

NGHIÊN CỨU ĐỊNH LƯỢNG ACID ACETIC TRONG NGUYÊN LIỆU MAFENID ACETAT BẰNG PHƯƠNG PHÁP HPLC

NGUYỄN VĂN GIANG
Trường Đại học Dược Hà Nội

PHẠM THỊ HÀ, KHÚC HOÀNG PHƯƠNG, TRẦN THÚY HẠNH
Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương

Từ khóa: HPLC, acid acetic, mafenid acetat, nguyên liệu

1. Đặt vấn đề

Mafenid acetat ($C_7H_{10}N_2O_2S.C_2H_4O_2$) là thuốc dùng ngoài da, thuộc nhóm kháng sinh sulfamid, có tác dụng ngăn ngừa và điều trị chứng nhiễm trùng vết thương ở những bệnh nhân bị bỏng nặng. Chính vì mục đích sử dụng của thuốc này lên vết thương hở, để đảm bảo an toàn cho người bệnh một yêu cầu không thể thiếu được đối với nguyên liệu mafenid dùng để pha chế dung dịch đắp ngoài tại vết thương là phải kiểm soát hàm lượng acid acetic. Hiện nay, trong Dược điển Mỹ, việc định lượng acid acetic trong “mafenide acetate for topical solution” được thực hiện bằng phương pháp sắc ký khí sử dụng cột fused-silica capillary [3]. Với điều kiện như vậy, không phải phòng thí nghiệm nào cũng dễ dàng đáp ứng được.

Với mong muốn đưa ra phương pháp định lượng acid acetic trong mafenid acetat tiến hành đơn giản và nhanh chóng nhưng vẫn đảm bảo độ chính xác, tin cậy, chúng tôi giới thiệu kết quả nghiên cứu thẩm định quy trình định lượng acid acetic trong nguyên liệu mafenid acetat bằng phương pháp HPLC.

2. Thực nghiệm

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

2.1.1. Thiết bị, dụng cụ

Đã được hiệu chuẩn theo yêu cầu của ISO/IEC 17025.

- Máy sắc ký lỏng hiệu năng cao Shimadzu với detector DAD.

- Cột Phenomenex Gemini - C18 (150 x 4,6 mm; 5 μ m)

- Cân phân tích Mettler Toledo MS 105 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

- Acid acetic: Nguồn gốc: VWR - Pháp; Số lô: 16J114017; Hàm lượng: 100,0% (nguyên trạng).

2.1.3. Hóa chất thuốc thử

- Nước (RO);

- Methanol loại dùng cho HPLC (Merck - Đức);

- Acid phosphoric loại PA (VWR - Pháp);

- Natri hydroxyd loại PA (Merck - Đức).

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

2.2.1. Đối tượng nghiên cứu

- Mẫu thử: Nguyên liệu mafenid acetat (Lô: CND1; NSX: 21/03/2016); Nơi sản xuất: Bộ môn Công nghiệp Dược - Trường Đại học Dược Hà Nội.

- Mẫu placebo: Nguyên liệu mafenid base. Nơi sản xuất: Bộ môn Công nghiệp Dược - Trường Đại học Dược Hà Nội.

2.2.2. Nội dung

- Xây dựng và thẩm định quy trình định lượng acid acetic bằng phương pháp HPLC.

- Ứng dụng để định lượng acid acetic trong nguyên liệu mafenid acetat.

2.2.3. Phương pháp nghiên cứu

- Dựa trên các tài liệu tham khảo, tiến hành khảo sát các điều kiện sắc ký để lựa chọn điều kiện sắc ký tối ưu.

- Xây dựng quy trình xử lý mẫu dựa trên đặc tính của chất phân tích.

- Sử dụng phần mềm Microsoft excel để xử lý kết quả thẩm định.

3. Kết quả và bàn luận

3.1. Xây dựng qui trình phân tích định lượng acid acetic bằng phương pháp HPLC

Chúng tôi đã khảo sát về thành phần, tỷ lệ pha động, cột sắc ký, tốc độ dòng và lựa chọn được điều kiện sắc ký tối ưu như sau

3.1.1. Điều kiện HPLC

- Cột Phenomenex Gemini C18 (150 x 4,6 mm; 5 μ m).

- Detector UV: 210 nm.

- Tốc độ dòng: 0,8 ml/min.

- Thể tích tiêm: 10 μ l.

- Pha động: Hỗn hợp đệm pH 3,0 - Methanol = (98 : 2).

Đệm pH 3,0: Hút 0,7 ml acid phosphoric vào bình định mức 1000 ml đã chứa sẵn 700 ml nước, thêm nước vừa đủ, lắc đều, điều chỉnh về pH 3,0 bằng dung dịch natri hydroxyd 40%.

3.1.2. Phương pháp xử lý mẫu

- *Dung dịch chuẩn:* Nồng độ chính xác khoảng 500 μ g/ml được chuẩn bị như sau. Cân chính xác

khoảng 1000 mg chất chuẩn acid acetic bằng cách hút chính xác 1,0 ml acid acetic vào bình định mức 100 ml đã chứa sẵn khoảng 50 ml nước và đã xác định lượng cân trước. Thêm nước đến vừa đủ, lắc đều, thu được dung dịch chuẩn gốc. Hút chính xác 5,0 ml dung dịch chuẩn gốc vào bình định mức 100 ml, thêm nước đến vừa đủ, lắc đều. Lọc qua màng lọc 0,45 μm và tiến hành tiêm vào hệ thống sắc ký.

- *Dung dịch thử*: Cân chính xác khoảng 50 mg mafenid acetat vào bình định mức 25 ml, hòa tan và pha loãng bằng nước đến vừa đủ, lắc đều. Lọc qua màng lọc 0,45 μm và tiến hành tiêm vào hệ thống sắc ký.

3.1.3. Cách tiến hành

Kiểm tra tính thích hợp của hệ thống sắc ký: Tiêm 6 lần dung dịch chuẩn, độ lệch chuẩn tương đối của diện tích pic acid acetic không được lớn hơn 2,0%. Trong sắc ký đồ của dung dịch thử, pic acid acetic phải tách hoàn toàn ra khỏi pic mafenid và các pic tạp khác nếu có.

3.1.4. Tính kết quả

Tính hàm lượng acid acetic trong chế phẩm dựa vào lượng cân acid acetic, hàm lượng acid acetic trong chất chuẩn, diện tích pic acid acetic trong dung dịch chuẩn và dung dịch thử, hệ số pha loãng của dung dịch chuẩn và dung dịch thử.

3.2. Thẩm định phương pháp

3.2.1. Tính đặc hiệu

- *Dung dịch placebo*: Cân chính xác 151,11 mg placebo (mafenid base) vào bình định mức 100 ml, hòa tan và pha loãng bằng nước tới vừa đủ, lắc đều.

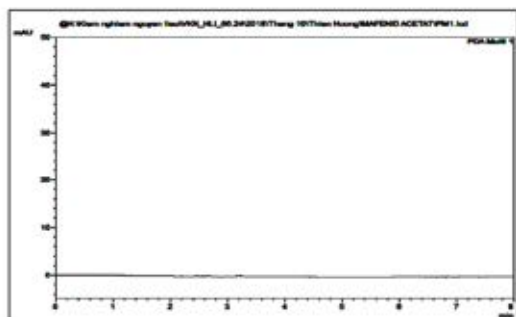
- *Dung dịch chuẩn*: Cân chính xác 1043,60 mg chất chuẩn acid acetic vào bình định mức 100 ml, thêm nước tới vừa đủ, lắc đều (dung dịch chuẩn gốc). Hút chính xác 5,0 ml dung dịch vừa thu được vào bình định mức 100 ml, thêm nước đến vừa đủ, lắc đều. Lọc qua màng lọc 0,45 μm và tiến hành tiêm vào hệ thống sắc ký.

- *Dung dịch thử*: Cân chính xác 50,42 mg mafenid acetat vào bình định mức 25 ml, hòa tan và pha loãng bằng nước tới vừa đủ, lắc đều.

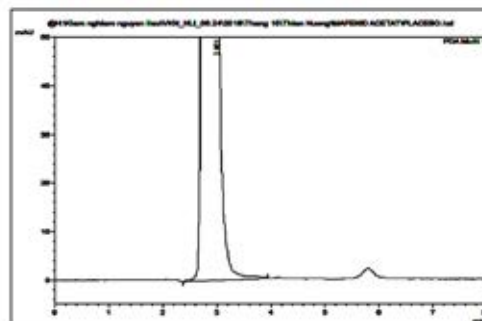
Tiêm dung môi pha mẫu (nước), dung dịch placebo, dung dịch chuẩn, dung dịch thử vào hệ thống sắc ký. Kết quả cho thấy sắc ký đồ của dung môi pha mẫu và dung dịch placebo không xuất hiện các pic có thời gian lưu trùng với pic acid acetic, pic của acid acetic cân xứng, gọn và tách hoàn toàn ra khỏi pic mafenid (Hình 1, Hình 2, Hình 3 và Hình 4).

Trên sắc ký đồ của dung dịch thử, xuất hiện 1 pic có thời gian lưu trùng với thời gian lưu của pic chính thu được từ dung dịch chuẩn ($t_{R \text{ thử}} = 4,064$ phút, $t_{R \text{ chuẩn}} = 4,085$ phút).

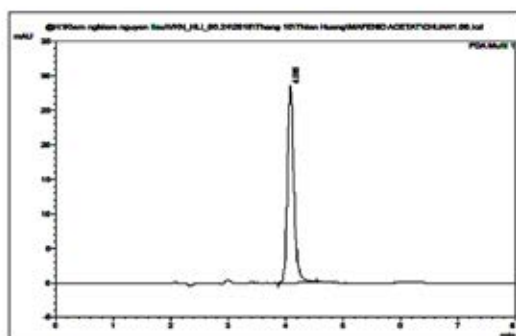
Độ tinh khiết của pic acid acetic trong sắc ký đồ của dung dịch chuẩn và dung dịch thử đều bằng 0,99999.



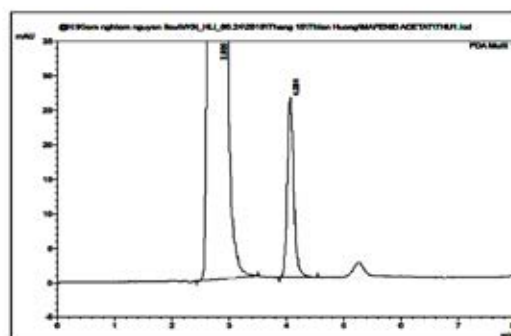
Hình 1. Sắc ký đồ dung môi pha mẫu



Hình 2. Sắc ký đồ dung dịch placebo



Hình 3. Sắc ký đồ dung dịch chuẩn



Hình 4. Sắc ký đồ 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 lặp lại 6 lần dung dịch chuẩn ở mục 3.2.1. Ghi lại các giá trị về thời gian lưu, diện tích pic, hệ số đối xứng của pic acid acetic và số đĩa lý thuyết của cột sắc ký. Kết quả khảo sát được thể hiện ở Bảng 1.

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

Stt	Thời gian lưu của pic acid acetic (min)	Diện tích pic acid acetic (mAU.s)	Hệ số đối xứng	Số đĩa lý thuyết
1	4,084	221786	1,309	5895
2	4,077	222196	1,303	5833
3	4,076	221601	1,306	5848
4	4,084	221805	1,298	5830
5	4,081	221756	1,303	5859
6	4,085	221806	1,311	5853
Trung bình	4,081	221825		
RSD %	0,1	0,1		

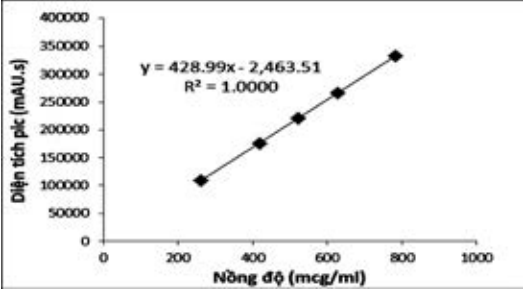
Các số liệu thu được cho thấy hệ thống sắc ký trên phù hợp cho việc phân tích định tính và định lượng acid acetic.

3.2.3. Độ tuyến tính

Khảo sát trên 5 dung dịch chuẩn với 5 nồng độ tương ứng là 50%, 80%, 100%, 120%, 150% so với nồng độ định lượng được chuẩn bị như sau: Hút chính xác 5,0 ml; 4,0 ml; 5,0 ml; 6,0 ml; 15,0 ml dung dịch chuẩn gốc ở mục 3.2.1 lần lượt vào các bình định mức 200 ml; 100 ml; 100 ml; 100 ml; 200 ml, thêm nước đến vừa đủ, lắc đều, lọc qua màng lọc 0,45 µm và tiến hành tiêm vào hệ thống sắc ký. Kết quả khảo sát được trình bày trong Bảng 2, Hình 5.

Bảng 2. Kết quả khảo sát khoảng tuyến tính của acid acetic

STT	Nồng độ acid acetic (µg/ml)	Diện tích pic acid acetic (mAU.s)
1	260,9	109737
2	417,5	175987
3	521,8	221679
4	626,2	266282
5	782,8	333322
Phương trình hồi qui	$y = 428,99x - 2463,51$ $r = 1,0000$	



Hình 5. Đường hồi qui tuyến tính giữa nồng độ acid acetic (µg/ml) và diện tích pic (mAU.s)

Nhận xét: Với điều kiện sắc ký đã lựa chọn, trong khoảng nồng độ đã khảo sát, có sự tương quan tuyến tính chặt chẽ giữa nồng độ với diện tích pic đáp ứng ($r = 1,0000$).

3.2.4. Độ đúng

- Chuẩn bị dung dịch chuẩn gốc: Cân chính xác 1037,40 mg acid acetic chuẩn vào bình định mức 100 ml, thêm nước tới vừa đủ, lắc đều.

- Chuẩn bị các dung dịch chuẩn tự tạo: Thêm chính xác 3,0 ml; 5,0 ml; 7,0 ml dung dịch chuẩn gốc vừa thu được (tương ứng một lượng acid acetic chuẩn khoảng 30 mg, 50 mg, 70 mg) vào các bình định mức 100 ml đã chứa sẵn khoảng 151 mg placebo (mafenid base), hòa tan và pha loãng vừa đủ với nước, lắc đều, thu được các dung dịch chuẩn tự tạo có nồng độ khoảng 60%, 100%, 140% so với nồng độ định lượng. Lọc qua màng lọc 0,45 µm và tiến hành tiêm vào hệ thống sắc ký.

Tính lượng acid acetic tìm lại được, sử dụng dung dịch chuẩn ở mục tính thích hợp của hệ thống sắc ký 3.2.2.

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

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

Stt	Mức thêm vào so với giới hạn (%)	Lượng acid acetic thêm vào thực tế (mg)	Diện tích pic acid acetic (mAU.s)	Lượng acid acetic tìm lại (mg)	% thu hồi	Số liệu thống kê
1	60%	31,12	130296	30,65	98,49	TB = 98,95%; RSD = 0,42%
2	60%	31,12	131332	30,90	99,29	
3	60%	31,12	131050	30,83	99,07	
4	100%	51,87	220819	51,95	100,15	TB = 100,00%; RSD = 0,18%
5	100%	51,87	220080	51,77	99,81	
6	100%	51,87	220581	51,89	100,04	
7	140%	72,62	307841	72,42	99,72	TB = 100,04%; RSD = 0,30%
8	140%	72,62	309663	72,85	100,32	
9	140%	72,62	308912	72,67	100,07	
Tỷ lệ thu hồi trung bình = 99,66%; n = 9; RSD = 0,60%						

Kết quả ở Bảng 3 cho thấy phương pháp có độ đúng tốt (phần trăm tìm lại đạt từ 98,49% đến 100,32%) với RSD nhỏ (từ 0,18% đến 0,42%).

3.2.5. Khoảng xác định

Từ phần đánh giá độ tuyến tính, độ đúng suy ra khoảng xác định của phương pháp định lượng acid acetic là 306,5 µg/ml – 728,5 µg/ml (60% - 140% so với nồng độ định lượng).

3.2.6. Độ chính xác

3.2.6.1. Độ lặp lại

Khảo sát định lượng acid acetic trên nguyên liệu mafenid acetat với các điều kiện sắc ký và cách xử lý mẫu như ở mục 3.1.1 và 3.1.2. Lặp lại thí nghiệm 6 lần, kết quả được trình bày trong Bảng 4.

3.2.6.2. Độ chính xác trung gian

Độ chính xác trung gian do hai kiểm nghiệm viên khác nhau, định lượng acid acetic trên nguyên liệu mafenid acetat, tiến hành khác ngày trên hai thiết bị khác nhau. Kết quả thể hiện ở Bảng 4.

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

Stt	KNV 1: Kết quả phần 3.2.6.1 (Kết quả độ lặp lại) Thiết bị phân tích: Máy HPLC Shimadzu 1 Nồng độ dung dịch chuẩn: 521,8 µg/ml Diện tích pic của chuẩn = 221825; n = 6			KNV 2: Thiết bị phân tích: Máy HPLC Shimadzu 2 Nồng độ dung dịch chuẩn: 521,0 µg/ml Diện tích pic của chuẩn = 221588; n = 6		
	Lượng cân chế phẩm (mg)	Diện tích pic acid acetic (mAU.s)	HL (%) acid acetic trong chế phẩm	Lượng cân chế phẩm (mg)	Diện tích pic acid acetic (mAU.s)	HL (%) acid acetic trong chế phẩm
1	50,42	206527	24,09	50,55	206979	24,07
2	50,43	205393	23,95	49,88	202812	23,90
3	49,69	203896	24,13	50,77	207220	23,99
4	49,78	203909	24,09	50,76	207842	24,07
5	50,71	207019	24,01	50,27	204837	23,95
6	50,55	205774	23,94	50,77	207394	24,01
Trung bình = 24,0%; n = 6; RSD = 0,33%			Trung bình = 24,0%; n = 6; RSD = 0,28%			
Kết quả định lượng trung bình = 24,0%; n = 12; RSD = 0,3% (phù hợp với yêu cầu trong USP 40: 22,0% - 26,8%)						

Kết quả ở Bảng 4 cho thấy phương pháp có độ chính xác cao thể hiện ở độ lặp lại trong ngày với RSD ≤ 0,33% và khác ngày với RSD ≤ 0,3%.

