

VIỆN KIỂM NGHIỆM THUỐC TRUNG ƯƠNG

ISSN 1859 - 0055

TẠP CHÍ

**KIỂM
NGHIỆM
thuốc**

JOURNAL OF DRUG QUALITY CONTROL

SỐ 2.2020

TẬP 18-SỐ 68

NATIONAL INSTITUTE OF DRUG QUALITY CONTROL

48 HAI BA TRUNG . HANOI - VIETNAM

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

XÂY DỰNG VÀ THẨM ĐỊNH QUY TRÌNH ĐỊNH TÍNH, ĐỊNH LƯỢNG NGUYÊN LIỆU MONOTROPEIN BẰNG PHƯƠNG PHÁP HPLC

TRẦN VIỆT HÙNG

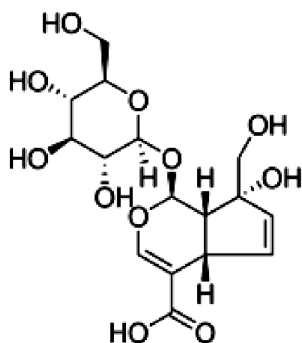
*Viện Kiểm nghiệm thuốc
Thành phố Hồ Chí Minh*

BẠCH THỊ THẨM, TRẦN THỊ THU TRANG,
NGUYỄN TUẤN ANH, PHẠM VĂN KIẾN, ĐOÀN CAO SON

Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương

Từ khóa: Monotropein, *Morinda officinalis* How, Ba kích, chiết xuất, HPLC.

1. Đặt vấn đề



Công thức cấu tạo của monotropein

Monotropein là một trong các thành phần chính và có tác dụng sinh học của rễ cây Ba kích (*Morinda officinalis* How, họ Cà phê (Rubiaceae) [10]. Monotropein thể hiện tác dụng chống viêm liên quan đến sự ức chế chất trung gian gây viêm do bất hoạt enzyme NF- κ B [7],[8],[9]. Bên cạnh đó, monotropein có tác dụng bảo vệ xương bằng cách tăng hàm lượng khoáng chất và tỷ lệ thể tích xương, cải thiện cấu trúc xương và các đặc tính sinh hóa trong mô hình chuột bị cắt bỏ buồng trứng. Ngoài ra, monotropein còn có tác dụng chống oxy hóa, chống nhiễm trùng và chống dị hóa trong ống nghiệm [3],[11].

Hiện nay, Dược điển Trung Quốc 2015 và bộ tiêu chuẩn dược liệu của Hồng Kông Trung Quốc (Hong Kong Chinese Materia Medica Standards) đã kiểm soát hàm lượng nystose trong rễ Ba kích bằng sắc ký lỏng hiệu năng cao dùng detector tán xạ bay hơi (HPLC-ELSD) nhưng chưa kiểm soát các chất có hoạt tính sinh học khác như monotropein [4],[6]. Vì vậy, để nâng cấp tiêu chuẩn chất lượng dược liệu Ba kích trong Dược điển Việt Nam hiện hành cần xem xét bổ sung chỉ tiêu định lượng hai chất chính và có tác dụng sinh học là monotropein và nystose.

Công thức phân tử: $C_{16}H_{22}O_{11}$.

Phân tử lượng: 390,34 g/mol.

Tên khoa học: (1*S*,4*aS*,7*R*,7*aS*)-7-hydroxy-7-(hydroxymethyl)-1-[(2*S*,3*R*,4*S*,5*S*,6*R*)-3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl) oxan-2-yl] oxy-4*a*,7*a*-dihydro-1*H*-cyclopenta pyran-4-carboxylic acid.

Để phục vụ cho công tác thiết lập chất chuẩn monotropein nhằm cung cấp chất chuẩn cho việc kiểm tra chất lượng dược liệu Ba kích và chế phẩm đông được chứa Ba kích, chúng tôi đã tiến hành: “Xây dựng và thẩm định quy trình định tính, định lượng nguyên liệu monotropein bằng phương pháp HPLC”.

