lô	Số lô	Số lô	Ngày sản xuất	Hạn dùng	Tên cơ sở sản xuất	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 nang mềm Bluetec	010617	19/06/2017	19/06/2020	VD-22179-15 VN-13058-11	Công ty Cổ phần Dược phẩm Medisun	Công ty Cổ phần Xuất nhập khẩu Y tế TP. Hồ Chí Minh	Độ hòa tan	Công văn: số 20508/QLD-CL ngày 06/12/2017	Đình chỉ lưu hành và thu hồi toàn quốc
2	Viên nén bao phim XPOXIME-200	X02Q01	11/06/2019	11/06/2019	VD-12544-10	Mediwin Pharmaceuticals (India)	Công ty Cổ phần Sản xuất thương mại Dược phẩm Đông Nam	Định lượng	Công văn: số 20509/QLD-CL ngày 06/12/2017	Như trên
3	Viên nang cứng Sulpiride DNP 50 mg	507102	26/06/2018	26/06/2018	VD-12544-10	Công ty Cổ phần Sản xuất thương mại Dược phẩm Đông Nam	Công ty Cổ phần Sản xuất thương mại Dược phẩm Đông Nam	Độ hòa tan	Công văn: số 20819/QLD-CL ngày 11/12/2017	Như trên
4	Viên nang cứng Sulpiride DNP 50 mg	607103	23/11/2016	23/11/2019	Như trên	Như trên	Như trên	Như trên	Như trên	Như trên
5	Viên nang Virazom	1161709	18/5/2017	17/5/2020	VN-17500-13	Zim Laboratories Ltd., India	Công ty Cổ phần Dược phẩm Thiết bị Y tế Hà Nội	Độ hòa tan	Công văn: số 21804/QLD-CL ngày 21/12/2017	Như trên
6	Thuốc khớp Phong Đan	225615	03/07/2015	02/07/2018	VD-12458-10	Công ty Cổ phần Dược Trung ương Mediplantex	Công ty Cổ phần Dược phẩm Thiết bị Y tế Hà Nội	Không đạt tiêu chuẩn chất lượng theo đăng ký	Công văn: số 22002/QLD-CL ngày 25/12/2017	Như trên
7	Dung dịch thuốc tiêm Bmaxzyme	VN20170401		01/04/2020	VN-15751-12	Kunming Pharmaceutical Corp. (China)	Công ty Cổ phần Dược phẩm Nam Hà	Định lượng	Công văn: số 449/QLD-CL ngày 11/01/2018	Như trên
8	Viên nén Misoprostol	0207		20/03/20	VD-20509-14	Công ty Cổ phần Dược phẩm Ba Đình	Công ty Cổ phần Dược phẩm Nam Hà	Đồng đều hàm lượng, Độ hòa tan, Định lượng	Công văn: số 4764/QLD-CL ngày 20/03/2018	Như trên
9	Viên nén Misoprostol	Tất cả các lô hiện đang lưu hành			Như trên	Như trên	Công ty Cổ phần Dược phẩm Nam Hà	Như trên	Công văn: số 5674/QLD-CL ngày 02/04/2018	Như trên

10	Nhức khớp Tiêu bại hoàn	Tất cả các lô hiện đang lưu hành			Chưa có	Cơ sở Đồng nam Dược Đại An			Thuốc đông được được liệu có chứa Paracetamol	Công văn: số 6406/ QLD-CL ngày 11/04/2018	Như trên
11	Viên nang cứng Oridiner 300mg	614204	10/11/2019		VD-25255-16	Công ty Cổ phần Dược phẩm Phương Đông			Độ hòa tan	Công văn: số 7314/ QLD-CL ngày 26/04/2018	Như trên
12	Viên nén phân tán Hesopak	7011	29/06/2017	31/05/2019	VN-17911-14	M/S Stallion Laboratories Pvt. Ltd (India)	Công ty TNHH Xuất nhập khẩu Y tế Delta	Tính chất, Khối lượng, Khối lượng trung bình, Độ dày viên, Độ hòa tan		Công văn: số 7371/ QLD-CL ngày 02/05/2018	Như trên
13	Viên nén bao phim Ciar 500	C-23001	01/12/2016	30/09/2019	VN-8455-09	Lyka lab limited - India	Công ty TNHH MTV Vimedimex Hà Nội	Độ hòa tan		Công văn: số 7375/ QLD-CL ngày 02/05/2018	Như trên
14	Nexium 20mg				GPNK 16738/QLD- KD			Thuốc chưa được phép lưu hành, mạo danh doanh nghiệp		Công văn: số 9611/ QLD-CL ngày 30/05/2018	Như trên
15	Nexium 40mg				GPNK 2765/ QLD-KD			Thuốc chưa được phép lưu hành, mạo danh doanh nghiệp		Công văn: số 9611/ QLD-CL ngày 30/05/2018	Như trên
16	Viên nang cứng Neopeptine	R17072	20/11/2017	19/11/2019	VN-17152-13	Raptakos, Brett&Co., Ltd (India)	Công ty Cổ phần Dược phẩm Bến Tre	Hàm lượng Amylase		Công văn: số 9877/ QLD-CL ngày 31/05/2018	Như trên