4. Kết luận

Phương pháp sắc ký lỏng pha đảo đã được thiết lập để định lượng acid acetic trong nguyên liệu mafenid acetat.

Phương pháp đã xây dựng sử dụng cột Phenomenex Gemini - C18 (150 x 4,6 mm; 5 µm) trong quá trình phân tích. Pha động là hỗn hợp đệm pH 3,0 - methanol (98 : 2), tốc độ dòng 0,8 ml/phút, thể tích tiêm 10 µl; detector DAD ở bước sóng 210 nm. Phương pháp được thẩm định về tính đặc hiệu, độ thích hợp của hệ thống, độ tuyến tính, độ đúng, khoảng xác định, độ lặp lại và độ chính xác trung gian. Kết quả thẩm định cho thấy phương pháp được xây dựng hoàn toàn phù hợp để kiểm soát hàm lượng acid acetic trước khi nguyên liệu mafenid acetat được đưa vào sử dụng.

Tài liệu tham khảo

1. Bộ Y tế (2017), *Dược điển Việt Nam*, Lần xuất bản thứ năm, NXB Y học, Hà Nội.
2. *British Pharmacopoeia* (2017).
3. *The United State Pharmacopoeia 40* (2017).

SUMMARY

A reversed-phase liquid chromatography method was developed to assay Acetic acid in Mafenide acetate. The method was carried by using a Phenomenex Gemini - C18 (150 x 4.6 mm; 5 µm) column and a mixture of pH 3.0 buffer (Dilute 0.7 ml of Phosphoric acid in 1000 ml of water, adjust to pH of 3.0 with 40% (m/v) of Sodium hydroxide solution) and Methanol (98 : 2) as mobile phase. The flow rate of mobile phase is maintained at 0.8 ml per minute, injection volume: 10 µl, analyte was detected by a DAD detector set at 210 nm. The method was validated in specificity, linearity, range, accuracy and precision. Validation results proved that the developed method was suitable for assay of acetic acid in Mafenide acetate.

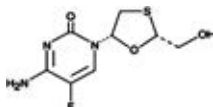
(Ngày nhận bài: 25/11/2018 ; Ngày phản biện: 10/06/2019 ; Ngày duyệt đăng: 05/07/2019)

ĐỊNH LƯỢNG ĐỒNG THỜI EMTRICITABIN VÀ TENOFOVIR DISOPROXIL FUMARAT TRONG VIÊN NÉN BẰNG PHƯƠNG PHÁP HPLC

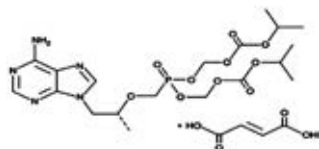
NGUYỄN THỊ MINH TÂM, NGUYỄN THỊ HỒNG YẾN, TRẦN THỊ HỒNG ANH
Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương

Từ khóa: Emtricitabin, tenofovir disoproxil fumarat, HPLC, định lượng đồng thời, thẩm định phương pháp phân tích

1. Đặt vấn đề



Hình 1. Công thức cấu tạo của emtricitabin



Hình 2. Công thức cấu tạo của tenofovir disoproxil fumarat

Emtricitabin [2] có công thức phân tử là $C_8H_{10}FN_3O_3S$ và khối lượng phân tử là 247,2.

Emtricitabin [7],[8] thuộc nhóm 3'-thia pyrimidin nucleosides, là một chất ức chế ngược nucleosid hoạt động bằng cách ức chế enzym sao chép ngược, ngăn chặn quá trình sao chép DNA của virus HIV. Do đó, làm giảm lượng virus HIV đồng thời có thể gián tiếp làm tăng số lượng tế bào miễn dịch T hay T CD4+. Cả hai biến đổi này đều dẫn tới một hệ miễn dịch khỏe mạnh hơn và kiểm chế tình trạng bệnh của bệnh nhân.

Tenofovir disoproxil fumarat [2] có công thức cấu tạo là $C_{19}H_{30}N_5O_{10}P.C_4H_4O_4$ và khối lượng phân tử là 635,5.

Tenofovir [1],[3],[4] thuộc nhóm 6-aminopurines có cấu trúc tương tự các deoxynucleotides - là yếu tố cần thiết để tổng hợp DNA của virus. Tenofovir ức chế enzym phiên mã ngược của virus HIV-1 bằng cách tranh chấp với cơ chất deoxyadenosin 5'-triphosphat để gắn vào DNA, bằng cách này nó sẽ làm gián đoạn quá trình sao chép DNA của virus.

Hiện nay trên thị trường có nhiều chế phẩm thuốc kết hợp hai thành phần này để làm tăng tác dụng trên điều trị cho bệnh nhân nhiễm HIV. Dược điển quốc tế năm 2015 đã xây dựng phương pháp HPLC để định lượng đồng thời 2 thành phần trong viên nén phối hợp. Tuy nhiên phương pháp sử dụng một hệ sắc ký gradient với thời gian phân tích 30 phút. Do đó, chúng tôi đã tiến hành nghiên cứu xây dựng và thẩm định phương pháp mới sử dụng hệ sắc ký đẳng dòng đơn giản có thời gian phân tích ngắn hơn. Phương pháp được thẩm định đúng theo quy định của ICH [5],[6] để chứng minh về độ đặc hiệu, độ tuyến tính, độ đúng và độ chính xác.

2. Thục 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 quy định của ISO/IEC 17025 và GLP.

- Máy HPLC Shimadzu LC 20A và Agilent với detector DAD;

- Cột Lichro cart RP18 (25 cm × 4,6 mm, 5 μm) và Phenomenex RP18 (25 cm × 4,6 mm, 5 μm);

- Cân phân tích Mettler Toledo AG245, độ chính xác 0,01 mg;

- Máy lắc siêu âm Branson;

- Bộ lọc dung môi dùng cho sắc ký với màng lọc 0,45 μm;

- Các dụng cụ thủy tinh: Bình định mức, pipet chính xác và ống đong,...

2.1.2. Hóa chất, dung môi và chất chuẩn

- Methanol, acetonitril và nước loại dùng cho sắc ký lỏng;

- Emtricitabin, NSX: Incepta Pharmaceuticals Ltd., SKS: 1410002, hàm lượng: 99,1% (khan), ẩm: 0,3%;

- Tenofovir disoproxil fumarat, NSX: Incepta Pharmaceuticals Ltd., SKS: TR3250716, hàm lượng: 98,938% (khan), ẩm: 0,49%.

2.2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Đối tượng nghiên cứu

Viên nén bao phim Emtifovir, lô sản xuất 17001, ngày sản xuất 03/2017, hạn dùng 02/2019 do Công ty Incepta Pharmaceuticals Ltd., sản xuất. Công thức bào chế: emtricitabin 200 mg, tenofovir disoproxil fumarat 300 mg và tá dược vừa đủ 1 viên.

Mẫu placebo: Gồm các thành phần theo công thức bào chế nhưng không có emtricitabin và tenofovir disoproxil fumarat.

2.2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.2.1. Điều kiện sắc ký

Cột RP18 (250 × 4,6 mm, 5 μm);

Detector UV: 258 nm;

Tốc độ dòng: 0,6 ml/min;

Thể tích tiêm: 20 μl;

Pha động: Acetonitril – methanol – nước (30:50:20).

2.2.2.2. Phương pháp xử lý mẫu

- *Dung dịch chuẩn gốc emtricitabin*: Cân chính xác khoảng 20,0 mg chất chuẩn emtricitabin, hòa tan và pha loãng vừa đủ 100 ml với pha động.

- *Dung dịch chuẩn gốc tenofovir disoproxil fumarat*: Cân chính xác khoảng 30,0 mg chất chuẩn tenofovir disoproxil fumarat, hòa tan và pha loãng vừa đủ 100 ml với pha động.

- *Dung dịch chuẩn hỗn hợp*: Hút chính xác 10,0 ml dung dịch chuẩn gốc emtricitabin và 10,0 ml dung dịch chuẩn gốc tenofovir disoproxil fumarat, pha loãng với pha động vừa đủ 50 ml. Lọc qua màng lọc 0,45 μm.

- *Dung dịch thử*: Xác định khối lượng trung bình của 20 viên đã bóc vỏ bao, nghiền mịn, cân chính xác một lượng bột viên tương ứng với khoảng 30 mg tenofovir disoproxil fumarat vào bình định mức 100 ml, thêm 20 ml pha động, lắc 5 phút và siêu âm 5 phút để hòa tan, pha loãng vừa đủ đến vạch với pha động. Hút chính xác 10,0 ml dung dịch thu được pha loãng vừa đủ 50 ml với pha động. Lọc qua màng lọc 0,45 μm.

- *Dung dịch placebo*: Cân khoảng 30 mg bột placebo vào bình định mức 100 ml, thêm 20 ml pha động, lắc 5 phút và siêu âm 5 phút để hòa tan, pha loãng vừa đủ đến vạch với pha động. Hút chính xác 10,0 ml dung dịch thu được pha loãng vừa đủ 50 ml với pha động. Lọc qua màng lọc 0,45 μm.

2.2.2.3. Thẩm định phương pháp [6]

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.

3. Kết quả và bàn luận

3.1. Độ đặc hiệu

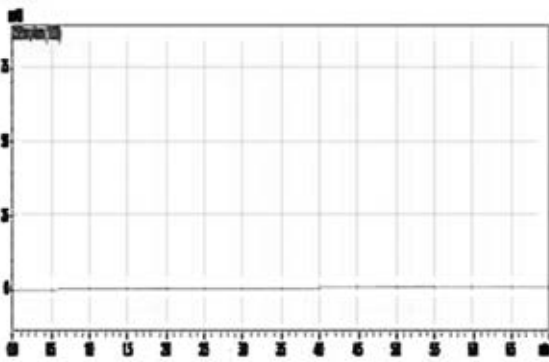
- Tiến hành sắc ký mẫu trắng, dung dịch placebo, dung dịch thử và các dung dịch chuẩn emtricitabin và tenofovir disoproxil fumarat theo quy trình phân tích.

- Trên các sắc ký đồ thu được, mẫu trắng và dung dịch placebo không thấy xuất hiện pic nào có thời gian lưu tương ứng với thời gian lưu của các pic emtricitabin và tenofovir disoproxil fumarat trên sắc ký đồ của dung dịch chuẩn.

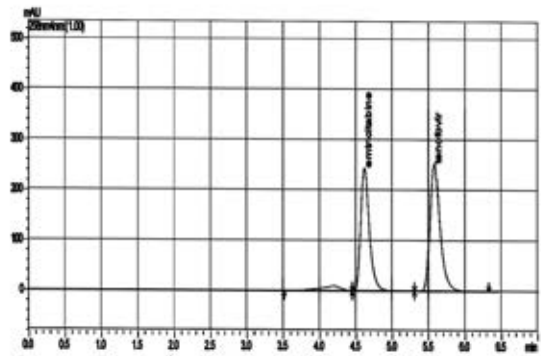
- Dung dịch thử cho 2 pic có thời gian lưu khoảng 4,6 phút và 5,6 phút tương ứng với thời gian lưu của pic emtricitabin và pic tenofovir disoproxil fumarat trên sắc ký đồ của các dung dịch chuẩn. Trên sắc ký đồ của dung dịch thử không xuất hiện thêm các pic khác (pic tạp) ảnh hưởng đến pic emtricitabin và tenofovir disoproxil fumarat.

- Hệ số tinh khiết của pic emtricitabin và tenofovir disoproxil fumarat trong sắc ký đồ của dung dịch chuẩn và thử đều bằng 1,0000. Hệ số chồng phổ UV của pic emtricitabin và tenofovir disoproxil fumarat thu được trong sắc ký đồ của dung dịch chuẩn và thử là 0,9999.

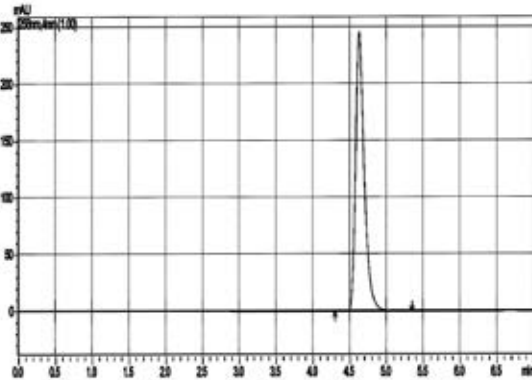
Kết quả được thể hiện ở Hình 3 đến Hình 10.



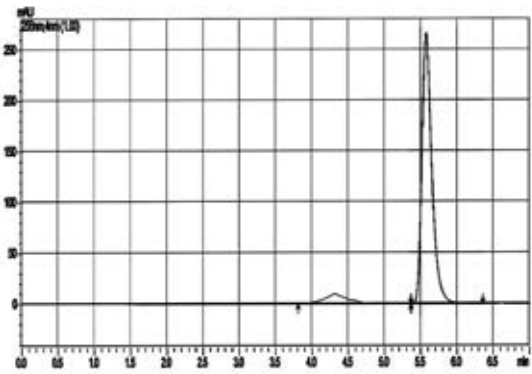
Hình 3. Sắc ký đồ của dung dịch Placebo



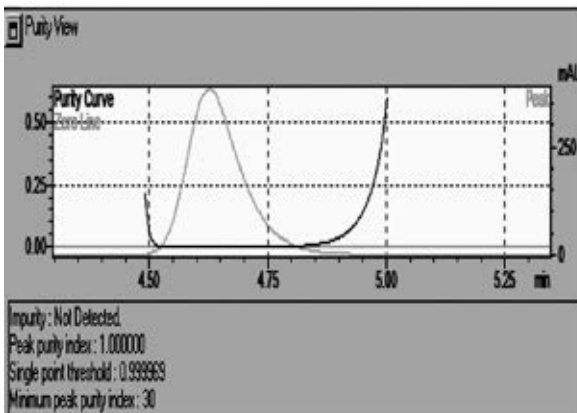
Hình 4. Sắc ký đồ của dung dịch thử



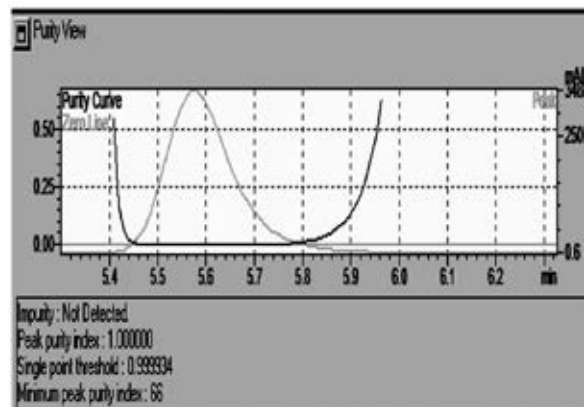
Hình 5. Sắc ký đồ của dung dịch chuẩn emtricitabin



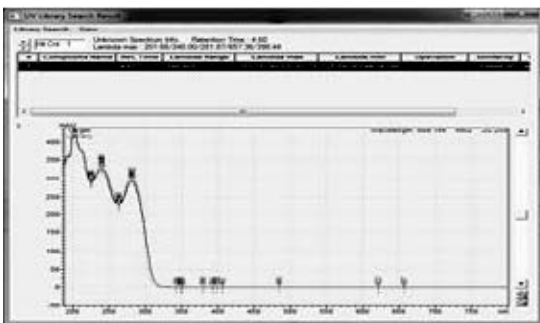
Hình 6. Sắc ký đồ của dung dịch chuẩn tenofovir disoproxil fumarat



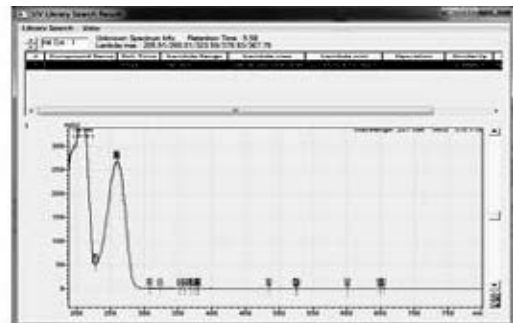
Hình 7. Độ tinh khiết của pic emtricitabin



Hình 8. Độ tinh khiết của pic tenofovir disoproxil fumarat



Hình 9. Chồng phổ UV-VIS pic emtricitabin của dung dịch chuẩn và thử



Hình 10. Chồng phổ UV-VIS pic tenofovir disoproxil fumarat của dung dịch chuẩn và thử

3.2. 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 trong phân thử Độ đặc hiệu. Ghi lại các giá trị về thời gian lưu và diện tích pic. Kết quả được thể hiện ở Bảng 1.

Bảng 1. Tính thích hợp của hệ thống sắc ký

STT	Emtricitabin		Tenofovir	
	Thời gian lưu (phút)	Diện tích pic (mAU.s)	Thời gian lưu (phút)	Diện tích pic (mAU.s)
1	4,62	2017827	5,58	2557990
2	4,62	2019533	5,57	2559762
3	4,62	2019107	5,57	2559626
4	4,61	2017528	5,57	2559540
5	4,61	2022685	5,56	2562127
6	4,62	2022139	5,57	2558822
TB	4,62	2019803,2	5,57	2559644,5
RSD (%)	0,11	0,11	0,07	0,05

Kết quả từ Bảng 1 cho thấy phương pháp HPLC đã sử dụng có độ lặp lại cao với RSD của diện tích pic và thời gian lưu đều nhỏ hơn 1,0%. Số đĩa lý thuyết khoảng 7000 (> 2000) và pic có hệ số kéo đuôi T = 1,5 (< 2,0). Độ phân giải giữa 2 pic chính là 3,9. Như vậy hệ thống sắc ký trên phù hợp cho việc định lượng đồng thời emtricitabin và tenofovir disoproxil fumarat.

3.3. Khoảng tuyến tính

Khảo sát trên 5 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%, 80%, 100%, 120% và 150% so với nồng độ định lượng của emtricitabin và tenofovir disoproxil fumarat. Kết quả được ghi lại trong Bảng 2, Hình 11 và Hình 12 (Xem trang bên).