2. Thực nghiệm

2.1. Thiết bị, hóa chất, chất chuẩn

2.1.1. Thiết bị, dụng cụ

Các thiết bị, dụng cụ của Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương đã được hiệu chuẩn theo quy định của GLP và ISO/IEC 17025.

- Máy sắc ký lỏng hiệu năng cao Shimadzu.
- Cột Ultra RP18 (250 x 4,6 mm, 5 μ m).
- Cân phân tích Mettler Toledo GmbH MS105, độ chính xác 0,01 mg.
- Các dụng cụ thủy tinh cần thiết cho quá trình thực nghiệm.

2.1.2. Hóa chất, dung môi, chất chuẩn

- Chất chuẩn monotropein: Hàm lượng 99% ($C_{16}H_{22}O_{11}$) tính theo nguyên trạng; Số lô: SLBN8437V, nguồn gốc: Sigma-Aldrich.

- Acid phosphoric, ethanol, methanol: đạt tinh khiết phân tích.

2.2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Đối tượng nghiên cứu

Nguyên liệu monotropein số lô 2019-NL02 do Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam chiết xuất, phân lập và tinh chế từ rễ Ba kích.

2.2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.2.1. Điều kiện sắc ký

Cột Ultra RP18 (250 x 4,6 mm, 5 μ m).

Pha động: Methanol - acid phosphoric 0,5% tỉ lệ (5:95).

Detector: UV ở bước sóng 237 nm.

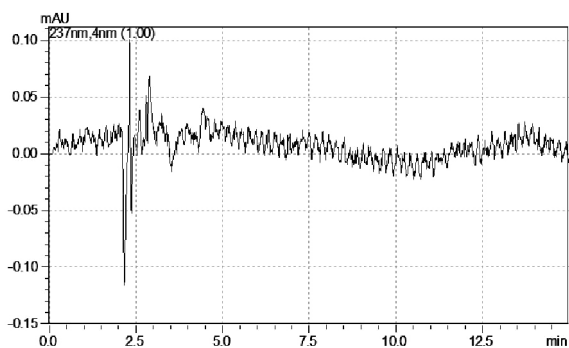
Tốc độ dòng: 1,0 ml/min.

Thể tích tiêm: 10 μ l.

2.2.2.2. Chuẩn bị các dung dịch chuẩn, dung dịch thử

- *Dung dịch chuẩn*: Cân chính xác khoảng 10,0 mg monotropein chuẩn vào bình định mức 10 ml, thêm 8 ml methanol, lắc siêu âm 20 phút, để nguội, thêm vừa đủ đến vạch bằng methanol, lắc đều thu được dung dịch chuẩn gốc. Hút chính xác 0,5 ml dung dịch chuẩn gốc vào bình định mức 10 ml, pha loãng và thêm vừa đủ đến vạch bằng nước, lắc đều thu được dung dịch tiêm sắc ký.

- *Dung dịch thử*: Cân chính xác khoảng 10 mg mẫu thử vào bình định mức 10 ml, thêm 8 ml methanol, lắc siêu âm 20 phút, để nguội, thêm vừa đủ đến vạch bằng methanol, lắc đều thu được dung dịch thử gốc. Hút chính xác 0,5 ml dung dịch thử gốc vào bình định mức 10 ml, pha loãng và thêm vừa đủ đến vạch bằng nước, lắc đều thu được dung dịch tiêm sắc ký.



Hình 1. Sắc ký đồ dung môi pha mẫu

Tiến hành sắc ký lặp lại 6 lần với dung dịch chuẩn, phép thử chỉ có giá trị khi: Độ lệch chuẩn tương đối của thời gian lưu và diện tích pic monotropein trong 6 lần tiêm lặp lại dung dịch chuẩn không được lớn hơn 2,0%. Số đĩa lý thuyết tính theo pic monotropein không ít hơn 4000.

Tiêm riêng biệt 10 μ l mỗi dung dịch chuẩn và dung dịch thử vào hệ thống sắc ký. Tiến hành sắc ký theo điều kiện đã nêu, ghi thời gian lưu và diện tích của các pic monotropein.