Danh mục thuốc bị rút số đăng ký từ ngày 01/12/2017 đến ngày 31/05/2018

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	Dầu gió kim	GC-242-15	Công ty TNHH Pierre Fabre Việt Nam	Công ty Cổ phần Dược phẩm Sanofi - Synthelabo Việt Nam	Quyết định số 41/QĐ-QLD ngày 16/01/2018	Rút SDK tự nguyện
2	Mircera	QLSP-0723-13	Roche Diagnostics GmbH	F. Hoffmann - La Roche Ltd	Như trên	Như trên
3	Pegasys	QLSP-1008-17	F. Hoffmann - La Roche Ltd	Như trên	Như trên	Như trên
4	Pegasys	QLSP-956-16	Như trên	Như trên	Như trên	Như trên
5	Avastin	QLSP-925-16	Như trên	Như trên	Như trên	Như trên
6	Avastin	QLSP-924-16	Như trên	Như trên	Như trên	Như trên
7	Avastin	QLSP-1049-17	Như trên	Như trên	Như trên	Như trên

8	Actemra	VN-16756-13	Chugai Pharma manufacturing Co., Ltd	Như trên	Như trên	Như trên
9	Tamiflu	VN-16483-13	F. Hoffmann - La Roche Ltd	Như trên	Như trên	Như trên
10	Tamiflu	VN-16261-13	Roche S.p.A	Như trên	Như trên	Như trên
11	Tamiflu	VN-16260-13	Roche S.p.A	Như trên	Như trên	Như trên
12	Xeloda	VN-16258-13	Productos Roche S.A.de C.V	Như trên	Như trên	Như trên
13	Androcur	VN-19564-16	Bayer Weimar GmbH und Co., KG	Bayer (South East Asia) Pte, Ltd.	Như trên	Như trên
14	Ventavis	VN-19795-16	Berlmed S.A	Như trên	Như trên	Như trên
15	Androcur	VN-18165-14	Delpharm Lille SAS	Như trên	Như trên	Như trên
16	Asmolex 80	VD-26218-17	Công ty Cổ phần Dược phẩm OPV	Công ty Cổ phần Dược phẩm OPV	Như trên	Như trên
17	Bivonfort Injection	VN-19090-15	Huons Co. Ltd	Công ty TNHH Dược phẩm Minh Trí	Như trên	Như trên
18	Duac Once Daily Gel	VN-19962-16	Glaxo Operation UK Limited	GlaxoSmithKline Pte., Ltd.	Như trên	Như trên
19	Peg-Intron ClearClick	QLSP-873-15	MSD International GmbH (Singapore Branch)	Merck Sharp & Dohme (Asia) Ltd	Như trên	Như trên
20	Peg-Intron ClearClick	QLSP-874-15	Như trên	Như trên	Như trên	Như trên
21	Peg-Intron ClearClick	QLSP-872-15	Như trên	Như trên	Như trên	Như trên
22	Peg-intron	QLSP-0760-13	Schering - Plough (Brinny) Company	Như trên	Như trên	Như trên
23	Peg-intron	QLSP-0759-13	Như trên	Như trên	Như trên	Như trên
24	Eicinat 500	VD-17323-12	Công ty Cổ phần Euviopharm - Thành viên Tập đoàn F.I.T	Công ty Cổ phần Euviopharm - Thành viên Tập đoàn F.I.T	Như trên	Như trên