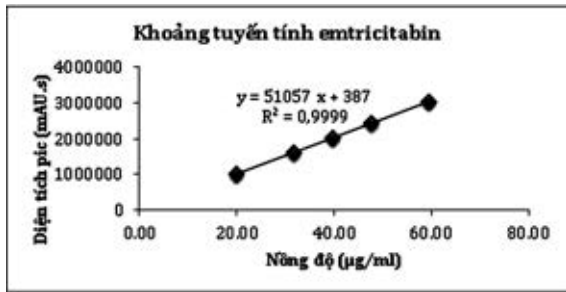
Bảng 2. Kết quả khảo sát khoảng tuyến tính

Stt	Nồng độ % so với định lượng	Thể tích dung dịch chuẩn gốc (ml)	Bình định mức (ml)	Hệ số pha loãng	Emtricitabin		Tenofovir	
					Nồng độ ($\mu\text{g/ml}$)	Diện tích pic (mAU.s)	Nồng độ ($\mu\text{g/ml}$)	Diện tích pic (mAU.s)
1	50%	5	50	10	19,84	1018930	30,45	1287598
2	80%	8	50	6,25	31,74	1614381	48,72	2053244
3	100%	10	50	5	39,68	2019803	60,90	2559644
4	120%	12	50	4,17	47,61	2439348	73,08	3076979
5	150%	15	50	3,33	59,52	3038991	91,35	3827837
Phương trình hồi quy					y = 51057 x + 387		y = 41753 x + 18187	
Hệ số tương quan					r = 1,0000		r = 1,0000	
%Y					0,02%		0,71%	

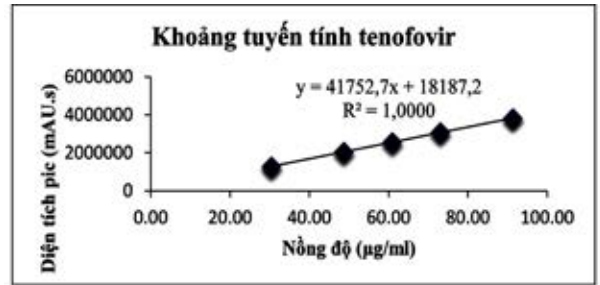
Với điều kiện sắc ký đã chọn, trong khoảng nồng độ khảo sát có sự tương quan tuyến tính chặt chẽ giữa nồng độ và diện tích pic đáp ứng.

3.4. Độ đúng

Chuẩn bị các mẫu thử: Chuẩn bị các mẫu tự tạo bằng cách thêm chính xác một lượng chất chuẩn emtricitabin và tenofovir disoproxil fumarat vào mẫu placebo sao cho sau khi xử lý theo quy trình phân tích thu được các dung dịch có nồng độ 80%, 100% và 120% 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.



Hình 11. Đồ thị biểu diễn mối tương quan tuyến tính giữa nồng độ và diện tích pic emtricitabin



Hình 12. Đồ thị biểu diễn mối tương quan tuyến tính giữa nồng độ và diện tích pic tenofovir disoproxil fumarat

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

Stt	Lượng thêm vào so với nồng độ định lượng	Emtricitabin				Tenofovir disoproxil fumarat			
		Lượng emtricitabin thực tế thêm vào (mg)	Diện tích pic emtricitabin (mAU.s)	Lượng emtricitabin tìm lại (mg)	% Thu hồi	Lượng tenofovir thực tế thêm vào (mg)	Diện tích pic tenofovir (mAU.s)	Lượng tenofovir tìm lại (mg)	% Thu hồi
1	80%	16,68	1700481	16,91	101,35	23,68	1979440	23,92	101,01
2	80%	16,39	1677344	16,68	101,74	24,75	2089216	25,25	102,00
3	80%	16,39	1658782	16,49	100,62	23,99	2015940	24,36	101,54
TB = 101,24%; RSD = 0,56%					TB = 101,52%; RSD = 0,49%				
4	100%	20,27	2049713	20,38	100,53	29,63	2473719	29,89	100,88
5	100%	20,26	2062500	20,50	101,21	29,17	2440794	29,49	101,11
6	100%	20,93	2133970	21,21	101,36	29,90	2496390	30,17	100,89
TB = 101,03%; RSD = 0,44%					TB = 100,96%; RSD = 0,13%				
7	120%	23,95	2434068	24,20	101,04	36,22	3012169	36,40	100,49
8	120%	24,64	2486587	24,72	100,33	35,58	2955014	35,71	100,36
9	120%	23,82	2402183	23,88	100,26	35,66	2958344	35,75	100,25
TB = 100,54%; RSD = 0,43%					TB = 100,37%; RSD = 0,12%				

Từ kết quả thu được trong Bảng 3 cho thấy tỉ lệ thu hồi của emtricitabin và tenofovir disoproxil fumarat đều nằm trong giới hạn từ 98,0% đến 102,0% và RSD đều nhỏ hơn 2,0%. Như vậy phương pháp có độ thu hồi tốt.

3.5. Khoảng xác định

Trong phần đánh giá độ đúng, độ tuyến tính, ở các mức nồng độ 80%, 100% và 120% hàm lượng hoạt chất emtricitabin và tenofovir disoproxil fumarat đảm bảo độ đúng, độ lặp lại và độ tuyến tính. Vậy khoảng xác định của emtricitabin là 0,032 mg/ml đến 0,048 mg/ml và của tenofovir disoproxil fumarat là 0,048 mg/ml đến 0,072 mg/ml.

3.6. Độ chính xác

3.6.1. Độ lặp lại

Tiến hành định lượng đồng thời emtricitabin và tenofovir disoproxil fumarat trong viên nén bao phim Emtifovir trên 6 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 và Bảng 5.

3.6.2. Độ chính xác trung gian

Kiểm nghiệm viên 2 tiến hành định lượng emtricitabin và tenofovir disoproxil fumarat trên cùng một mẫu chế phẩm, ngày khác và trên các thiết bị khác. Kết quả được thể hiện ở Bảng 4 và Bảng 5.

Bảng 4. Kết quả khảo sát độ lặp lại và độ chính xác trung gian của phương pháp định lượng emtricitabin

Kiểm nghiệm viên 1			Kiểm nghiệm viên 2			
Kết quả định lượng ngày: 18/10/2017 - Thiết bị: Máy HPLC Shimadzu LC 20A - Cột: Lichro cart RP18 (25 cm × 4,6 mm, 5 µm) - Lượng cân chuẩn: 20,10 mg - Diện tích pic trung bình mẫu chuẩn: 2007379,5 mAU.s - Khối lượng trung bình viên: 0,78844 g			Kết quả định lượng ngày: 26/10/2017 - Thiết bị: Máy HPLC Agilent - Cột: Phenomenex RP18 (25 cm × 4,6 mm, 5 µm) - Lượng cân chuẩn: 20,63 mg - Diện tích pic trung bình mẫu chuẩn: 1936,9 mAU.s - Khối lượng trung bình viên: 0,78905 g			
TT	Lượng mẫu thử (g)	Diện tích pic (mAU.s)	Hàm lượng (%)	Lượng mẫu thử (g)	Diện tích pic (mAU.s)	Hàm lượng (%)
1	0,0790	1937736	95,66	0,0841	1935,8	97,05
2	0,0811	1976361	95,04	0,0791	1804,7	96,19
3	0,0822	2033364	96,48	0,0844	1940,1	96,92
4	0,0835	2069753	96,67	0,0814	1871,0	96,91
5	0,0851	2083746	95,50	0,0815	1857,4	96,09
6	0,0821	2036694	96,75	0,0822	1874,3	96,13
		Trung bình	96,02%		Trung bình	96,55%
		RSD	0,74%		RSD	0,47%
Kết quả định lượng trung bình 2 KNV = 96,28%; n = 12; RSD = 0,66%						

Bảng 5. Kết quả khảo sát độ lặp lại và độ chính xác trung gian của phương pháp định lượng tenofovir disoproxil fumarat

Kiểm nghiệm viên 1			Kiểm nghiệm viên 2			
Kết quả định lượng ngày: 18/10/2017 - Thiết bị: Máy HPLC Shimadzu LC 20A - Cột: Lichro cart RP18 (25 cm × 4,6 mm, 5 µm) - Lượng cân chuẩn: 30,09 mg - Diện tích pic trung bình mẫu chuẩn: 2469865,8 mAU.s - Khối lượng trung bình viên: 0,78844 g			Kết quả định lượng ngày: 26/10/2017 - Thiết bị: Máy HPLC Agilent - Cột: Phenomenex RP18 (25 cm × 4,6 mm, 5 µm) - Lượng cân chuẩn: 32,07 mg - Diện tích pic trung bình mẫu chuẩn: 2529,5 mAU.s - Khối lượng trung bình viên: 0,78905 g			
TT	Lượng mẫu thử (g)	Diện tích pic (mAU.s)	Hàm lượng (%)	Lượng mẫu thử (g)	Diện tích pic (mAU.s)	Hàm lượng (%)
1	0,0790	2457443	98,06	0,0841	2571,1	98,99
2	0,0811	2512158	97,65	0,0791	2397,1	98,13
3	0,0822	2586761	99,20	0,0844	2560,1	98,22
4	0,0835	2657080	100,31	0,0814	2485,5	98,87
5	0,0851	2649919	98,16	0,0815	2463,5	97,87
6	0,0821	2589728	99,43	0,0822	2487,1	97,97
		Trung bình	98,80%		Trung bình	98,34%
		RSD	1,03%		RSD	0,48%
Kết quả định lượng trung bình 2 KNV = 98,57%; n = 12; RSD = 0,80%						

Kết quả từ Bảng 4 và Bảng 5 cho thấy, phương pháp định lượng đồng thời emtricitabin và tenofovir disoproxil fumarat bằng phương pháp HPLC có độ chính xác phù hợp theo yêu cầu của phương pháp phân tích [5],[6].

4. Kết luận

Quy trình định lượng đồng thời emtricitabin và tenofovir disoproxil fumarat trong viên nén bao phim Emtifovir bằng phương pháp HPLC đáp ứng yêu cầu về độ đặc hiệu, độ thích hợp của hệ thống sắc ký, có sự tương quan tuyến tính chặt chẽ giữa nồng độ và diện tích pic đáp ứng. Quy trình phân tích này cũng có độ đúng và độ chính xác cao, phù hợp để định lượng đồng thời emtricitabin và tenofovir disoproxil fumarat trong viên nén bao phim. Quy trình phân tích này có các điều kiện về trang thiết bị, 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 để định lượng đồng thời emtricitabin và tenofovir disoproxil fumarat trong các chế phẩm tương tự.

Tài liệu tham khảo

1. Bộ Y tế, Dược thư quốc gia Việt Nam, 2015, Lần xuất bản thứ 2, Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật.
2. Dược điển quốc tế <http://apps.who.int/phint/en/p/docf/>
3. Deeks SG, Barditch-Crovo P, Lietman PS. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1998,42,2380–4
4. Delahunty T, Bushman L, Robbins B, Fletcher CV. *J. Chrom. B.*2009, 877, 1907–1914.
5. International Conference on Harmonization, ICH Guidelines, *Validation of Analytical Procedures Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use: Text and Methodology Q 2 (R1)*, International Conference on Harmonization, Geneva, Switzerland, November 2005.
6. International Conference on Harmonization, *Validation of Analytical Procedure, Text and Methodology Q2 (R1)*, IFMA, Geneva, Switzerland, 2005.
7. Lim SG, Ng TM, Kung N .F. *Arch. Intern. Med.* 2006, 166, 49–56.
8. Liu KZ, Hou W, Zumbika E, Ni Q. *J Zhejiang Univ Sci B* .2005, 6, 1182–7.

SUMMARY

A simple, rapid, precise and accurate reversed phase high-performance chromatographic method for the simultaneous determination of Emtricitabine and Tenofovir disoproxil fumarate in a commercial tablet was validated. Chromatographic separations were achieved on a RP18 (250 x 4.6 mm, 5 µm) column at room temperature. The mobile phase was a mixture of Acetonitrile-methanol-Water (30:50:20) delivered at a flow rate of 0.6 ml/min. UV detection was performed at 258 nm. The developed method was validated according to the ICH guidelines for specificity, linearity, accuracy, range and precision. Results of the peak shape, chromatographic resolution between the principal peaks and the total analysis time are satisfactory. This HPLC method has been applied successfully for the simultaneous quantitative analysis of Emtricitabine, Tenofovir disoproxil fumarate in a commercial tablet.

(Ngày nhận bài: 20/11/2018 ; Ngày phản biện: 12/03/2019 ; Ngày duyệt đăng: 09/04/2019)

NGHIÊN CỨU ĐỊNH LƯỢNG CEFDINIR TRONG HUYẾT TƯƠNG NGƯỜI BẰNG PHƯƠNG PHÁP HPLC

TẠ MẠNH HÙNG, NGUYỄN THỊ THU HÒA,
PHAN THỊ NGHĨA, NGÔ ĐỨC LIÊM
Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương

Từ khóa: Cefdinir, tương đương sinh học, huyết tương, thẩm định phương pháp phân tích, HPLC

1. Đặt vấn đề

Cefdinir ($C_{14}H_{13}N_5S_5O_2$; KLPT: 395,408 g/mol) là một cephalosporin thế hệ III, có phổ hoạt tính rộng, kháng nhiều loại vi khuẩn Gram âm và Gram dương ái khí. Ở mức liều khuyến nghị sử dụng (300 mg), nồng độ tối đa của dược chất trong huyết tương người khoảng 1,67 $\mu\text{g/ml}$ [1]. Dựa vào trạng thiết bị hiện có và tham khảo một số phương pháp phân tích đã được các tác giả công bố [2],[4],[5] đồng thời áp dụng các nguyên lý của phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao, chúng tôi đã tiến hành nghiên cứu xây dựng phương pháp định lượng Cefdinir trong huyết tương người bằng HPLC kết nối detector PDA nhằm đáp ứng nhu cầu đánh giá tương đương sinh học các chế phẩm chứa cefdinir.

2. Thực nghiệm

2.1. Nguyên vật liệu

- *Chất chuẩn:*

+ Cefdinir: Chuẩn làm việc, SKS: WS.0216305.02, hàm lượng: 966,3 $\mu\text{g/mg}$ (nguyên trạng), độ ẩm: 1,40%.

+ Ciprofloxacin hydroclorid: Chuẩn Dược điển Việt Nam, SKS: 0212029.02, hàm lượng: 93,47%, độ ẩm: 6,0%, được dùng làm chuẩn nội trong phương pháp phân tích.

- *Dung môi, hóa chất:*

+ Methanol, tetrahydrofuran đạt tiêu chuẩn tinh khiết dùng cho sắc ký.

+ Cloroform, acid citric monohydrat, dinatri hydrophosphat, kali dihydrophosphat, acid perchloric đạt tiêu chuẩn tinh khiết dùng cho phân tích.

- *Huyết tương trắng:* Không có dược chất cần phân tích của Viện Huyết học và Truyền máu Trung ương.

2.2. Thiết bị và dụng cụ phân tích

2.2.1. Thiết bị

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

- Máy sắc ký lỏng hiệu năng cao Shimadzu – Nhật;

- Cân phân tích Mettler Toledo - Thụy Sĩ ($d = 0,01 \text{ mg}$);

- Tủ lạnh sâu Panasonic – Nhật Bản ($-70^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$);
- Máy ly tâm lạnh Sigma 4 – 16 K – Đức;
- Máy lắc xoay...

2.2.2. Dụng cụ

- Bình định mức, pipet thủy tinh loại A.

- Ống ly tâm bằng teflon chịu được lực ly tâm lớn...

2.3. Điều kiện phân tích

2.3.1. Điều kiện sắc ký

- Cột sắc ký: C18; 150 x 4,6 mm; 5 μm . Nhiệt độ cột 40°C

- Pha động: Methanol - đệm citric pH 2,0 - tetrahydrofuran (tỷ lệ thích hợp)

- Tốc độ dòng: 1,25 ml/phút

- Detector: PDA ở bước sóng 286 nm

- Thể tích tiêm: 100 μl

- Nhiệt độ autosampler: 4°C

2.3.2. Phương pháp xử lý mẫu

- Chuẩn bị dung dịch chuẩn: Chuẩn bị dung dịch chuẩn gốc trong đệm phosphat 0,1 M có nồng độ 0,5 mg/ml. Từ dung dịch chuẩn gốc, chuẩn bị dung dịch chuẩn làm việc trong dung dịch đệm phosphat 0,1M có nồng độ 0,1 mg/ml. Tiến hành chuẩn bị dãy nồng độ đường chuẩn từ 50 ng/ml đến 5000 ng/ml trong huyết tương từ dung dịch chuẩn làm việc.

- Dung dịch chuẩn nội (IS): Chuẩn bị dung dịch chuẩn nội ciprofloxacin hydroclorid có nồng độ 0,04 mg/ml trong methanol.

- Chiết, tách cefdinir trong mẫu huyết tương người bằng phương pháp tủa protein với acid và chiết loại tạp bằng cloroform theo quy trình như sau: Hút 1 ml mẫu huyết tương, thêm 50 μl dung dịch chuẩn nội ciprofloxacin hydroclorid (IS). Lắc xoay 5 giây. Thêm 250 μl dung dịch acid perchloric. Lắc xoay 10 giây. Ly tâm 11.000 vòng/phút trong 5 phút. Lấy toàn bộ lớp dịch trong. Thêm 3 ml cloroform. Lắc cơ học ngang 5 phút. Ly tâm 3000 vòng/phút trong 5 phút. Hút lớp dịch trong phía trên. Tiêm vào hệ thống sắc ký.

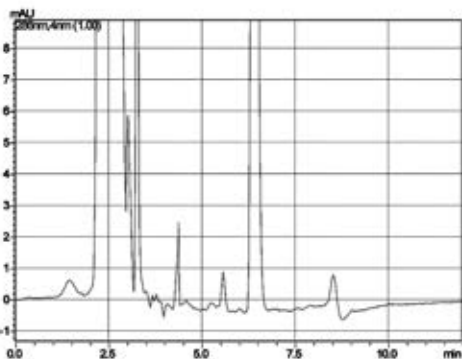
2.3.3. Phương pháp tính kết quả

Xác định nồng độ cefdinir có trong các mẫu thử (chưa biết nồng độ) dựa vào tỷ lệ diện tích pic cefdinir/IS thu được từ sắc ký đồ (SKĐ) của mẫu thử và đường chuẩn biểu thị mối tương quan giữa nồng độ cefdinir có trong các mẫu chuẩn với tỷ lệ diện tích pic cefdinir/IS của mẫu chuẩn. Tiến hành thẩm định phương pháp phân tích theo quy định của EMA [3] và US-FDA [6].