Dựa vào diện tích pic monotropein thu được trên sắc ký đồ của dung dịch thử, dung dịch chuẩn và nồng độ dung dịch chuẩn, xác định hàm lượng (%) monotropein ($C_{16}H_{22}O_{11}$) theo công thức:

$$X(\%) = \frac{S_T}{S_C} \times \frac{m_C}{m_T} \times P \times 100$$

Trong đó:

- S_T , S_C : Diện tích pic monotropein trên sắc ký đồ của dung dịch thử và dung dịch chuẩn tương ứng.

- m_T , m_C : Khối lượng cân mẫu thử và mẫu chuẩn tương ứng (mg).

- P: Hàm lượng (%) chuẩn monotropein.

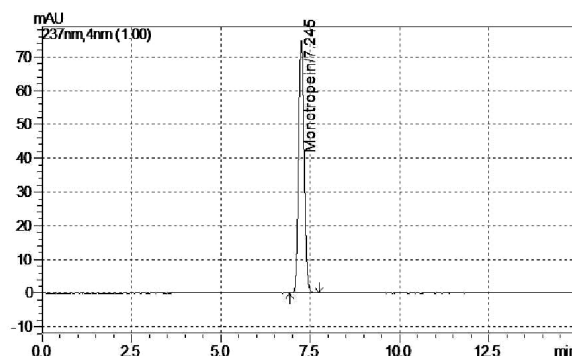
2.2.3. Thẩm định phương pháp

Thẩm định các chỉ tiêu: Độ đặc hiệu, tính thích hợp của hệ thống sắc ký, độ tuyến tính, độ đúng, độ lặp lại, độ chính xác trung gian.

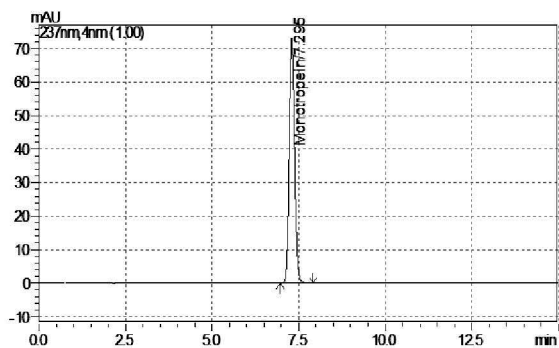
3. Kết quả và bàn luận

3.1. Độ đặc hiệu

Tiến hành tiêm vào hệ thống sắc ký lần lượt dung môi pha mẫu (nước), dung dịch thử và dung dịch chuẩn. Kết quả thể hiện ở Hình 1, 2, 3 và 4.



Hình 2. Sắc ký đồ dung dịch chuẩn

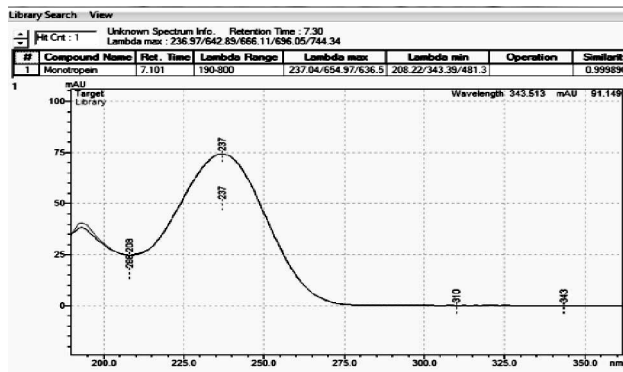


Hình 3. Sắc ký đồ dung dịch thử

Kết quả phân tích cho thấy:

- Trên sắc ký đồ của dung dịch thử cho pic chính có thời gian lưu tương ứng với pic monotropein trên sắc ký đồ của dung dịch chuẩn. Sắc ký đồ của dung môi pha mẫu không xuất hiện pic tương ứng với pic monotropein.