Danh mục thuốc giá từ ngày 01/12/2017 đến ngày 31/5/2018

STT	Tên thuốc	Số lô	Ngày sản xuất	Hạn dùng	Số đăng ký GP nhập khẩu	Tên cơ sở sản xuất và đơn vị nhập khẩu ghi trên nhãn	Văn bản xử lý
1	Voltaren 75mg/3ml	711009		9.2019	VN-20041-16	Novartis Famacescutica S.A (Tây Ban Nha)	Công văn: số 20510/QLD-CL ngày 06/12/2017
2	Viên nang Lincomycin 500mg	175		6/2/2019	VN-13960-11	Công ty Cổ phần Dược và VTYT Thanh Hóa	Công văn: số 22214/QLD-CL ngày 26/12/2017
3	Zinnat 500 mg Film Tablet	C763039		Jan-19	14209/QLD-KD	Công ty cổ phần Arnephaco	Công văn: số 6026/QLD-CL ngày 05/04/2018

MỤC LỤC

	Trang
● Nghiên cứu khoa học - Xây dựng, thẩm định phương pháp định lượng Tolperison hydroclorid trong viên nén bằng HPLC. <i>NGUYỄN THU PHƯƠNG, TRẦN THỊ HỒNG ANH</i> - Định lượng đồng thời Piracetam và Cinarizin trong phép thử độ hòa tan bằng phương pháp HPLC. <i>PHẠM HỒNG MINH, NGUYỄN THỊ HẰNG, TRẦN THÚY HẠNH</i> - Tổng hợp và tinh chế 2-methyl-4(5) nitroimidazol để làm tạp chuẩn sử dụng trong kiểm tra chất lượng nguyên liệu và các dạng bào chế của Metronidazol. <i>MAI THANH HÀ, LÊ THỊ THU, LÊ HOÀNG ĐỨC, NGUYỄN VĂN GIANG, ĐOÀN CAO SƠN</i> - Xây dựng và thẩm định phương pháp phân tích Cephalexin trong huyết tương người bằng sắc ký lỏng hiệu năng cao. <i>NGÔ ĐỨC LIÊM, TRẦN HOÀNG, CAO NGỌC CƯỜNG, TẠ MẠNH HÙNG</i> - Xây dựng phương pháp định lượng Hydroxyprolin bằng HPLC với detector huỳnh quang để xác định hàm lượng Collagen toàn phần trong thực phẩm chức năng. <i>LÊ ĐÌNH CHI, TÔNG THỊ THANH VƯỢNG</i> - Đánh giá độc tính cấp và bán trường diễn của viên gout Tâm Bình. <i>TRẦN THỊ THANH HUẾ, NGUYỄN THỊ LIÊN, ĐOÀN CAO SƠN</i> ● Thông tin khoa học - Tin tức - Thuốc không đạt chất lượng đã được Bộ Y tế xử lý từ tháng 12/2017 đến tháng 5/2018. <i>HÀ THỊ MINH CHÁU</i>	1 5 11 16 20 23 29

CONTENTS

	Page
● Scientific researches - Development and validation of HPLC method for determination of Tolperison hydrochloride in tablets. <i>NGUYỄN THU PHƯƠNG, TRẦN THỊ HỒNG ANH</i> - Simultaneous determination of Piracetam and Cinnarizine in the Dissolution test by HPLC method. <i>PHẠM HỒNG MINH, NGUYỄN THỊ HẰNG, TRẦN THÚY HẠNH</i> - Synthesis and purification of 2-Methyl-4(5) nitroimidazole as the impurity reference substance used for quality control of Metronidazol API and dosage forms. <i>MAI THANH HÀ, LÊ THỊ THU, LÊ HOÀNG ĐỨC, NGUYỄN VĂN GIANG, ĐOÀN CAO SƠN</i> - Development and validation of HPLC method for determination of Cephalexin in human plasma. <i>NGÔ ĐỨC LIÊM, TRẦN HOÀNG, CAO NGỌC CƯỜNG, TẠ MẠNH HÙNG</i> - Development of HPLC method with fluorescence detector for assay of Hydroxyproline to determine total Collagen content in nutrition supplement products <i>LÊ ĐÌNH CHI, TÔNG THỊ THANH VƯỢNG</i> - Evaluation of acute and repeated dose toxicity of “Viên gout Tam Bình”. <i>TRẦN THỊ THANH HUẾ, NGUYỄN THỊ LIÊN, ĐOÀN CAO SƠN</i> ● Technical information - News - Substandard pharmaceuticals recalled from December 2017 to May 2018 on decision of Ministry of Health. <i>HÀ THỊ MINH CHÁU</i>	1 5 11 16 20 23 29