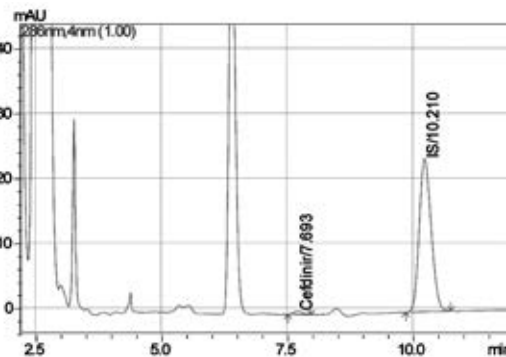
3. Kết quả và bàn luận

3.1. Độ đặc hiệu - chọn lọc của phương pháp

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



Hình 1. SKĐ mẫu HT trắng



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

Trên SKĐ của mẫu HT trắng (Hình 1), tại các thời điểm 7,7 và 10,3 phút (trùng với thời gian lưu của cefdinir và IS trong SKĐ của mẫu chuẩn - Hình 2) không xuất hiện các pic tạp. Do vậy, phương pháp phân tích có độ đặc hiệu-chọn lọc với cefdinir và IS theo các quy định của phương pháp phân tích thuốc trong dịch sinh học [3],[6].

3.2. Đường chuẩn và khoảng tuyến tính

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

Kết quả xác định mối tương quan này được trình bày ở Bảng 1.

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

Mẫu chuẩn Nồng độ (ng/ml)	Độ đúng (%)				
	Đường chuẩn 1	Đường chuẩn 2	Đường chuẩn 3	Đường chuẩn 4	Đường chuẩn 5
51,9	98,9	102,5	97,7	99,5	101,6
103,7	100,5	93,2	103,0	98,3	95,7
207,5	105,2	104,4	104,9	106,0	102,9
518,7	96,3	97,8	95,5	97,1	98,0
1037,4	98,6	100,2	100,4	102,7	99,5
2074,8	99,0	101,4	101,3	103,6	100,7
4149,7	97,9	100,7	96,0	98,1	101,0
5187,1	103,6	99,9	101,3	94,7	100,5
Phương trình hồi quy* (y = ax + b)	a = 0,0004 b = - 0,0053	a = 0,0004 b = - 0,0031	a = 0,0005 b = - 0,0053	a = 0,0005 b = - 0,0050	a = 0,0004 b = - 0,0037
Hệ số tương quan (r)	0,9994	0,9992	0,9992	0,9990	0,9997

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

Kết quả thẩm định cho thấy trong khoảng nồng độ từ 50 ng/ml đến 5000 ng/ml có sự tương quan tuyến tính giữa nồng độ cefdinir và tỷ lệ diện tích pic cefdinir/IS với hệ số tương quan $r > 0,99$. Nồng độ cefdinir xác định từ đường chuẩn so với nồng độ lý thuyết đều nằm trong giới hạn cho phép (80 - 120% đối với nồng độ thấp nhất, 85 - 115% đối với các nồng độ còn lại) theo quy định của phương pháp phân tích thuốc trong dịch sinh học [3],[6].

3.3. Giới hạn định lượng dưới của phương pháp

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

Kết quả thẩm định giới hạn định lượng dưới của phương pháp được trình bày ở Bảng 2.

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

STT	Mẫu trắng	Mẫu chuẩn (50 ng/ml)			
	Diện tích pic	Diện tích pic cefdinir	Diện tích pic IS	Nồng độ cefdinir tìm thấy (ng/ml)	Độ đúng (%)
1	0	7124	349983	59,0	116,1
2	0	6459	369882	51,3	100,9
3	0	5971	308136	56,4	111,0
4	0	5486	322806	50,0	98,5
5	0	6780	326425	60,1	118,3
6	0	5737	339293	49,8	98,0
TB	0	6260			107,1
CV (%)					8,5
Đáp ứng trung bình của mẫu trắng /LLOQ				0	

Kết quả thẩm định cho thấy trong các mẫu trắng không xuất hiện pic tạp có cùng thời gian lưu của pic cefdinir trong các mẫu LLOQ. Tỷ lệ giữa nồng độ cefdinir xác định từ đường chuẩn so với nồng độ lý thuyết có trong các mẫu LLOQ nằm trong khoảng 98,0% - 116,1% (trung bình = 107,1% và CV = 8,5%), đáp ứng yêu cầu giới hạn định lượng dưới của phương pháp phân tích thuốc trong dịch sinh học [3],[6].

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

Tiến hành thẩm định độ đúng, độ lặp lại trên 5 lô mẫu QC bao gồm LLOQ, LQC, SQC, MQC và HQC chứa cefdinir có nồng độ tương ứng lần lượt là 50; 150; 800, 2500 và 3500 ng/ml. Xác định hàm lượng cefdinir có trong các mẫu bằng đường chuẩn phân tích trong cùng điều kiện. Độ đúng của phương pháp là tỷ lệ % giữa nồng độ thực tế 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	LLOQ (≈ 50 ng/ml)		LQC (≈ 150 ng/ml)		SQC (≈ 800 ng/ml)		MQC (≈ 2500 ng/ml)		MQC (≈ 3500 ng/ml)	
	Độ đúng (%)	CV (%)	Độ đúng (%)	CV (%)	Độ đúng (%)	CV (%)	Độ đúng (%)	CV (%)	Độ đúng (%)	CV (%)
Trong ngày	87,3	5,9	105,1	3,0	101,6	1,6	101,3	2,2	100,6	3,9
Khác ngày	91,5	6,1	105,9	4,2	100,6	1,8	99,8	3,7	98,7	3,0

Kết quả thẩm định cho thấy ở các nồng độ thấp, trung bình và cao, phương pháp có độ đúng trong ngày và khác ngày đạt từ 87,3% đến 105,9%; độ lặp lại trong ngày và khác ngày với giá trị CV nhỏ hơn 10%, đáp ứng yêu cầu đối với độ đúng, độ chính xác của phương pháp phân tích thuốc trong dịch sinh học [3],[6].

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

Tiến hành nghiên cứu độ ổn định của cefdinir trong huyết tương trên các lô mẫu LQC và HQC. Đánh giá độ ổn định của cefdinir trong huyết tương bằng cách so sánh nồng độ cefdinir có trong các mẫu được bảo quản và các mẫu có nồng độ tương ứng được phân tích ngay sau khi hòa tan chuẩn cefdinir vào huyết tương trắng. Kết quả nghiên cứu độ ổn định cefdinir được trình bày trong Bảng 4.

Bảng 4. Kết quả nghiên cứu độ ổn định của cefdinir trong huyết tương

Độ ổn định	Mẫu	Nồng độ ban đầu (ng/ml; n = 6)	Nồng độ sau bảo quản (ng/ml; n = 6)	% Sai khác
3 chu kỳ đông - rã đông	LQC	149,2	150,3	1,5
	HQC	3665,9	3495,7	-5,6
Độ ổn định thời gian ngắn (2,5 giờ; nhiệt độ phòng)	LQC	139,2	119,5	-14,2
	HQC	3442,3	2980,2	-13,4
Độ ổn định trong autosampler (24 giờ/4°C)	LQC	162,5	169,0	4,0
	HQC	3460,7	3785,2	9,4
Độ ổn định dài ngày (-70°C ± -5°C, 79 ngày)	LQC	149,2	163,0	9,2
	HQC	3665,9	3596,8	-1,9

Kết quả nghiên cứu độ ổn định cho thấy, các mẫu huyết tương chứa cefdinir ổn định sau 3 chu kỳ đông - rã đông, ổn định trong thời gian ngắn (nhiệt độ phòng; 2,5 giờ) và ổn định trong thời gian dài (-70°C; 79 ngày).

4. Kết luận

Nghiên cứu đã xây dựng được phương pháp định lượng cefdinir 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 (50 ng/ml); khoảng tuyến tính rộng (50 ng/ml đến 5000 ng/ml); độ đúng đạt từ 87,3% đến 105,9%; 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 và 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 cefdinir.

Tài liệu tham khảo

1. FDA, Omnicef DN1235V2 June 21, 2007
2. Cai-Li Zhang, Jian-Jie Jiao, Yan-Na Wu, Jun-qiu Song, Wei-Zhen Gao, De-Lu Ma and Jian-Shi Lou* (2011), “Study on Pharmacokinetics and Bioequivalence of Cefdinir Dispersible Tablet in Healthy Chinese Volunteers”. *Journal of Bioequivalence & Bioavailability*, Volume 3, Issue 6, pp. 114-117.
3. European Medicines Agency, Committee for Medicinal Products for Human Use (2011): *Guideline on Bioanalytical Method Validation*.
4. Golam Mortuza Shahed, Md Ashik Ullah, Abdullah Al Abdullah Al, Maizbha Uddin Ahmed, Mohammad Safiqul Islam, Zebun Nahar, Abul Hasnat (2011), “A Simple RP-HPLC Method for the Determination of Cefdinir in Human Serum: Validation and Application in a Pharmacokinetic Study with Healthy Bangladeshi Male Volunteers”. *Dhaka University Journal of Pharmaceutical Sciences*, Volume 10, Issue 2, pp. 109-116.

5. Khan A¹, Iqbal Z, Khan MI, Javed K, Khan A, Ahmad L, Shah Y, Nasir F. (2011), “Simultaneous determination of cefdinir and cefixime in human plasma by RP-HPLC/UV detection method: Method development, optimization, validation, and its application to a pharmacokinetic study”. *Journal of Chromatography B*, Volume 879, Issue 24, pp. 2423–2429.
6. U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration (2013): *Guidance for Industry - Bioanalytical Method Validation*.

SUMMARY

A simple, specific and sensitive HPLC method has been developed for determination of Cefdinir in human plasma. The analyte and the internal standard (Ciprofloxacin hydrochloride) were extracted from human plasma by the protein precipitation method with Perchloric acid then liquid-liquid extraction method with Chloroform. The chromatographic conditions were achieved on the type of column (C18; 250 x 4.6 mm; 5 µm) with PDA detector at wavelength 286 nm. The mobile phase included Methanol, Citric buffer (pH 2.0), Tetrahydrofuran with suitable ratio at a flow rate of 1.25 ml per min. The method was validated over concentration range from 50 to 5000 ng per ml. The intra and inter-day precision and accuracy were within between 87.3% and 110.0%. This method can be used for BA-BE studies of Cefdinir preparations.

(Ngày nhận bài: 31/12/2018 ; Ngày phản biện: 10/05/2019 ; Ngày duyệt đăng: 05/07/2019)

ĐỊNH TÍNH ĐỒNG THỜI *BIFIDOBACTERIUM LONGUM*, *LACTOBACILLUS ACIDOPHILLUS* VÀ *BACILLUS COAGULANS* TRONG MỘT SỐ CHẾ PHẨM PROBIOTIC BẰNG KỸ THUẬT MULTIPLEX PCR

KHÔNG THỊ MINH HUỆ, HỒ THỊ THOM, NGUYỄN THỊ THU HƯỜNG, NGUYỄN THỊ THU HƯƠNG,
LÊ THỊ HỒNG NGỌC, TRỊNH THỊ PHƯƠNG DUNG, BÙI QUỐC THÁI

Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương

Từ khóa: *Bifidobacterium longum*, *Lactobacillus acidophilus*, *Bacillus coagulans*, multiplex PCR

1. Đặt vấn đề

Probiotic là những vi sinh vật sống mà khi sử dụng với lượng phù hợp sẽ đem lại lợi ích sức khỏe của sinh vật chủ. Ngày nay, các chế phẩm probiotic xuất hiện ngày càng nhiều trên thị trường. Để tăng hiệu quả điều trị của các chế phẩm, các nhà sản xuất thường có xu hướng phối hợp 2 hoặc 3 loài vi sinh vật probiotic trong cùng một chế phẩm. Hiện nay, các chế phẩm chứa *Lactobacillus acidophilus* thường chiếm số lượng lớn. Tuy nhiên, các chế phẩm probiotics dưới dạng hỗn hợp *Lactobacillus acidophilus* kết hợp với một số loài vi khuẩn probiotics khác lại xuất hiện ngày càng nhiều.

Việc kiểm tra các chế phẩm probiotics đa thành phần thường gặp nhiều khó khăn do các vi sinh vật thuộc nhóm này thường có hình thái khuẩn lạc cũng như các phản ứng sinh hóa tương tự nhau. Vì vậy, rất khó có thể phân lập và định danh các loài vi sinh vật thuộc nhóm này nếu chỉ sử dụng các phương pháp truyền thống.

Hiện nay, trên thế giới cũng như ở Việt Nam, việc ứng dụng các kỹ thuật sinh học phân tử để định danh các loài vi sinh vật có mặt trong chế phẩm probiotic đang dần trở thành một công cụ hữu hiệu để kiểm soát chất lượng của các sản phẩm probiotic.

PCR là chữ viết tắt của cụm từ Polymerase Chain Reaction (phản ứng khuếch đại gen). PCR dựa trên cơ sở phản ứng kéo dài nhờ enzyme Taq DNA polymerase để khuếch đại in vitro các acid nucleic đặc hiệu trong thiết bị điều nhiệt tuần hoàn (thermocycler) hay còn gọi là máy PCR. PCR cho phép khuếch đại theo hàm mũ lên đến hàng triệu lần các đoạn DNA có chiều dài từ 200 - 3000 bp. Đoạn DNA được khuếch đại (DNA đích) được nhận dạng nhờ cặp mồi đặc hiệu (oligonucleotid), thường có chiều dài khoảng 20 nucleotid. Multiplex PCR chính là phản ứng PCR sử dụng nhiều cặp mồi đặc hiệu cho các đoạn DNA đích đặc hiệu từ nhiều đối tượng nghiên cứu muốn được phát hiện đồng thời [2].

Trong phạm vi bài này, chúng tôi tiến hành định tính đồng thời *Bifidobacterium longum*, *Lactobacillus acidophilus* và *Bacillus coagulans* trong một số chế phẩm probiotic đang lưu hành trên thị trường Hà Nội bằng kỹ thuật PCR đa mồi (multiplex PCR).

2. Thục nghiệm

2.1. Thiết bị, dụng cụ, hóa chất và mẫu nghiên cứu

2.1.1. Thiết bị và dụng cụ

Thiết bị đã được hiệu chuẩn theo yêu cầu của ISO/IEC 17025.

- Buồng thổi khí sạch Kebo (Thụy Điển);
- Tủ âm CO2 T 305-F (Thụy Điển);
- Tủ sấy Memmert ULE 600 (Đức);
- Nồi hấp Tomy SS-325 (Nhật);

- Máy li tâm lạnh Mikro-200R;
- Máy điện di gel XL-ULTRA-V-2 (Mỹ);
- Máy chụp ảnh gel UVDI- 312 (Đài Loan);
- Máy khuếch đại gen RealTime Step one Plus (Singapore);
- Máy lắc trộn Vortex Genie 2 (Mỹ);
- Micropipet (Eppendorf - Đức) 1000 µl, 100 µl, 10 µl.

2.1.2. Hóa chất và mẫu nghiên cứu

Trên cơ sở tham khảo các công trình nghiên cứu có liên quan, tham khảo nguồn gen của các loài vi sinh vật trên hệ thống ngân hàng gen thế giới (Genbank) và phần mềm, đã nghiên cứu để thiết kế các cặp mồi đặc hiệu cho từng đối tượng nghiên cứu.

Bảng 1. Trình tự các cặp mồi dùng cho phản ứng PCR

Loài	Tên mồi	Trình tự	Kích thước gen đích	Tài liệu tham khảo
Đoạn 16S rDNA	ID16R08F	5'-GGGGATCCAGAGTTTGGATCCTGGCTCA-3'	1500 bp	[4]
	IDL16R09R	5'-GGCTCGAGTACCTTGTTACGACTTCACC-3'		
<i>L. acidophilus</i>	LacidoF	5'-CACTTCGGTGATGACGTTGG-3'	575 bp	[5]
	LacidoR	5'-CGATGCAGTTCCTCGGTTAAGC-3'		
<i>B.coagulans</i>	CoAF	5'-CGACTGAGATAAAGGAAACACG-3'	168 bp	[3]
	CoAR	5'-AAACTGAACAAAACGGAAACG-3'		
<i>B. longum</i>	BlonF	5'-TTC CAG TTG ATC GCA TGG TC-3'	831 bp	[5]
	BlonR	5'-GGG AAG CCG TAT CTC TAC GA-3'		

Môi trường nuôi cấy vi sinh vật: Môi trường MRS lỏng và môi trường thạch MRS (hãng Merck).

Kit tách DNA có tên thương mại Wizard Genomic DNA Purification Kit do hãng Promega sản xuất, hóa chất cho phản ứng PCR, thang chuẩn DNA và các cặp mồi đều do hãng Invitrogen sản xuất. Các hóa chất còn lại đều đạt độ tinh khiết dùng cho nghiên cứu sinh học phân tử.

2.2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Đối tượng nghiên cứu

27 chế phẩm có chứa các vi sinh vật probiotic thuộc đối tượng nghiên cứu bao gồm: *Bifidobacterium longum*, *Lactobacillus acidophilus* và *Bacillus coagulans*. Các chế phẩm này do các công ty dược phẩm trong và ngoài

nước sản xuất, được đăng ký dưới dạng thực phẩm chức năng và được bán trên thị trường thuốc tại Hà Nội.

Vì đây là nghiên cứu có hệ thống trên toàn bộ các sản phẩm cùng loại trên thị trường để có thông tin chung về thực trạng của các loại sản phẩm probiotic nên tên thương mại của chúng sẽ không được công bố trực tiếp trong kết quả nghiên cứu. Mẫu được mã hóa từ 1 đến 27.

2.2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.2.1. Tách chiết DNA của vi khuẩn bằng Wizard Genomic DNA Purification Kit

Mục tiêu của chuyên đề là ứng dụng các quy trình định tính sự có mặt của vi sinh vật có ích trong chế phẩm probiotic nhằm kiểm tra nhanh một cách có hệ thống

thành phần vi khuẩn, không quan tâm đến số lượng của các loài có mặt trong chế phẩm nghiên cứu. Mặt khác, vì các chế phẩm thu mua được hầu hết là các chế phẩm probiotic đa thành phần, việc lựa chọn khuẩn lạc đặc trưng cho loài trên môi trường nuôi cấy chọn lọc gặp nhiều khó khăn, do đó chúng tôi tiến hành tách chiết DNA tổng số của vi khuẩn trực tiếp từ chế phẩm thuốc, hoặc từ môi trường tăng sinh vi khuẩn từ thuốc.