- Phổ UV của pic monotropein trên sắc ký đồ của dung dịch thử và chuẩn giống nhau. Kết quả chồng phổ cho hệ số similarity là 0,9999. Độ tinh khiết của pic



Hình 4. Chồng phổ UV của pic monotropein trong SKĐ thu được từ dung dịch chuẩn và dung dịch thử

monotropein thu được trên sắc ký đồ của dung dịch thử là 1,000 cho thấy pic thu được trên sắc ký đồ của dung dịch thử là tinh khiết.

3.2. Tính thích hợp của hệ thống sắc ký

Tiêm vào hệ thống sắc ký 6 lần dung dịch chuẩn ở mục 2.2.2.2. Ghi lại các sắc ký đồ và xác định thời gian lưu, diện tích pic và các thông số sắc ký của pic monotropein. Kết quả thu được thể hiện ở Bảng 1.

Bảng 1. Tính thích hợp của hệ thống sắc ký

STT	Thời gian lưu (phút)	Diện tích (mAU.s)	Số đĩa lý thuyết (N)	Hệ số kéo đuôi (T)
1	7,229	802390	9808	1,135
2	7,269	803454	9670	1,117
3	7,265	802559	9913	1,132
4	7,263	804932	9815	1,119
5	7,259	803247	9912	1,131
6	7,245	802691	9677	1,125
Trung bình	7,255 phút; n = 6; RSD = 0,21%	803212; n = 6; RSD = 0,12%	9799	1,127

Kết quả khảo sát ở Bảng 1 cho thấy hệ thống HPLC sử dụng phù hợp và đảm bảo sự ổn định với độ lệch chuẩn tương đối (RSD) của thời gian lưu và diện tích pic đều nhỏ hơn 1,0%. Số đĩa lý thuyết (N) tính theo pic chuẩn monotropein lớn hơn 4000. Hệ số kéo đuôi (T) của pic monotropein trên sắc ký đồ của dung dịch chuẩn khoảng 1,1 ($< 2,0$).

3.3. Khoảng tuyến tính

Cân 10,42 mg chất chuẩn monotropein vào bình định mức 10 ml, hòa tan và thêm vừa đủ đến vạch bằng methanol, lắc đều thu được dung dịch chuẩn gốc.

Từ dung dịch chuẩn gốc này, tiến hành pha một dãy các dung dịch chuẩn trong methanol để được các dung dịch có nồng độ lần lượt bằng 50%, 75%, 100%, 125% và 150% nồng độ định lượng.

Tiến hành sắc ký theo điều kiện đã nêu trên. Kết quả được thể hiện ở Bảng 2 và Hình 5.

Như vậy có sự tương quan tuyến tính chặt chẽ giữa nồng độ và diện tích pic monotropein trong khoảng nồng độ khảo sát với hệ số tương quan $r = 0,9999$ và (%) hệ số chặn tại nồng độ định lượng (0,05 mg/ml) là 0,12%.

Bảng 2. Kết quả khảo sát khoảng tuyến tính

% so với định lượng	Nồng độ (µg/ml)	Diện tích pic (mAU.s)
50	10,32	168888
75	30,95	474933
100	51,58	803212
125	72,21	1135269
150	103,16	1611123
Hệ số góc (slope)		15618
Hệ số chặn (intercept)		926
Hệ số tương quan (correl)		0,9999
% hệ số chặn		0,12%

Khoảng tuyến tính Monotropein

Hình 5. Đồ thị biểu diễn mối tương quan giữa nồng độ monotropein và diện tích pic

3.4. Độ đúng của phương pháp

Đánh giá độ đúng của phương pháp bằng cách thêm chính xác một lượng chất chuẩn monotropein để được mẫu tự tạo tương ứng với 3 mức nồng độ 80%, 100% và 120% so với nồng độ định lượng (lần lượt thêm vào khoảng 8 mg, 10 mg, 12 mg chất chuẩn monotropein). Tiến hành định lượng và xác định lượng chất chuẩn tìm lại được so với lượng thêm vào. Kết quả được thể hiện tại Bảng 3.