DNA của các đối tượng nghiên cứu được tách và tinh sạch bằng kit của hãng Promega, có sự cải tiến. Quy trình thực nghiệm tóm tắt như sau:

- Cân 1 g bột mẫu thử vào ống thủy tinh vô khuẩn chứa 10 ml môi trường MRS lỏng vô trùng, ủ ở 37°C trong 48 h.

- Lấy 1 ml môi trường tăng sinh chủng trên (hoặc hỗn dịch bột thuốc trong môi trường MRS lỏng trước khi tăng sinh) vào ống nhựa 1,5 ml. Ly tâm ống ở 8000 vòng/phút trong 10 phút, loại dịch nổi thu lấy cần. Thêm 480 µl dung dịch EDTA 50 mM vào ống, lắc đều để hòa tan cần. Thêm tiếp 120 µl dung dịch lyzozyn (10 mg/ml) trộn đều, ủ ở 37°C trong 30 - 60 phút. Ly tâm ống ở 10.000 - 12.000 vòng trong 2 phút. Loại bỏ dịch nổi thu lấy cần. Các bước tiếp theo trong quy trình được thực hiện theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Dung dịch DNA sau khi tách chiết được bảo quản ở - 20°C.

2.2.2.2 Nhân bản các đoạn gen đặc hiệu bằng kỹ thuật PCR/multiplex PCR (PCR đa môi)

- Để kiểm tra hiệu quả tách chiết DNA tổng số của vi khuẩn, chúng tôi tiến hành phản ứng PCR với cặp môi ID16R08F và IDL16R09R. Thành phần phản ứng và chu trình nhiệt của phản ứng PCR được trình bày ở Bảng 2 và Bảng 3.

Bảng 2. Chu trình nhiệt cho phản ứng nhân bản đoạn gen 16S rDNA bằng cặp môi ID16R08F và IDL16R09R

Nhiệt độ	Thời gian	Số chu kỳ
94°C	5 phút	1 chu kỳ
94°C	30 giây	30 chu kỳ
60°C	45 giây	
72°C	1 phút 30 giây	
72°C	5 phút	1 chu kỳ

Sản phẩm PCR sau đó được phát hiện bằng cách điện di trên gel agarose 1%.

Bảng 3. Bảng thành phần PCR cho phản ứng nhân bản đoạn gen 16S rDNA bằng cặp môi ID16R08F và IDL16R09R

Thành phần	Dãi nồng độ
dNTP (mM)	0,2
MgCl ₂ (mM)	1,5
Đệm phản ứng (X)	1
Taq ADN-polymerase (U)	0,2
ID16R08F/IDL16R09R (µM)	0,4

- Để phát hiện đồng thời sự có mặt của các loài *Bifidobacterium longum*, *Lactobacillus acidophilus* và *Bacillus coagulans* trong các chế phẩm probiotic, chúng tôi tiến hành phản ứng nhân bản đồng thời 3 đoạn gen đặc hiệu của các loài này bằng kỹ thuật multiplex PCR (PCR đa môi). Thành phần phản ứng và chu trình nhiệt của phản ứng PCR đa môi được trình bày như ở Bảng 4 và Bảng 5.

Sản phẩm PCR sau đó được phát hiện bằng cách điện di trên gel agarose 2%.

Bảng 4. Chu trình nhiệt cho phản ứng nhân bản đồng thời 3 đoạn gen đặc hiệu của *B. longum*, *L. acidophilus* và *B. coagulans*

Nhiệt độ	Thời gian	Số chu kỳ
94°C	5 phút	1 chu kỳ
94°C	30 giây	30 chu kỳ
56°C	45 giây	
72°C	45 giây	
72°C	5 phút	1 chu kỳ

Bảng 5. Bảng thành phần PCR tối ưu cho phản ứng nhân bản đồng thời 3 đoạn gen đặc hiệu của *B. longum*, *L. acidophilus* và *B. coagulans*

Thành phần	Dãi nồng độ
dNTP (mM)	0,2
MgCl ₂ (mM)	1,8
Đệm phản ứng (X)	0,5
Taq ADN-polymerase (U)	0,5
Môi: Blon:Lacido:CoA (µM)	0,1:0,2:0,2

Chú thích: Blon: hỗn dịch cặp môi BlonF/BlonR; Lacido: hỗn dịch cặp môi LacidoF/LacidoR; CoA: hỗn dịch cặp môi CoAF/CoAR

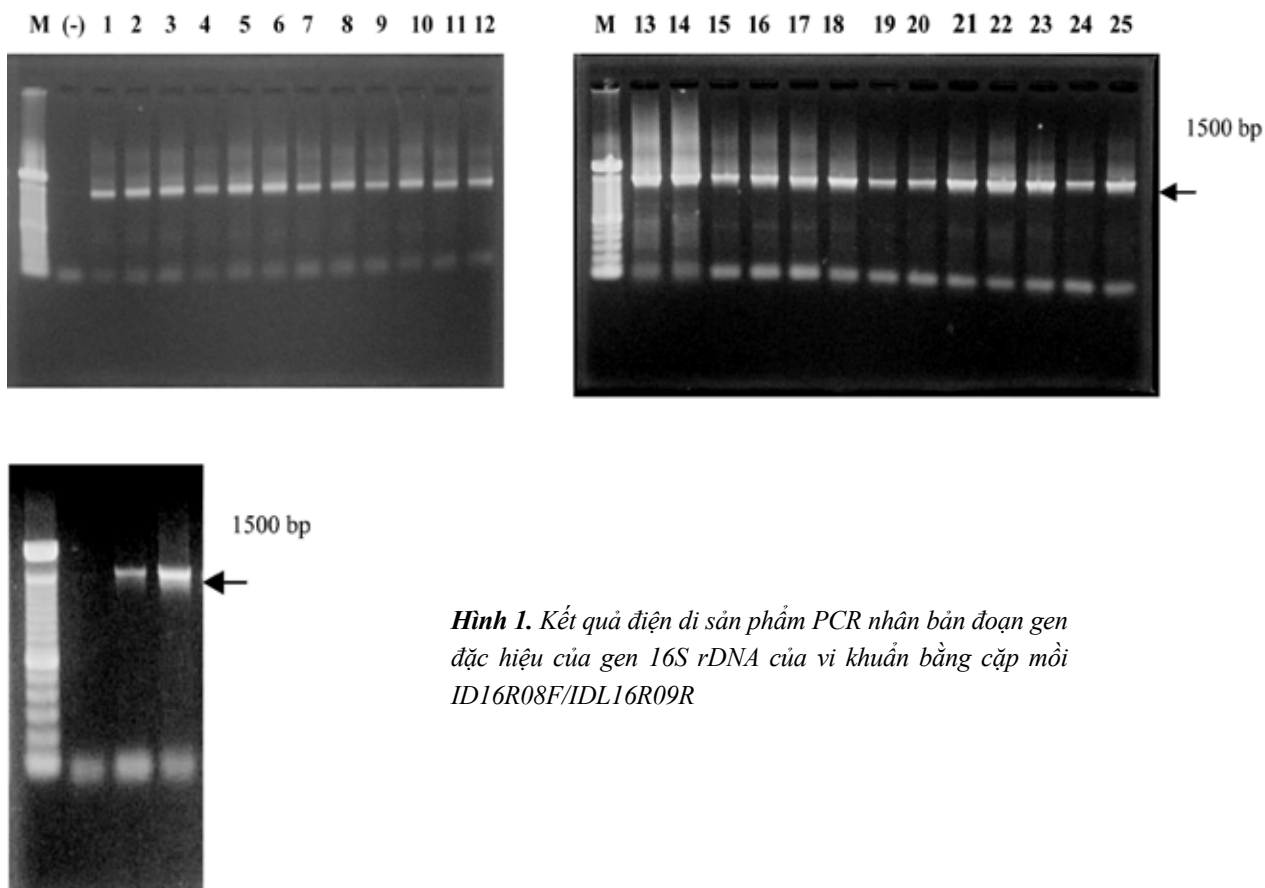
3. Kết quả và bàn luận

3.1. Kết quả tách chiết DNA tổng số của vi khuẩn từ các mẫu nghiên cứu

16S ribosom RNA là một thành phần của các tiểu đơn vị 30s nhỏ trong ribosom vi khuẩn. Gen mã hóa cho thành phần này gọi là 16S rDNA, có tính chất bảo thủ và đặc trưng cho các loài vi khuẩn. Đây là trình tự gen đích được sử dụng phổ biến nhất trong các kỹ thuật định danh vi khuẩn hiện nay.

Để kiểm tra hiệu quả tách chiết DNA tổng số từ các đối tượng nghiên cứu, sau khi tách chiết DNA theo quy trình như ở mục 2.2.2.1, chúng tôi tiến hành nhân bản đoạn gen 16S rDNA của vi khuẩn bằng cặp mồi ID16R08F và IDL16R09R với thành phần phản ứng và chu trình nhiệt mô tả như ở mục 2.2.2.2.

Kết quả điện di sản phẩm PCR được trình bày ở Hình 1.



Hình 1. Kết quả điện di sản phẩm PCR nhân bản đoạn gen đặc hiệu của gen 16S rDNA của vi khuẩn bằng cặp mồi ID16R08F/IDL16R09R

Kết quả từ Hình 1 cho thấy, tất cả 27 mẫu đều cho băng nhân bản có kích thước khoảng 1500 bp, tương ứng với băng nhân bản thu được theo tính toán lý thuyết với cặp mồi ID16R08F/IDL16R09R. Kết quả này chứng tỏ chúng tôi đã thu được DNA tổng số của vi sinh vật ở tất cả 27 mẫu.

Các mẫu DNA được bảo quản ở - 20°C, và được sử dụng để làm khuôn cho các quy trình multiplex PCR tiếp theo.

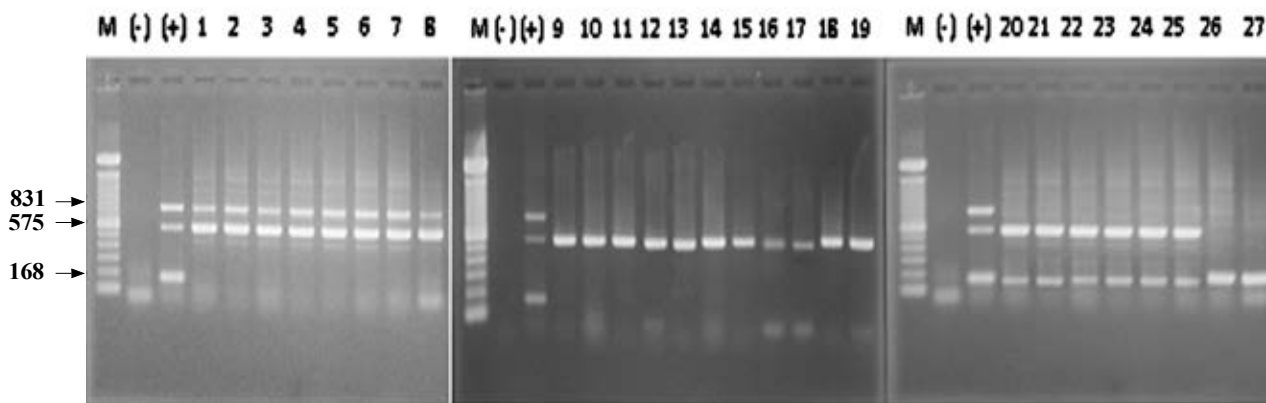
3.2. Định tính đồng thời *Bifidobacterium longum*, *Lactobacillus acidophilus* và *Bacillus coagulans* trong một số chế phẩm probiotic bằng kỹ thuật multiplex PCR (PCR đa mồi)

Công thức đăng ký trên nhãn thành phần vi khuẩn của các chế phẩm probiotic được sơ đồ hóa ở Bảng 6. Dựa vào thành phần đăng ký trên nhãn, chúng tôi tiến hành quy trình nhân bản đồng thời 3 đoạn gen đặc hiệu của các loài vi khuẩn *B. longum*, *L. acidophilus* và *B. coagulans* với khuôn là DNA tổng số tách chiết từ các mẫu từ số 1 đến số 27.

Kết quả điện di sản phẩm PCR của các quy trình được trình bày ở Hình 2 và sơ đồ hóa ở Bảng 6.

Bảng 6. Bảng so sánh thành phần các loài vi khuẩn ghi trên nhãn và kết quả kiểm tra bằng quy trình PCR đã thiết lập

Mẫu (đã mã hóa bằng số)	Loài vi khuẩn ghi trên nhãn			Kết quả kiểm tra bằng quy trình PCR đã thiết lập		
	<i>B. longum</i>	<i>L. acidophilus</i>	<i>B. coagulans</i>	<i>B. longum</i>	<i>L. acidophilus</i>	<i>B. coagulans</i>
1	+	+	-	+	+	-
2	+	+	-	+	+	-
3	+	+	-	+	+	-
4	+	+	-	+	+	-
5	+	+	-	+	+	-
6	+	+	-	+	+	-
7	+	+	-	+	+	-
8	+	+	-	+	+	-
9	+	+	-	-	+	-
10	+	+	-	-	+	-
11	?	+	-	-	+	-
12	?	+	-	-	+	-
13	?	+	-	-	+	-
14	?	+	-	-	+	-
15	?	+	-	-	+	-
16	?	+	-	-	+	-
17	?	+	-	-	+	-
18	?	+	-	-	+	-
19	?	+	-	-	+	-
20	-	+	+	-	+	+
21	-	+	+	-	+	+
22	-	+	+	-	+	+
23	-	+	+	-	+	+
24	-	+	+	-	+	+
25	-	+	+	-	+	+
26	-	-	+	-	-	+
27	-	-	+	-	-	+



Hình 2. Kết quả điện di sản phẩm PCR nhân bản đồng thời 3 đoạn gen đặc hiệu của *B. longum* (831 bp), *L. acidophilus* (575 bp) và *B. coagulans* (168 bp)

M: marker 100 bp (Invitrogen)

(-): chứng âm tính (khuôn là nước cất vô khuẩn, không chứa DNA)

(+): chứng dương tính (khuôn là hỗn hợp plasmid mang các đoạn gen đặc hiệu của các loài *Bifidobacterium longum*, *Lactobacillus acidophilus* và *Bacillus coagulans*)

1-27: khuôn là DNA tổng số tách chiết từ các mẫu số 1-27

Kết quả từ Bảng 6 và Hình 2 cho thấy, bằng quy trình nhân bản đồng thời 3 đoạn gen đặc hiệu cho các loài *B. longum*, *L. acidophilus* và *B. coagulans*, chúng tôi đã xác định được sự có mặt của các loài vi sinh vật này trong các chế phẩm thuốc. Trong 27 mẫu thuốc, 25 mẫu có loài *L. acidophilus* (mẫu số 1 đến mẫu 25) và 8 mẫu có chứa *B. coagulans* (mẫu số 20 đến mẫu 27). Kết quả này hoàn toàn phù hợp với công thức đăng ký thành phần vi khuẩn của các mẫu thuốc này. Riêng đối với loài *B. longum*, bằng quy trình đã thiết lập, chúng tôi chỉ phát hiện thấy có 8 mẫu là có chứa loài này (mẫu 1 đến mẫu 8). Đối với mẫu 9 và mẫu 10, mặc dù trên công thức thành phần trên nhãn có đăng ký loài *B. longum*, bằng quy trình đã thiết lập, chúng tôi không phát hiện thấy sự có mặt của loài này trong 2 chế phẩm trên. Điều này có thể được giải thích do không có hoặc có rất ít lượng vi khuẩn *B. longum* trong các chế phẩm này.

Theo nghiên cứu của Trịnh Thị Phương Dung [1], các chủng thuộc chi *Lactobacillus* và *Streptococcus faecalis* không phát triển được trên môi trường thạch BSM, trong khi đó vẫn mọc tốt trên môi trường thạch MRS. Như vậy chứng tỏ môi trường thạch BSM có tính chọn lọc cao, thích hợp để định lượng và phân lập riêng *B. longum* trong hỗn hợp vi sinh vật [1]. Do đó, chúng

tôi đã sử dụng môi trường thạch BSM để xác định sơ bộ số lượng loài *B. longum* trong 10 chế phẩm có đăng ký *B. longum* ở công thức trên nhãn. Kết quả cho thấy, các mẫu từ số 1 đến mẫu số 8, số lượng vi khuẩn *B. longum* là từ 2×10^3 đến $3,22 \times 10^8$ CFU/gói. Riêng đối với 2 mẫu số 9 và số 10, chúng tôi không thu được khuẩn lạc nào trên môi trường thạch BSM.

Như vậy, kết quả này là hoàn toàn phù hợp với kết quả không phát hiện được sự có mặt của loài này trong 2 chế phẩm số 9 và số 10 bằng quy trình định tính bằng kỹ thuật PCR.

Hiện nay, các chế phẩm thuốc probiotic được đăng ký dưới dạng thực phẩm chức năng probiotic thường dễ sản xuất và thường được đăng ký theo tiêu chuẩn của các nhà sản xuất. Các tiêu chuẩn này hiện không phải tuân theo các quy chuẩn chất lượng nghiêm ngặt nào. Điều này gây ra không ít khó khăn trong công tác kiểm tra giám sát chất lượng các chế phẩm probiotic tại Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương cũng như tại các trung tâm kiểm nghiệm thuốc hệ thống.

Một trong các nguyên nhân dẫn đến hiện trạng trên là do chưa có một hệ thống phương pháp rõ ràng nào được áp dụng để kiểm soát sự có mặt của các loài vi sinh vật có trong các chế phẩm probiotic. Những khó khăn

trong công tác giám sát chất lượng các chế phẩm này là do các loài vi khuẩn được phối trộn trong một chế phẩm thường rất tương đồng nhau về điều kiện nuôi cấy, hình thái, phản ứng sinh hóa. Do đó, rất khó để xác định sự có mặt của từng loài trong chế phẩm đa thành phần nếu chỉ sử dụng các phương pháp phát hiện truyền thống.