Bảng 3. Kết quả đánh giá độ đúng

Stt	Khối lượng cân chuẩn (mg)	Lượng monotropein thêm vào (mg)	Diện tích pic (mAU.s)	Lượng monotropein tìm lại (mg)	% Thu hồi	
					%	Trung bình
1	8,51	8,425	644738	8,280	98,29	99,04%; RSD = 0,66%
2	8,42	8,336	645847	8,295	99,51	
3	8,44	8,356	646170	8,299	99,32	
4	10,45	10,346	805338	10,343	99,98	99,56%; RSD = 0,91%
5	10,46	10,355	794327	10,202	98,52	
6	10,42	10,316	804653	10,334	100,18	
7	12,45	12,326	974130	12,511	101,50	101,45%; RSD = 0,12%
8	12,46	12,335	975220	12,525	101,54	
9	12,48	12,355	974700	12,518	101,32	
	Khối lượng cân chuẩn: 10,42 mg; Diện tích pic trung bình: 803212 mAU.S					

Các kết quả thực nghiệm cho thấy % thu hồi từ 98,29% đến 101,54%, độ lệch chuẩn tương đối ở 3 mức nồng độ đều nhỏ hơn 1,0%. Như vậy, phương pháp phân tích có độ đúng tốt.

3.5. Độ chính xác của phương pháp

Tiến hành xác định hàm lượng của monotropein lặp lại trên mẫu thử bằng 6 lần cân độc lập, thực hiện trên

hai ngày khác nhau và 2 kiểm nghiệm viên khác nhau. Kết quả đánh giá độ chính xác của phương pháp thể hiện ở Bảng 4.

Độ lệch chuẩn tương đối của kết quả định lượng tính trên 6 mẫu thử là 1,0% (< 2,0%) và trên 12 mẫu thử là 0,94% (< 2,0%) cho thấy phương pháp có độ chính xác đạt yêu cầu.

Bảng 4. Kết quả đánh giá độ chính xác của phương pháp

Ngày 1 – Kiểm nghiệm viên 1 Khối lượng cân chuẩn: 10,42 mg Diện tích pic chuẩn: 803212 mAU.s				Ngày 2 – Kiểm nghiệm viên 2 Khối lượng cân chuẩn: 10,48 mg Diện tích pic chuẩn: 803216 mAU.s			
Stt	Khối lượng cân mẫu thử (mg)	Diện tích pic (mAU.s)	Hàm lượng (%) nguyên trạng	Stt	Khối lượng cân mẫu thử (mg)	Diện tích pic (mAU.s)	Hàm lượng (%) nguyên trạng
1	10,48	798170	97,82	1	10,51	798973	98,20
2	10,52	793542	96,88	2	10,65	793164	96,20
3	10,31	794374	98,96	3	10,41	793767	98,49
4	10,28	796243	99,48	4	10,38	794913	98,92
5	10,56	803701	97,75	5	10,56	805388	98,52
6	10,63	806637	97,46	6	10,65	807426	97,93
Hàm lượng trung bình = 98,06%; n = 6; RSD = 0,99%				Hàm lượng trung bình = 98,04%; n = 6; RSD = 0,98%			
Kết quả hàm lượng trung bình = 98,04%; n = 12; RSD = 0,94%							

4. Kết luận

Qua thẩm định quy trình định tính, định lượng monotropein trong nguyên liệu bằng phương pháp HPLC cho thấy phương pháp có độ đặc hiệu tốt, trong khoảng tuyến tính xây dựng từ 0,01 đến 0,1 mg/ml có sự tương

quan tuyến tính chặt chẽ giữa nồng độ monotropein và diện tích pic; phương pháp xây dựng có độ lặp lại và độ chính xác trung gian đạt yêu cầu; độ đúng của phương pháp có tỷ lệ thu hồi cao. Như vậy phương pháp có thể áp dụng để định tính, định lượng monotropein trong nguyên liệu.

Tài liệu tham khảo

1. Bộ Y Tế (2017), *Dược Điển Việt Nam*, Lần xuất bản thứ năm, Nhà xuất bản Y học, Hà Nội.
2. Bao L, et al. (2011), “Anthraquinone compounds from *Morinda officinalis* inhibit osteoclastic bone resorption in vitro”, *Chem Biol Interact*, p194(2–3):97–105.
3. Chang M., et al. (2008), “Cytoprotective effects of *Morinda officinalis* against hydrogen peroxide-induced oxidative stress in Leydig TM3 cells”, *Asian J. Androl*, 10(4), pp. 667-674.
4. *Chinese Pharmacopoeia Commission*, Pharmacopoeia of the People’s Republic of China 2015.
5. Kim IT, et al. (2005), “In-vitro and in-vivo anti-inflammatory and antinociceptive effects of the methanol extract of the roots of *Morinda officinalis*”. *J Pharm Pharmacol*, p57(5):607–15.
6. *Hong Kong Chinese Materia Standards*, Department of Health, The Government of Hong Kong Special Administrative Region.
7. Ji-Sun Shin, et al. (2013) “Monotropein isolated from the roots of *Morinda officinalis* ameliorates proinflammatory mediators in RAW 264.7 macrophages and dextran sulfate sodium (DSS)-induced colitis via NF- κ B inactivation”, *Food and Chemical Toxicology* 53, pp. 263–271.
8. Jongwon Choi, Kyung-Tae Lee, Moo-Young Choi, Jung-Hwan Nam, Hyun-Ju Jung, Sun-Kyu Park, and Hee-Juhn Park (2005), “Antinociceptive Anti-inflammatory Effect of Monotropein Isolated from the root of *Morinda officinalis*”. *Biol.Pharm. Bull.* 28 (10), pp. 1915- 1918.
9. Yu-Qiong He, et al. (2018), “Monotropein attenuates ovariectomy and LPS-induced bone loss in mice and decreases inflammatory impairment on osteoblast through blocking activation of NF- κ B pathway”, *Chemico-Biological Interactions*, Vol 291, pp.128-136.
10. Zhang, et al. (2016), “Monotropein isolated from the roots of *Morinda officinalis* increases osteoblastic bone formation and prevents bone loss in ovariectomized mice”, *Fitoterapia*, 110 (2016), pp. 166-172.

11. Wang, et al. (2017), "Monotropein promotes angiogenesis and inhibits oxidative stress-induced autophagy in endothelial progenitor cells to accelerate wound healing", *J. Cell. Mol. Med.* (2017), 10.1111/jcmm.13434.

SUMMARY

A reverse-phase HPLC-DAD method was developed for assay of Monotropein in Monotropein material is introduced: The chromatographic conditions are as follows: Column: Ultra C18, 5 μ m (250 $\times$ 4.6 mm); mobile phase: the mixture of Methanol – 0.5% Phosphoric acid (5:95); flow rate: 1.0 ml/min; Injection volume is 10 μ l; DAD:237 nm.

The method of assay was validated about the system suitability, specificity, linear range, precision, accuracy and the validation results proved that this method was suitable for identification and quantification of Monotropein in Monotropein material.

(Ngày nhận bài: 30/12/2019 ; Ngày phản biện: 03/03/2020 ; Ngày duyệt đăng: 24/03/2020)

XÂY DỰNG VÀ THẨM ĐỊNH PHƯƠNG PHÁP HPLC ĐỂ XÁC ĐỊNH TẠP CHẤT LIÊN QUAN TRONG VIÊN VENLAFAXIN GIẢI PHÓNG KÉO DÀI

VŨ THỊ THU GIANG, NGUYỄN THỊ THANH HUYỀN

Trường Đại học Dược Hà Nội

NGUYỄN VĂN HÀ, ĐOÀN CAO SƠN

Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương

Từ khóa: Venlafaxin, HPLC, giải phóng kéo dài, tạp chất liên quan.