Do đó, bên cạnh các phương pháp định danh truyền thống, việc triển khai nghiên cứu phát triển các phương pháp hiện đại mới ứng dụng vào công tác kiểm nghiệm sẽ góp phần nâng cao hiệu quả kiểm tra giám sát chất lượng thuốc và thực phẩm chức năng, đảm bảo tính an toàn cho các sản phẩm này trước khi đến tay người tiêu dùng.

4. Kết luận

Kỹ thuật PCR là một công cụ hữu hiệu để định danh vi sinh vật nói chung và các loài vi khuẩn sinh acid lactic nói riêng. Kỹ thuật phân tích được tiến hành nhanh chóng, có độ chính xác cao, và khắc phục được các hạn chế của các kỹ thuật truyền thống. Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã áp dụng quy trình PCR đa môi để định tính đồng thời *Bifidobacterium longum*, *Lactobacillus acidophilus* và *Bacillus coagulans* trong một số chế phẩm probiotic đa thành phần đang lưu hành trên thị trường Hà Nội. Kết quả nghiên cứu là tiền đề để giúp chúng tôi tiếp tục nghiên cứu, phát triển phương pháp nhằm ứng dụng vào việc định danh các loài vi khuẩn khác trong các chế phẩm probiotic cũng như các loài vi khuẩn chỉ điểm y tế trong các chế phẩm thuốc.

Tài liệu tham khảo

1. Trịnh Thị Phương Dung, 2014. *Xây dựng quy trình xác định (định tính, định lượng) Bifidobacterium longum trong các chế phẩm probiotic*, Luận văn thạc sĩ dược học, trường Đại học Dược Hà Nội, Hà Nội.
2. Nguyễn Hùng Vân, 2009. *PCR và Realtime PCR. Các vấn đề cơ bản và các áp dụng thường gặp*, Nhà xuất bản Y học chi nhánh thành phố Hồ Chí Minh.
3. Atsuhito Enda and Norihito Taguchi, 2009. Polymorphism in 16S-23S rDNA Internal Transcribed Spacer (ITS) Region of *Bacillus coagulans*.
4. Huyn-Sang Kwon, Eun-Hee- Yang, Seung-Woo-Yeon, 2004. Rapid identification of probiotic *Lactobacillus* species by multiplex PCR using species-specific primers based on the region extending from 16S rRNA through 23S rRNA. *FEMS Microbiology Letters*. 239: 267-275
5. Sul, Su-yeon, Hyun-Joon Kim, Tae-Woo Kim và Hae-yeong Kim, 2007. Rapid Identification of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* in Probiotic Products Using Multiplex PCR. *J. Microbiol. Biotechnol.* **17** (3):490-495.

SUMMARY

In order to stimulate identify Bifidobacterium longum, Lactobacillus acidophilus and Bacillus coagulans in probiotics products, the total genomic DNA from samples were extracted by using Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega, USA), according to the manufacturer's instruction with some modifications. The obtained DNA was used for multiplex PCR with three pairs of primer, namely BlonF/BlonR, LacidoF/LacidoR and CoAF/CoaR which are specific for the 16S ribosomal RNA gene of Bifidobacterium longum, Lactobacillus acidophilus and for the 16S-23S ribosomal RNA intergenic transcribed spacer (ITS) of Bacillus coagulans.

The thermal cycle consisted of the following time and temperature profile: 94°C for 5 minute, 30 cycle of 30s at 94°C for denaturing, 45s at 56°C for primer annealing and 45s at 72°C for extension, and final extention at 72°C for 5 minute. With the condition, the bands of 831 bp for Bifidobacterium longum, 575 bp for Lactobacillus acidophilus and 168 bp for Bacillus coagulans were successfully amplified. By using the multiplex PCR procedure, we were able to stimulate identify Bifidobacterium longum, Lactobacillus acidophilus and Bacillus coagulans in 27 probiotics products.

(Ngày nhận bài: 30/11/2016 ; Ngày phản biện: 27/5/2018 ; Ngày duyệt đăng: 24/9/2018)

KHẢO SÁT KHẢ NĂNG SỬ DỤNG DÒNG CHUỘT SWISS TRONG VIỆC ĐÁNH GIÁ HOẠT LỰC CỦA SINH PHẨM TÁI TỔ HỢP ERYTHROPOIETIN

NGUYỄN THỊ LIÊN, ĐOÀN CAO SƠN
Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương

Từ khóa: Erythropoietin, chuột Swiss, hoạt lực, hồng cầu lưới

1. Đặt vấn đề

Erythropoietin (EPO) là sinh phẩm điều trị quan trọng trên lâm sàng được chỉ định cho các trường hợp thiếu máu ở người suy thận mạn tính, thiếu máu do hóa trị liệu điều trị ung thư không có nguồn gốc từ tủy, thiếu máu trên bệnh nhân HIV dương tính đang sử dụng zidovudin, thiếu máu ở trẻ sinh non có cân nặng thấp, bổ sung cùng sắt để làm tăng máu tự thân trước phẫu thuật [1]. Trên thị trường thuốc Việt Nam, EPO chủ yếu được nhập khẩu từ nhiều quốc gia khác nhau như Argentina, Cu Ba, Hàn Quốc, Trung Quốc, Ấn Độ,... và được bán dưới nhiều tên biệt dược như Hemax, Epotiv, Epokine, Eryhum, Ior Epocim, Hemapo, Recombinant Human Erythropoietin for injection, Relipoietin,... Tuy nhiên việc kiểm soát chất lượng của các sinh phẩm nhập khẩu cũng như sinh phẩm tự sản xuất hoặc ra lẻ trong nước còn gặp nhiều khó khăn. Gần đây, mặc dù đã có nhiều nỗ lực trong việc kiểm soát sinh phẩm EPO, song tất cả mới chỉ dừng lại ở việc kiểm tra các chỉ tiêu lý, hóa (cảm quan, pH, độ trong, thể tích), một số chỉ tiêu an toàn (thử độ vô khuẩn, thử nội độc tố vi khuẩn, thử an toàn chung) và một vài chỉ tiêu sinh học (như định tính, định lượng, thử giới hạn tạp). Một trong những chỉ tiêu chất lượng quan trọng đó là thử hoạt lực của EPO in vivo thì vẫn chưa thực hiện được vì chỉ tiêu này đa phần các tiêu chuẩn cơ sở cũng như Dược điển các nước như Anh, Mỹ, Hàn Quốc và Trung Quốc đều quy định sử dụng chuột dòng B6D2F1 [3],[6],[7],[8] hay dòng BALB/c [5],[6] để thử. Mặc dù Dược điển Ấn Độ có đề cập đến khả năng dùng dòng chuột Swiss để đánh giá hoạt lực in vivo của EPO nhưng chưa đưa ra được các tiêu chí để tuyển chọn cho phù hợp với yêu cầu của thử nghiệm [5]. Dược điển Việt Nam hiện hành cũng chưa có chuyên luận về erythropoietin [2]. Hiện nay ở Việt Nam chưa có đơn vị nào có thể cung cấp được dòng chuột B6D2F1 hay BALB/c. Dòng chuột được cung cấp phổ biến ở trong nước hiện nay là dòng chuột Swiss.

Chính vì vậy, chúng tôi tiến hành khảo sát khả năng sử dụng dòng chuột Swiss để đánh giá hoạt lực của sinh phẩm tái tổ hợp erythropoietin với mong muốn xây dựng một quy trình đánh giá hoạt lực của EPO trên dòng chuột Swiss thay thế cho dòng chuột B6D2F1 hay BALB/c ít phổ biến và đắt tiền hơn.

2. Thực nghiệm

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

2.1.1. Hóa chất, chất chuẩn

- Chất chuẩn erythropoietin BRP (đạt tiêu chuẩn Dược điển Anh, nguồn gốc: EDQM, số lô: 4.0, hoạt lực: 13000 IU/lg);
- Hóa chất xét nghiệm huyết học (Sysmex, Nhật Bản);
- Natri clorid (Prolabo, Bỉ);
- Albumin bò (Sigma, USA);
- Dinatri hydrophosphat (Scharlau, EU).

2.1.2. Thiết bị, dụng cụ

- Máy đo pH (Metrohm 691 – Thụy Sĩ, số máy: 3920);
- Tủ sấy (Mettler U15 – Đức, số máy: E-Nr 86041);
- Cân kỹ thuật (MRC BWLC 06- B1 - Israel, số máy: 365856);
- Máy xét nghiệm huyết học (Sysmex XT-2000i-1, Nhật Bản);
- Bộ pipet tự động eppendorf, dụng cụ thủy tinh chính xác các loại.

2.2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Đối tượng nghiên cứu

Chuột Swiss (4 tuần tuổi) được cung cấp từ Trung tâm CIMADE Viện Vệ sinh Dịch tễ Trung ương. Chuột được nuôi 6 - 8 con một chuồng trong phòng nuôi có kiểm soát nhiệt độ và độ ẩm thích hợp với thức ăn và nước uống theo nhu cầu. Tất cả các quy trình thực hiện trên động vật thí nghiệm đều được chuẩn hóa theo các

quy định của GLP và ISO/IEC 17025 và tuân thủ các quy định đạo đức trong nghiên cứu y sinh học.

2.2.2. Thuốc nghiên cứu

Epokine prefilled injection 2000 U/0,5 ml (Nguồn gốc: CJ Health Care Corporation, Hàn Quốc, số lô: ES26C4A, NSX: 20/8/2016, HD: 19/8/2018).

2.2.3. Phương pháp nghiên cứu

2.2.3.1. Khảo sát tuần tuổi của chuột phù hợp để làm thử nghiệm đánh giá hoạt lực sinh học của EPO

Thực nghiệm phân tích % hồng cầu lưới có trong máu của 5 chuột ở tuần tuổi từ 4 – 8 tuần. Sở dĩ chúng tôi chọn khoảng tuần tuổi này vì đây là giai đoạn cai sữa đến trưởng thành, cơ thể chuột có những thay đổi lớn về kích thước trọng lượng cũng như sinh lý. Chuột được lấy máu ở tĩnh mạch đuôi mỗi tuần một lần, mỗi lần 2-3 giọt để phân tích bằng kỹ thuật đếm số lượng hồng cầu.

2.2.3.2. Khảo sát thời điểm lấy máu sau khi dùng thuốc

Thiết kế thí nghiệm để khảo sát thời điểm lấy máu sau khi dùng thuốc như sau:

- Động vật thí nghiệm: Dùng 6 chuột Swiss 8 tuần tuổi, khỏe mạnh, khối lượng trong khoảng khối lượng trung bình $\pm 20\%$. Chuột được nhốt riêng rẽ 3 đực, 3 cái.

- Dung dịch thuốc tiêm: Chất chuẩn EPO pha trong nước muối sinh lý đến nồng độ 80 IU/ml.

- Đường tiêm: dưới da gáy
- Thể tích tiêm: 0,5 ml/con
- Thời điểm tiêm: khoảng 9 h sáng
- Thời điểm lấy máu: 0 h (trước tiêm), 24 h, 48 h, 72 h, 96 h và 120 h sau tiêm.

- Kỹ thuật lấy máu: tĩnh mạch đuôi
- Thể tích máu lấy: 0,1 - 0,15 ml/con
- Kỹ thuật đếm hồng cầu lưới: đếm thủ công (áp dụng với thể tích máu nhỏ).

2.2.3.3. Xây dựng quy trình xác định hoạt lực in vivo của EPO

Dựa trên các kết quả thu được ở mục 2.2.3.1 và 2.2.3.2, tham khảo Dược điển [3],[5],[6],[7],[8] để xây dựng quy trình chi tiết xác định hoạt lực in vivo của EPO.

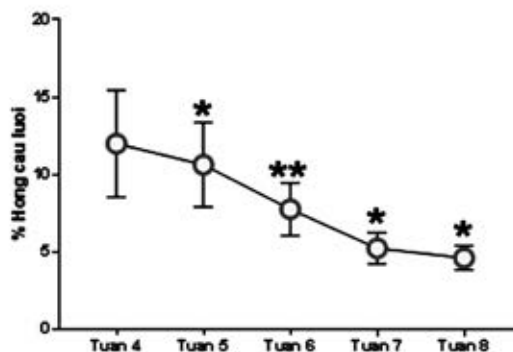
2.2.3.4. Xác định hoạt lực in vivo của chế phẩm chứa erythropoietin đang lưu hành trên thị trường

Dựa trên quy trình vừa xây dựng tiến hành đánh giá hoạt lực in vivo của chế phẩm Epokine prefilled injection.

3. Kết quả và bàn luận

3.1. Khảo sát tuần tuổi của chuột phù hợp để làm thử nghiệm đánh giá hoạt lực sinh học của EPO.

Kết quả khảo sát % hồng cầu lưới trong máu chuột từ 4 - 8 tuần tuổi được trình bày ở Hình 1.



Hình 1. % Hồng cầu lưới trong máu chuột ở 4 – 8 tuần tuổi (dấu * biểu thị sự so sánh với tuần liền trước; ** biểu thị $P < 0,01$; * biểu thị $P < 0,05$).

Kết quả ở Hình 1 cho thấy:

- + Ở giai đoạn sau cai sữa (4 tuần) chuột còn non, % hồng cầu lưới trong máu cao (12,02%) và mức độ dao động giữa các cá thể lớn (12,02% \pm 3,44; n = 6).

- + Ở tuần tuổi thứ 5, % hồng cầu lưới trong máu chuột đã giảm có ý nghĩa so với tuần tuổi thứ 4 xuống còn 10,65% ($P < 0,05$). Tuy nhiên dao động giữa các cá thể vẫn còn rất lớn (10,65% \pm 2,72; n = 6).

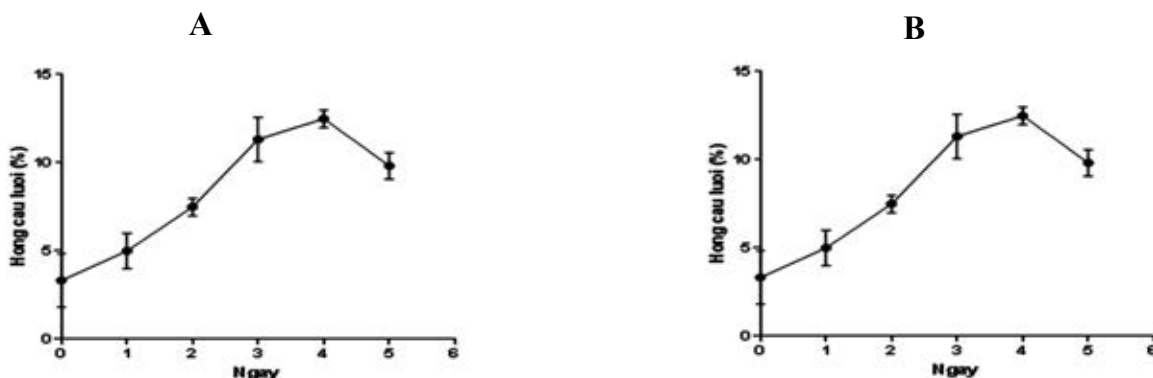
- + Ở tuần tuổi thứ 6, % hồng cầu lưới trong máu chuột đã giảm có ý nghĩa so với tuần tuổi thứ 5 xuống còn 7,78% ($P < 0,01$). Tuy nhiên dao động giữa các cá thể vẫn còn lớn (7,78% \pm 1,68; n = 6).

- + Ở tuần tuổi thứ 7, % hồng cầu lưới trong máu chuột đã giảm so với tuần thứ 6 xuống còn 5,62% ($P < 0,05$). Dao động giữa các cá thể nhỏ (5,62% \pm 1,01; n = 6).

- + Ở tuần tuổi thứ 8, % hồng cầu lưới trong máu chuột đã ổn định, chỉ giảm nhẹ so với tuần thứ 7 xuống còn 4,63% ($P < 0,05$). Chỉ số này tương đối đồng đều giữa các cá thể (4,634% \pm 0,78; n = 6).

Từ kết quả trên chúng tôi nhận thấy: ở giai đoạn chưa trưởng thành (4 - 6 tuần tuổi) chỉ số hồng cầu lưới của chuột dao động mạnh và không đồng đều giữa các cá thể, không thích hợp để làm thử nghiệm. Tuần tuổi thứ 7 chỉ số hồng cầu lưới đã bước sang giai đoạn ổn định tuy nhiên vẫn còn cao có ý nghĩa so với tuần thứ 8. Tuần thứ 8 chuột đã trưởng thành ổn định và đồng đều về chỉ số hồng cầu lưới có thể sử dụng để làm thử nghiệm. Do đó chuột ở tuần tuổi thứ 8 được lựa chọn để làm

thử nghiệm. Tuổi của chuột Swiss chúng tôi đưa ra là tương đồng với tuổi chuột B6D2F1 hay chuột BALB/c được quy định trong các Dược điển Anh, Mỹ, Hàn Quốc và Trung Quốc [3],[6],[7],[8].



Hình 2. Hình biểu diễn mối quan hệ giữa thời điểm tiêm thuốc và % hồng cầu lưới trong máu của chuột Swiss giống cái (A) và giống đực (B).

Theo kết quả trình bày ở Hình 2 cho thấy: Hồng cầu lưới ở máu chuột Swiss trưởng thành khoảng 3 - 4%; sau khi tiêm EPO hồng cầu lưới bắt đầu tăng khá nhanh từ ngày 1 đến ngày 4; thời điểm hồng cầu lưới đạt nồng độ cao nhất trong máu sau khi tiêm EPO là ngày 4 ở chuột đực (12,5%) và chuột cái (13,2%); đến ngày 5 sau tiêm, hồng cầu lưới bắt đầu có xu hướng giảm ở cả 2 giống đực và cái. Dựa trên kết quả thực nghiệm thu được, chúng tôi quyết định chọn ngày 4 sau tiêm EPO là ngày lấy máu xét nghiệm đếm hồng cầu lưới. Kết quả khảo sát thời điểm lấy máu sau khi dùng thuốc trong nghiên cứu này tương tự kết quả trong nghiên cứu trước của Ramos et al., về sự tăng hồng cầu lưới tương ứng với liều tiêm và thời điểm tiêm EPO [4]. Thời điểm lấy máu chúng tôi tìm được cũng phù hợp với hướng dẫn trong Dược điển là 4 ngày sau khi tiêm thuốc [3],[5],[6],[7],[8].