1. Đặt vấn đề

Việc kiểm tra chất lượng thuốc, đặc biệt là kiểm tra giới hạn tạp chất liên quan của dạng viên giải phóng kéo dài là chỉ tiêu quan trọng để đảm bảo thuốc sử dụng an toàn, hiệu quả, sử dụng lâu dài, do tạp chất có thể được sinh ra từ quá trình tổng hợp nguyên liệu, quá trình sản xuất và bảo quản. Dựa trên các tài liệu đã nghiên cứu [2],[4], kết hợp khảo sát các điều kiện cụ thể, chúng tôi tiến hành xây dựng phương pháp xác định tạp chất liên quan của venlafaxin trong viên giải phóng kéo dài với mục đích cung cấp thêm một phương pháp đơn giản, dễ áp dụng trong kiểm tra chất lượng thuốc. Phương pháp được thẩm định các tiêu chí theo tài liệu hướng dẫn của Asean, ICH [1],[3].

2. Thực nghiệm

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

2.1.1. Thiết bị, dụng cụ

Tất cả các thiết bị và dụng cụ phân tích đã được hiệu chuẩn theo quy định của ISO/IEC 17025 và GLP.

- Máy sắc ký lỏng hiệu năng cao shimadzu detector DAD.

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

- Các bình định mức, cốc có mỏ, pipet và các dụng cụ thủy tinh có độ chính xác phù hợp.

2.1.2. Hóa chất, chất chuẩn

2.1.2.1. Chất đối chiếu

- Chất chuẩn Venlafaxin hydroclorid, chuẩn của Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương, lô WS.0107229; hàm lượng 99,6%; ẩm 0,01%.

- Tạp chuẩn: Venlafaxin related compound A, chuẩn USP, lô F01357.

2.1.2.2. Dung môi, hóa chất

- Acetonitril đạt tinh khiết sắc ký (Merck – Đức);

- Kali dihydrophosphat đạt tinh khiết phân tích (Merck – Đức);

- Nước RO (Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương);

- Triethylamin đạt tinh khiết phân tích (Merck - Đức);

- Acid phosphoric đạt tinh khiết phân tích (Merck – Đức).

2.2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Đối tượng nghiên cứu

- Viên venlafaxin giải phóng kéo dài có công thức như trong Bảng 1.

Bảng 1. Thành phần công thức viên venlafaxin giải phóng kéo dài

Thành phần viên nhân	Hàm lượng
Venlafaxin hydroclorid	86,10 mg
Lactose	75,00 mg
Avicel PH 101	75,00 mg
Manitol	50,00 mg
Natri clorid	10,00 mg
PVP- K30	10,00 mg
Ethanol 96%*	0,10 ml
Talc	3,00 mg
Magnesi stearat	3,00 mg
Màng bao gồm: Celulose acetat, PEG 400, tween 80, aceton*, ethanol 96%*	Vừa đủ cho 01 viên

* Các thành phần này sẽ bay hơi trong quá trình bào chế

- Mẫu placebo: Có các thành phần như trong viên nhân trong Bảng 1 nhưng không có được chất venlafaxin hydroclorid.

2.2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.2.1. Điều kiện sắc ký

- Cột sắc ký: Cột C18, (250 x 4,6 mm), 5 μ m.
- Pha động: Đệm phosphat pH 3,0 - acetonitril (75:25).
- Tốc độ dòng: 1 ml/phút
- Thể tích tiêm: 20 μ l
- Detector: UV 224 nm.
- Thời gian chạy sắc ký: gấp 3 lần thời gian lưu của pic venlafaxin.

Đệm phosphat pH 3,0: Hòa tan 3,4 g kali dihydrophosphat trong 700 ml nước, thêm 5 ml triethylamin, điều chỉnh pH về 3,0 bằng acid phosphoric. Lọc qua màng 0,45 μ m.

2.2.2.2. Phương pháp chuẩn bị mẫu

- **Dung dịch thử:** Lấy 10 viên, bóc lớp vỏ bao, thu được viên nhân, viên nhân được nghiền thành bột mịn. Cân chính xác một lượng bột viên tương ứng với khoảng 25 mg venlafaxin hydroclorid cho vào bình định mức 100 ml, thêm 70 ml pha động, lắc để hòa tan, thêm pha động vừa đủ đến vạch, lắc đều. Lọc qua màng lọc 0,45 μ m.