3.3. Xây dựng quy trình xác định hoạt lực *in vivo* của EPO

Dựa trên các kết quả thực nghiệm thu được ở mục 3.1, 3.2, đồng thời tham khảo quy trình nêu trong các Dược điển [3],[5],[6],[7],[8], chúng tôi xây dựng quy trình đánh giá hoạt lực của sinh phẩm EPO trên chuột Swiss như sau:

3.3.1. Động vật thí nghiệm

- Chuột Swiss 8 tuần tuổi, khỏe mạnh, giống đực hoặc giống cái (không mang thai/đang cho con bú), cân nặng trong khoảng cân nặng trung bình $\pm 20\%$.

- Số lượng: 48 con.

3.2. Khảo sát thời điểm lấy máu sau khi dùng thuốc

Mối liên hệ giữa % hồng cầu lưới trong máu và thời điểm dùng thuốc được thể hiện trên Hình 2.

3.3.2. Chuẩn bị các dung dịch

- Dung môi pha mẫu: Hòa tan 10,75 g dinatri hydrophosphat, 7,6 g natri clorid, và 1 g albumin bò vào 1000 ml nước. Điều chỉnh về pH 7,0 bằng acid phosphoric. Lọc qua màng 0,22 μm . Chuẩn bị ngay trước khi dùng.

- Dung dịch thử:

+ Dung dịch thử 1: Pha loãng mẫu thử với dung môi pha mẫu để thu được dung dịch có nồng độ khoảng 80 IU/ml.

+ Dung dịch thử 2: Pha loãng đồng thể tích dung dịch thử 1 với dung môi pha mẫu để thu được dung dịch có nồng độ khoảng 40 IU/ml.

+ Dung dịch thử 3: Pha loãng đồng thể tích dung dịch thử 2 với dung môi pha mẫu để thu được dung dịch có nồng độ khoảng 20 IU/ml.

- Dung dịch chuẩn:

+ Dung dịch chuẩn 1: Hòa tan chất chuẩn EPO trong dung môi pha mẫu để thu được dung dịch chuẩn có nồng độ chính xác khoảng 80 IU/ml.

+ Dung dịch chuẩn 2: Pha loãng đồng thể tích dung dịch chuẩn 1 với dung môi pha mẫu để thu được dung dịch chuẩn có nồng độ chính xác khoảng 40 IU/ml.

+ Dung dịch chuẩn 3: Pha loãng đồng thể tích dung dịch chuẩn 2 với dung môi pha mẫu để thu được dung dịch chuẩn có nồng độ chính xác khoảng 20 IU/ml.

Nồng độ chính xác của các dung dịch chuẩn có thể được điều chỉnh dựa vào đáp ứng cụ thể của dòng chuột sử dụng.

3.3.3. Tiến hành

Phân chia chuột ngẫu nhiên vào 6 chuồng mỗi chuồng 8 con. Cân chuột trước khi tiêm thuốc, loại bỏ những chuột có cân nặng nằm ngoài khoảng cân nặng trung bình $\pm 20\%$.

Hút riêng rẽ 0,5 ml các dung dịch chuẩn và dung dịch thử vào các xylanh 1 ml.

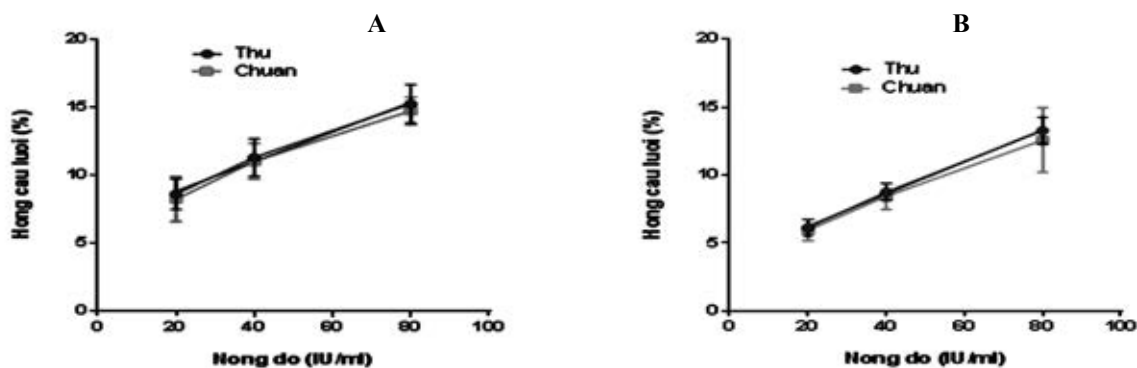
Tiến hành tiêm chuột bằng kỹ thuật tiêm dưới da như sau: Bắt chuột bằng cách cầm vào đuôi ở vị trí cách gốc đuôi 2/3 chiều dài đuôi. Đặt chuột lên nắp lồng và kéo nhẹ đuôi chuột. Dùng ngón cái và ngón trỏ giữ phần cổ và vai chuột. Hai ngón tay kẹp chắc nếp da gáy của chuột. Đưa đầu kim tiêm vào nếp da gáy ở giữa 2 ngón tay với mặt vát hướng lên trên. Khi cảm nhận được kim tiêm đang nằm trong nếp da ở giữa 2 ngón tay, thì kéo piton lại một chút để kiểm tra. Nếu thấy nặng tay và không có máu hay dịch thể khác bị hút vào xylanh thì chứng tỏ mũi tiêm đặt đúng vị trí. Tiến hành đẩy piton

từ từ để đưa thuốc vào cơ thể chuột. Rút kim bằng cách xoay nhẹ bơm tiêm 180° rồi rút. Dùng ngón cái và ngón trỏ giữ chặt vị trí tiêm khoảng 3s. Tiêm xong, chuột được đưa sang lồng mới. Mỗi một loại dung dịch tiêm cho một lồng để tránh nhầm lẫn (6 loại dung dịch tiêm cho 6 lồng). Sau khi tiêm xong tất cả chuột thì tiến hành sắp xếp lại vào 8 lồng sao cho mỗi lồng đều có đủ 6 chuột của 6 nhóm thử nghiệm (3 nhóm thử và 3 nhóm chuẩn). Bốn ngày sau khi tiêm thuốc, tiến hành lấy khoảng 0,5 ml máu ở tĩnh mạch thái dương nông ở mỗi chuột vào các ống xét nghiệm chứa EDTA. Đếm tế bào hồng cầu lưới trên máy xét nghiệm huyết học. Loại bỏ những giá trị nằm ngoài khoảng giá trị trung bình của nhóm ± 2 SD.

Xây dựng biểu đồ biểu diễn mối quan hệ giữa nồng độ EPO và tỷ lệ hồng cầu lưới trong máu chuột. Tính hoạt lực của chế phẩm bằng phương pháp thống kê đường song song (parallel line assay).

3.4. Đánh giá hoạt lực *in vivo* của chế phẩm Epokine prefilled injection

Tiến hành theo quy trình vừa xây dựng ở mục 3.3 sử dụng chủng chuột Swiss cả 2 giống đực và cái, chúng tôi thu được các kết quả trình bày ở Hình 3 và Bảng 1.



Hình 3. Đồ thị biểu diễn khả năng tăng hồng cầu lưới ở 3 nồng độ tiêm khác nhau của chế phẩm Epokine prefilled injection 2000 Units/0,5 ml so với chuẩn EPO trên chuột Swiss 8 tuần tuổi giống cái (A) và giống đực (B).

Bảng 1. Hoạt lực *in vivo* của Epokine prefilled injection trên chuột Swiss

Thông số	Hoạt lực <i>in vivo</i> của Epokine prefilled injection	
	Chuột Swiss giống cái	Chuột Swiss giống đực
Hoạt lực	2176,4 (IU/0,5 ml) (108,8% so với hoạt lực ghi trên nhãn)	2171,8 (IU/0,5 ml) (108,6% so với hoạt lực ghi trên nhãn)
Khoảng tin cậy (P = 0,05)	1833,4 – 2593,7	1873,6 – 2524,6

Hoạt lực của EPO trên chuột Swiss ở cả 2 giống đực và cái cho kết quả tương tự nhau 108,8% (cái) và 108,6% (đực). Từ kết quả trên cho thấy có thể sử dụng cả giống đực và giống cái vào thử nghiệm. Tuy nhiên, khả năng đáp ứng thuốc ở 2 giống có sự khác biệt. Cụ thể, đáp ứng với thuốc ở cùng nồng độ, liều lượng trên con cái cao hơn so với con đực (Hình 3). Do đó, mặc dù có khả năng sử dụng chuột Swiss ở cả 2 giống vào thử nghiệm, song phải chú ý tới sự khác biệt về giống trong thiết kế bố trí thí nghiệm để thu được kết quả có ý nghĩa. Kết quả của nghiên cứu này thống nhất với Dược điển Ấn Độ về khả năng dùng dòng chuột Swiss trong việc xác định hoạt lực của EPO in vivo [5]. Tuy nhiên chuyên luận EPO ở Dược điển Ấn Độ chưa đề cập đến tuần tuổi thích hợp của chuột Swiss dùng trong thử nghiệm. Ở nghiên cứu

này, chúng tôi đã làm rõ tuần tuổi của chuột Swiss phù hợp để làm thử nghiệm là tuần tuổi thứ 8.

4. Kết luận

Trong nghiên cứu này chúng tôi đã khảo sát tuần tuổi chuột phù hợp với thử nghiệm, khảo sát thời điểm lấy máu sau khi dùng thuốc từ đó xây dựng quy trình xác định hoạt lực in vivo của EPO. Dựa trên quy trình xây dựng được, chúng tôi tiến hành xác định hoạt lực in vivo của sinh phẩm chứa erythropoietin tái tổ hợp sử dụng dòng chuột Swiss với cả hai giống đực và cái. Từ các kết quả của nghiên cứu này chúng tôi nhận thấy có thể sử dụng dòng chuột Swiss cả 2 giống đực và cái để đánh giá hoạt lực in vivo của chế phẩm sinh học erythropoietin tái tổ hợp.

Tài liệu tham khảo

1. Bộ Y tế (2015), Dược thư quốc gia Việt Nam, Lần xuất bản thứ hai, Nhà xuất bản Y học, trang 751-753.
2. Bộ Y tế (2017), Dược điển Việt Nam, Lần xuất bản thứ năm, Nhà xuất bản Y học.
3. *British pharmacopoeia* (2018), pp. 928 - 932.
4. Kawakita M, Ogawa M, Goldwasser E, Miyake T. (1983). *Characterization of human megakaryocyte colony-stimulating factor in the urinary extracts from patients with aplastic anemia and idiopathic thrombocytopenic purpura.* Blood 61(3):556-60.
5. *Indian pharmacopoeia* (2014), pp. 2602- 2610.
6. *Pharmacopoeia of People's Republic of China* (2015), p.307.
7. *The Korean pharmacopoeia KP X* (2012), pp. 1393-1397.
8. *United state pharmacopoeia 41* (2018), pp. 213 - 214.

SUMMARY

In present study, we investigated the usability of Swiss mice to assess potency of Human Erythropoietin produced by recombinant technology. We studied which age of mice and timepoint after drug administration that are proper for potency assay of erythropoietin. Based on these data we established a procedure and used this procedure to assess the potency of Epokine prefilled injection product. Our results indicated that 8 weeks old Swiss mice can be use to assess potency of Erythropoietin.

(Ngày nhận bài: 15/10/2018 ; Ngày phản biện: 25/03/2019; Ngày duyệt đăng: 15/07/2019)

THUỐC KHÔNG ĐẠT CHẤT LƯỢNG ĐÃ ĐƯỢC BỘ Y TẾ XỬ LÝ TỪ 01/12/2018 ĐẾN 31/05/2019

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 01/12/2018 đến 31/05/2019 mà Bộ Y tế đã ra văn bản thông báo bao gồm: 28 thuốc bị đình chỉ và thu hồi, rút số đăng ký của 68 thuốc và phát hiện 02 thuốc giả.

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

Danh mục thuốc bị đình chỉ lưu hành từ ngày 01/12/2018 đến ngày 31/05/2019

STT	Tên thuốc	Số lô	Ngày sản xuất	Hạn dùng	Số đăng ký	Tên cơ sở sản xuất	Tên cơ sở đơn vị nhập khẩu	Chỉ tiêu không đạt	Văn bản xử lý	Hình thức xử lý
1	Chymomedi	254418	21/08/2018	20/08/2020	VD-25331-16	Công ty Cổ phần Dược Trung ương Mediplantex		Định lượng	Công văn: số 22650/QLD-CL ngày 12/12/2018	Đình chỉ lưu hành và thu hồi trên địa bàn Hà Nội
2	Thuốc nhỏ mắt Cloramphenicol 0,4%	010617	04/06/20	04/06/20	VD-11223-10	Công ty Cổ phần Dược Vật tư Y tế Hải Dương		Tạp chất	Công văn: số 22647/QLD-CL ngày 12/12/2018	Đình chỉ lưu hành và thu hồi trên địa bàn tỉnh Gia Lai
3	Viên nén Alphachymotrypsin	162017	19/10/2017	19/10/2020	VD-25998-16	Công ty TNHH MTV 120 Armephaco		Định lượng	Công văn: số 22649/QLD-CL ngày 12/12/2018	Đình chỉ lưu hành và thu hồi trên địa bàn Hà Nội
4	Viên nang Kim Tiền Thảo	062018	04/06/2020	04/06/2020	V135-H12-13	Công ty Cổ phần Dược phẩm Hà Nam		Độ đồng đều khối lượng	Công văn: số 220/QLD-CL ngày 10/01/2019	Đình chỉ lưu hành và thu hồi trên địa bàn tỉnh Bắc Kạn
5	Viên nén Alphatrypa DT	17013	22/7/2017	21/7/2019	VD-26281-17	Công ty Cổ phần Dược phẩm Trung ương I (Pharabaco)		Định lượng	Công văn: số 327/QLD-CL ngày 14/01/2019	Đình chỉ lưu hành và thu hồi trên địa bàn Hà Nội
6	Viên nén Alphatrypa DT	17015	2/10/2017	01/10/2019	VD-26281-17	Công ty Cổ phần Dược phẩm Trung ương I (Pharabaco)		Định lượng	Công văn: số 326/QLD-CL ngày 14/01/2019	Đình chỉ lưu hành và thu hồi trên địa bàn thành phố Hải Phòng
7	Viên bao đường Promethazin 15mg	16002B	13/08/16		VD-19300-13	Công ty Cổ phần Dược phẩm 219 - Nadyphar		Độ hòa tan	Công văn: số 323/QLD-CL ngày 14/01/2019	Đình chỉ lưu hành và thu hồi trên địa bàn tỉnh Bà Rịa Vũng Tàu
8	Viên nén Daethwa Almetamin	8005	26/6/2018	25/6/2021	VN-15406-12	Daehwa Pharmaceutical	Công ty Cổ phần Xuất nhập khẩu Dược phẩm Bình Minh	Độ đồng đều hàm lượng và định lượng	Công văn: số 526/QLD-CL ngày 18/01/2019	Đình chỉ lưu hành và thu hồi trên địa bàn Hà Nội
9	Viên nang mềm Hoạt huyết CM3	0618	27/02/21	27/02/21	VD-27170-17	Công ty Cổ phần Dược phẩm Phúc Vinh		Độ tan rã	Công văn: số 580/QLD-CL ngày 21/01/2019	Đình chỉ lưu hành và thu hồi trên địa bàn tỉnh Bắc Ninh
10	Alphachymotrypsin	090918	13/9/2018	13/9/2021	VD-22400-15	Công ty Cổ phần Dược Đông Nai		Định lượng	Công văn: số 581/QLD-CL ngày 21/01/2019	Đình chỉ lưu hành và thu hồi trên địa bàn Hà Nội
11	Viên nén bao phim Peridom-M	7D73	04/2017	03/2020	VN-16046-12	Medopharm (India)	Công ty Cổ phần Dược phẩm Tenamyd	Định lượng	Công văn: số 883/QLD-CL ngày 24/01/2019	Đình chỉ lưu hành và thu hồi trên toàn quốc
12	Chymomedi	254418	21/8/2018	20/8/2020	VD-25331-16	Công ty Cổ phần Dược Trung ương Mediplantex		Định lượng	Công văn: số 884/QLD-CL ngày 24/01/2019	Đình chỉ lưu hành và thu hồi trên toàn quốc

13	Thuốc nhỏ mắt Cloramphenicol 0,4%	080216	01/02/2016	01/02/2019	VD-11223-10	Công ty Cổ phần Dược Vật tư Y tế Hải Dương	Công ty Cổ phần Dược liệu Trung ương 2	pH	Công văn: số 880/QLD-CL ngày 24/01/2019	Đình chỉ lưu hành và thu hồi trên địa bàn tỉnh Bắc Ninh
14	Pneumorel	Tất cả các lọ				Les Laboratories Servier	Công ty Cổ phần Dược phẩm Trung ương 2	Thuốc có nguy cơ gây rối loạn nhịp tim trên người sử dụng	Công văn: số 1784/QLD-CL ngày 15/02/2019	Đình chỉ lưu hành và thu hồi trên toàn quốc
15	Fenspirol	Tất cả các lọ			VN-16884-13	Polfarmex S.A, Poland	Công ty Cổ phần Dược phẩm Trung ương 1 - Pharmaco	Như trên	Công văn: số 1969/QLD-CL ngày 25/02/2019	Đình chỉ lưu hành và thu hồi trên toàn quốc
16	Viên nén Ventek	0084	07-03-18	06-03-20	VN-18454-14	The Searle company Limited (Pakistan)	Công ty TNHH MTV Dược Sài Gòn	Tạp chất liên quan	Công văn: số 3597/QLD-CL ngày 21/03/2019	Đình chỉ lưu hành và thu hồi trên địa bàn thành phố Hà Nội
17	Viên nén bao phim giải phóng kéo dài Duresin	010118		15/01/20	VN-15794-12	Polfarmex S.A, Poland	Công ty Cổ phần Dược phẩm Trung ương CPC-1 - Chi nhánh Tp. HCM	Độ hòa tan	Công văn: số 3828/QLD-CL ngày 22/03/2019	Đình chỉ lưu hành và thu hồi trên toàn quốc
18	Viên nén bao phim Ibuhadi (Ibuprofen 400mg)	100918	17/9/2018	17/9/2021	VD-28797-18	Công ty Cổ phần Dược Hà Tĩnh		Tạp chất liên quan	Công văn: số 4250/QLD-CL ngày 27/03/2019	Đình chỉ lưu hành và thu hồi trên địa bàn thành phố Hà Nội
19	Viên nén Lopramide SPM 2mg	1709002	20/9/2017	20/9/2020	VD-19607-13	Công ty Cổ phần S.P.M		Hình thức Định lượng	Công văn: số 5303/QLD-CL ngày 10/04/2019	Đình chỉ lưu hành và thu hồi trên địa bàn thành phố Hà Nội
20	Ciprothabi 500mg (Ciprofloxacin 500mg)	080717		06/07/20	VD-23132-15	Công ty Cổ phần Vật tư Y tế Thái Bình		Định lượng	Công văn: số 5792/QLD-CL ngày 19/04/2019	Đình chỉ lưu hành và thu hồi trên địa bàn tỉnh Hải Dương
21	Viên nang cứng Alzole	009	6/11/2018	06/11/2021	VD-18381-13	Công ty Cổ phần Dược phẩm TV. Pharm		Độ đồng đều khối lượng	Công văn: số 6042/QLD-CL ngày 22/04/2019	Đình chỉ lưu hành và thu hồi trên địa bàn tỉnh Gia Lai
22	Viên nén bao phim Cetirizine tablets 10mg (Cetirizine 10mg)	WCH7005E	25/8/2017	24/8/2020	VN-19406-15	Windias Biotech Private Limited (India)	Công ty Cổ phần Dược phẩm Trung ương Codupha	Độ hòa tan Định lượng	Công văn: số 6346/QLD-CL ngày 26/04/2019	Đình chỉ lưu hành và thu hồi trên địa bàn tỉnh toàn quốc
23	Viên nén bao phim Cetirizine tablets 10mg (Cetirizine 10mg)	WCH 7006E	25/8/2017	24/8/2020	VN-19406-15	Như trên	Như trên	Như trên	Như trên	Như trên
24	Viên nén bao phim Cetirizine tablets 10mg (Cetirizine 10mg)	WCH7008E	25/8/2017	24/8/2020	VN-19406-15	Như trên	Như trên	Như trên	Như trên	Như trên
25	Alfachim (Chymotrypsin 4200 đơn vị USP)	08100118	10/01/2021	10/01/2021	VD-18712-13	Công ty Cổ phần Dược phẩm Cửu Long		Định lượng	Công văn: số 6450/QLD-CL ngày 2/5/2019	Đình chỉ lưu hành và thu hồi trên địa bàn tỉnh Đắc Lắc
26	Viên bao phim Pancrenic	809056	01/10/2018	01/10/2021	VD-9135-09	Công ty USA-NIC Pharma Co., Ltd.		Định lượng	Công văn: số 7357/QLD-CL ngày 17/05/2019	Đình chỉ lưu hành và thu hồi trên địa bàn thành phố Hà Nội
27	Viên nén Sebemin	SDM1711	24/10/2017	23/10/2020	VN-14320-11	Crown Pharm. Co., Ltd (Korea)	Công ty Cổ phần Dược liệu Trung ương 2	Định lượng	Công văn: số 7831/QLD-CL ngày 27/5/2019	Đình chỉ lưu hành và thu hồi trên địa bàn tỉnh Kon Tum
28	Viên nén Raciper 20mg (Esomeprazole 20mg)	3983744		16/10/20	VN-16032-12	Sun Pharmaceutical Industries Ltd. (India)	Công ty Cổ phần Dược phẩm Thiết bị Y tế Hà Nội	Độ hòa tan	Công văn: số 8047/QLD-CL ngày 29/5/2019	Đình chỉ lưu hành và thu hồi trên địa bàn thành phố Hồ Chí Minh

Danh mục thuốc bị rút số đăng ký từ ngày 01/12/2018 đến ngày 31/05/2019

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	Ascoril	VN-13132-11	Glenmark Pharmaceuticals Ltd.	Glenmark Pharmaceuticals Ltd.	Quyết định số 856/QĐ-QLD ngày 28/12/2018	Rút SDK
2	Candibiotic	VN-16770-13	nt	nt	nt	nt
3	Clasanvyl sachet	VN-16098-12	Maxim Pharmaceutical Pvt. Ltd.	Công ty TNHH SRS Life Sciences Việt Nam	nt	nt
4	Toff Plus Capsule	VN2-118-13	Panacea Biotec Ltd.	Panacea Biotec Ltd.	Quyết định số 857/QĐ-QLD ngày 28/12/2018	Rút SDK
5	Rhumenol Flu 500 NK	VN-18444-14	Medopharm	Công ty Cổ phần Dược phẩm Tenamyl	nt	nt
6	Pamagin C	VN-10851-10	Cachet Pharmaceuticals Pvt. Ltd.	Công ty TNHH Thương mại Thanh Danh	nt	nt
7	Agicold hotmix orange	VN-21238-18	Agio Pharmaceuticals Ltd	Công ty TNHH Dược phẩm Y-Med	Quyết định số 858/QĐ-QLD ngày 28/12/2018	Rút SDK tự nguyện
8	Biomycos 2G	VD-25794-16	Công ty Cổ phần Dược phẩm Trung ương 1 - Pharbaco	Công ty Cổ phần Dược phẩm Trung ương 1 - Pharbaco	Quyết định số 37/QĐ-QLD ngày 24/11/2019	Rút SDK do thuốc chứa hoạt chất Ceftezol
9	Biomycos 1g	VD-21903-14	Như trên	Như trên	Như trên	Như trên
10	Ceftezol 1g	VD-17417-12(*)	Công ty Cổ phần Dược phẩm EuviPharm	Công ty Cổ phần Dược Đại Nam Hà Nội	nt	nt
11	Ceftezol 1g	VD-19755-13(*)	Công ty Cổ phần Dược phẩm VCP	Công ty Cổ phần Dược phẩm VCP	nt	nt
12	Vicipezol	VD-19756-13(*)	Như trên	Như trên	Như trên	Như trên
13	Ceftezol VCP	VD-19054-13	Như trên	Như trên	Như trên	Như trên
14	Supzolin	VD-23147-15	Công ty Cổ phần Dược - TTBYT Bình Định	Công ty Cổ phần Dược - TTBYT Bình Định	Như trên	Như trên
15	Tezacef	VD-24537-16	Công ty TNHH Dược phẩm Shinpoong Deawoo	Công ty TNHH Dược phẩm Shinpoong Deawoo	Như trên	Như trên
16	Tezacef	VD-10786-10(*)	Như trên	Như trên	Như trên	Như trên
17	Bazbem	VN-15351-12(*)	Asia Pharm. IND. Co., Ltd.	Công ty TNHH Dược phẩm DOHA	Như trên	Như trên
18	Wooridul Ceftezole sodium 1g	VN-13641-11(*)	Như trên	Công ty TNHH Lộc Hưng	Như trên	Như trên
19	Altezole 1g Inj.	VN-13644-11 (*)	Alpha Pharm. Co., Ltd.	Công ty TNHH SXTMDV và KDDP Vinh An An	Như trên	Như trên
20	Myungmoon ceftezole sodium injection 1g	VN-9641-10 (*)	Myungmoon Pharmaceutical Co., Ltd.	Dasan Medicem Co., Ltd.	Như trên	Như trên
21	Bagino	VN-16792-13(*)	Guju Pharm. Co., Ltd.	Il Hwa Co., Ltd.	Như trên	Như trên
22	Seosaft Inj. 1g	VN-16496-13(*)	Kyongbo Pharm. Co., Ltd.	Như trên	Như trên	Như trên
23	Kereston	VN-15062-12(*)	Chunggei Pharma. Co., Ltd.	Như trên	Như trên	Như trên
24	Beecetezole	VN-10330-10	Kukje Pharma Ind. Co., Ltd.	Kukje Pharma Ind. Co., Ltd.	Như trên	Như trên
24	Newcezole Injection	VN-12531-11(*)	Aju Pharm Co., Ltd.	Kyongbo Pharmaceutical Co., Ltd.	Như trên	Như trên
25	Kbtezole injection	VN-9725-10(*)	Kyongbo Pharmaceutical Co., Ltd.	Như trên	Như trên	Như trên
26	Seo-Afonac injection	VN-5631-10 (*)	Schnell Korea Pharma Co., Ltd.	Schnell Korea Pharma Co., Ltd.	Như trên	Như trên
27	Vimpat 50 mg	VN2-598-17	Aesica Pharmaceuticals GmbH	Abbott Laboratories (Singapore) Private Limited	Quyết định số 42/QĐ-QLD ngày 28/1/2019	Rút SDK tự nguyện
28	Vimpat 100 mg	VN2-595-17	Như trên	Như trên	Như trên	Như trên
29	Vimpat 150 mg	VN2-596-17	Như trên	Như trên	Như trên	Như trên
30	Vimpat 200 mg	VN2-597-17	Như trên	Như trên	Như trên	Như trên
21	Vimpat	VN2-593-17	UCB Pharma S.A	Như trên	Như trên	Như trên
32	Heclom	VN-18856-15	Hanmi Pharm. Co., Ltd.	Công ty TNHH Dược phẩm Tâm Đan	Như trên	Như trên
33	Gentamicin sulfate injection	VN-21027-18	Reyoung Pharmaceutical Co., Ltd	Habin Pharmaceutical Group Co., Ltd General Pharm. Factory	Như trên	Như trên
34	Cefdimate Injection	VN-17996-14	Korea Prime Pharm Co., Ltd.	Korea Prime Pharm Co., Ltd.	Như trên	Như trên
35	Pneumorel	VN-15959-12	Les Laboratoires servier Industrie	Les Laboratoires servier	Quyết định số 89/QĐ-QLD ngày 21/2/2019	Rút SDK do thuốc chứa hoạt chất Fenspiride
36	Domperidone GSK 10mg	VD-25067-16	Công ty Cổ phần Savi	Glaxo SmithKline Pte Ltd	Quyết định số 158/QĐ-QLD ngày 19/3/2019	Rút SDK tự nguyện

37	Hepsera	VN-19657-16	Glaxo SmithKline (Tianjin) Co. Ltd	Như trên	Như trên	Như trên
38	Seretide Evohaler 25/125 mcg	VN-19166-15	Glaxo Wellcome Production	Như trên	Như trên	Như trên
39	Seretide Evohaler 25/50 mcg	VN-19168-15	Như trên	Như trên	Như trên	Như trên
40	Seretide Evohaler 25/250 mcg	VN-19167-15	Như trên	Như trên	Như trên	Như trên
41	Korofest 180	VD-25750-16	Công ty Cổ phần Dược phẩm OPV	Công ty Cổ phần Dược phẩm OPV	Như trên	Như trên
42	Fenidofex 120	VD-25757-16	Như trên	Như trên	Như trên	Như trên
43	Korofest 120	VD-20458-14	Như trên	Như trên	Như trên	Như trên
44	Opefexof 120	VD-22968-15	Như trên	Như trên	Như trên	Như trên
45	Tinifast 180	VD-20799-14	Như trên	Như trên	Như trên	Như trên
46	Tinifast 120	VD-23638-15	Như trên	Như trên	Như trên	Như trên
47	Fenidofex 180	VD-26984-17	Như trên	Như trên	Như trên	Như trên
48	Refresh Plus	VN-18983-15	Allergan Sales, LLC	Allergan Singapore Pte., Ltd.	Như trên	Như trên
49	Pasepan	VD-22884-15	Công ty Cổ phần Dược phẩm Hà Tây	Công ty Cổ phần Dược phẩm Hà Tây	Quyết định số 177/QĐ-QLD ngày 22/3/2019	Rút SDK tự nguyện
50	Rabsun-20	VN-10928-10	Farma Glow	Công ty TNHH Dược phẩm Tiền Giang	Như trên	Như trên
51	Cefopess 0,5g Inj.	VN-20758-17	Hanlim Pharm. Co., Ltd.	Emter Pharm Co., Ltd	Như trên	Như trên
52	Cefdivale injection	VN-20620-17	Schnell Biopharmaceuticals, Inc.	Saint Corporation	Quyết định số 288/QĐ-QLD ngày 03/5/2019	Rút SDK tự nguyện
53	Celfuzine injection	VN-18622-15	Chunggei Pharma. Co., Ltd.	Như trên	Như trên	Như trên
54	Pharmaton Fizzi	VN-21584-18	E-Pharma Trento Spa	Boehringer Ingelheim International GmbH	Như trên	Như trên
55	Rovastin 10mg	VN-20592-17	Apotex Inc.	Paradigm Pharmaceuticals Inc.	Như trên	Như trên
56	Rovastin 20mg	VN-20593-17	Như trên	Như trên	Như trên	Như trên
57	Saizen	QLSP-1123-18	Merck Serono S.p.A	Merck export GmbH	Như trên	Như trên
58	ClopiSun	VN-21780-19	Farma Glow	Công ty TNHH Dược phẩm Tiền Giang	Như trên	Như trên
59	Tinosotgel	VN-20757-17	BTO Pharmaceuticals Co., Ltd.	Enter Pharm Co., Ltd	Như trên	Như trên
60	Rabeolone	VN-19805-16	Brawn Laboratories Ltd	Brawn Laboratories Ltd	Quyết định số 321/QĐ-QLD ngày 17/5/2019	Rút SDK tự nguyện
61	Aciclovir cream BP	VN-19565-16	Như trên	Như trên	Như trên	Như trên
62	Lydosinat 10mg	VN-20884-18	Wuhan Changlian Laifu Biochemical Pharmaceutical Co., Ltd.	Công ty TNHH Dược phẩm Thủ Đức	Như trên	Như trên
63	Lydosinat 5mg	VN-20885-18	Như trên	Như trên	Như trên	Như trên
64	Zyvox	VN-19510-15	Pfizer Pharmaceuticals LLC	Pfizer (Thailand) Ltd.	Như trên	Như trên
65	Hyzaar 50/12.5mg	GC-280-17	Merck Sharp & Dohme Ltd.	Merck Sharp & Dohme Ltd. Cơ sở gia công đóng gói cấp 2: Công ty Cổ phần Dược phẩm OPV	Như trên	Như trên
66	Tienam	GC3-1-18	Như trên	Như trên	Như trên	Như trên
67	Singulair	GC-262-17	Như trên	Như trên	Như trên	Như trên
68	Singulair	GC-261-17	Như trên	Như trên	Như trên	Như trên

(*): Số đăng ký đã hết hiệu lực

Danh mục thuốc giả từ ngày 01/12/2018 đến ngày 31/5/2019

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	Vấn bản xử lý
1	Viên nén Prednisolone BPF	M162889	07/2017	07/2020		Rotexmedica GMBH Tritau	Công văn: số 319/QLD-CL ngày 14/01/2019
2	Coveram 5mg/5mg					Les Laboratories Servier	Công văn: số 1641/QLD-TTra ngày 13/02/2019

MỤC LỤC

	Trang
● Nghiên cứu khoa học	
- Nghiên cứu định lượng Acid acetic trong nguyên liệu Mafenid acetat bằng phương pháp HPLC. <i>PHẠM THỊ HÀ, KHÚC HOÀNG PHƯƠNG, TRẦN THÚY HẠNH, NGUYỄN VĂN GIANG</i>	1
- Định lượng đồng thời Emtricitabin và Tenofovir disoproxil fumarat trong viên nén bằng phương pháp HPLC. <i>NGUYỄN THỊ MINH TÂM, NGUYỄN THỊ HỒNG YẾN, TRẦN THỊ HỒNG ANH</i>	5
- Nghiên cứu định lượng Cefdinir trong huyết tương người bằng phương pháp HPLC. <i>TẠ MẠNH HÙNG, NGUYỄN THỊ THU HÒA, PHAN THỊ NGHĨA, NGÔ ĐỨC LIÊM</i>	12
- Định tính đồng thời <i>Bifidobacterium longum</i> , <i>Lactobacillus acidophilus</i> và <i>Bacillus coagulans</i> trong một số chế phẩm probiotic bằng kỹ thuật multiplex PCR. <i>KHÔNG THỊ MINH HUỆ, HỒ THỊ THOM, NGUYỄN THỊ THU HƯỜNG, NGUYỄN THỊ THU HƯƠNG, LÊ THỊ HỒNG NGỌC, TRỊNH THỊ PHƯƠNG DUNG, BÙI QUỐC THÁI</i>	16
- Khảo sát khả năng sử dụng dòng chuột Swiss trong việc đánh giá hoạt lực của sinh phẩm tái tổ hợp Erythropoietin. <i>NGUYỄN THỊ LIÊN, ĐOÀN CAO SƠN</i>	23
● Thông tin khoa học - Tin tức	
- Thuốc không đạt chất lượng đã được Bộ Y tế xử lý từ tháng 01/12/2018 đến 31/05/2019. <i>HÀ THỊ MINH CHÁU</i>	28

CONTENTS

	Page
● Scientific researches	
- Study on determination of Acetic acid in Mafenid acetate by HPLC method. <i>PHẠM THỊ HÀ, KHÚC HOÀNG PHƯƠNG, TRẦN THÚY HẠNH, NGUYỄN VĂN GIANG</i>	1
- Simultaneous assay of Emtricitabine and Tenofovir disoproxil fumarate in tablets by HPLC method. <i>NGUYỄN THỊ MINH TÂM, NGUYỄN THỊ HỒNG YẾN, TRẦN THỊ HỒNG ANH</i>	5
- Study on determination of Cefdinir in human plasma by HPLC method. <i>TẠ MẠNH HÙNG, NGUYỄN THỊ THU HÒA, PHAN THỊ NGHĨA, NGÔ ĐỨC LIÊM</i>	12
- Simultaneous identification of <i>Bifidobacterium longum</i> , <i>Lactobacillus acidophilus</i> and <i>Bacillus coagulans</i> in some probiotic preparations by the Multiplex PCR technique. <i>KHÔNG THỊ MINH HUỆ, HỒ THỊ THOM, NGUYỄN THỊ THU HƯỜNG, NGUYỄN THỊ THU HƯƠNG, LÊ THỊ HỒNG NGỌC, TRỊNH THỊ PHƯƠNG DUNG, BÙI QUỐC THÁI</i>	16
- Investigation of the possibility of using Swiss mice to assess potency of Human Erythropoietin produced by recombinant technology. <i>NGUYỄN THỊ LIÊN, ĐOÀN CAO SƠN</i>	23
● Technical information – News	
- Substandard pharmaceuticals recalled from December 2018 to May 2019 on decision of Ministry of Health. <i>HÀ THỊ MINH CHÁU</i>	28