- **Dung dịch chuẩn so sánh:** Cân chính xác khoảng 25 mg venlafaxin hydroclorid chuẩn vào bình định mức 100 ml, hòa tan và pha loãng bằng pha động vừa đủ đến

vạch, lắc đều. Hút chính xác 10 ml dung dịch này pha loãng thành 100 ml bằng pha động, lắc đều. Hút chính xác 2 ml dung dịch thu được pha loãng thành 100 ml bằng pha động, lắc đều. Lọc qua màng lọc 0,45 μ m, thu được dung dịch chuẩn so sánh có nồng độ venlafaxin hydroclorid 0,5 μ g/ml.

- **Dung dịch đánh giá tính thích hợp của hệ thống sắc ký:** Cân chính xác khoảng 2,50 mg chất chuẩn tạp A của venlafaxin (venlafaxin related compound A) vào bình định mức 100 ml, hòa tan và thêm vừa đủ bằng methanol. Hút chính xác 5,0 ml dung dịch này vào bình định mức 50 ml, thêm vừa đủ bằng methanol, lắc đều. Hút chính xác 2,0 ml dung dịch thu được vào bình định mức 20 ml, thêm vừa đủ bằng dung dịch chuẩn đến vạch, lắc đều. Lọc qua màng lọc 0,45 μ m, thu được dung dịch có nồng độ chất chuẩn tạp A là 0,25 μ g/ml và chuẩn venlafaxin hydroclorid là 0,5 μ g/ml.

2.2.2.3. Yêu cầu tính thích hợp của hệ thống sắc ký

Độ phân giải giữa pic tạp A và pic venlafaxin không được nhỏ hơn 1,5. Hệ số kéo đuôi của pic venlafaxin phải nhỏ hơn 2. Số đĩa lý thuyết của pic chuẩn venlafaxin $N \geq 3000$. Độ lệch chuẩn tương đối của diện tích pic của 6 lần tiêm lặp lại dung dịch chuẩn $RSD \leq 5\%$.

2.2.2.4. Tính toán giới hạn tạp chất

Giới hạn tạp chất trong mẫu thử được tính toán dựa vào diện tích pic tạp bất kỳ, diện tích pic venlafaxin trong dung dịch chuẩn so sánh, lượng cân mẫu thử, lượng cân mẫu chuẩn, hàm lượng chuẩn, độ pha loãng của dung dịch thử, dung dịch chuẩn.

Yêu cầu [4]:

- Tạp bất kỳ không được quá 0,2%.
- Tổng tạp bằng tổng các tạp đơn và không được quá 0,5%.

2.2.2.5. Thẩm định phương pháp phân tích

Thẩm định phương pháp xác định tạp chất bất kỳ ở giới hạn 0,2% về các tiêu chí: Tính thích hợp của hệ thống, độ đặc hiệu, độ đúng, độ chính xác, giới hạn phát hiện, giới hạn định lượng và khoảng xác định.

3. Kết quả và bàn luận

3.1. Tính thích hợp của hệ thống sắc ký

Tiêm dung dịch đánh giá tính thích hợp của hệ thống được chuẩn bị như trong mục 2.2.2.2 vào hệ thống sắc ký, lưu lại các sắc ký đồ, kết quả tính thích hợp của hệ thống sắc ký được trình bày trong Bảng 2.

Bảng 2. Kết quả thử tính thích hợp của hệ thống sắc kí

TT	Thời gian lưu của tạp A (phút)	Diện tích pic của tạp A (mAU.s)	Thời gian lưu của venlafaxin (phút)	Diện tích pic của venlafaxin (mAU.s)
1	7,348	8759	8,105	19407
2	7,337	9000	8,075	19411
3	7,333	8646	8,071	19102
4	7,340	8855	8,060	19445
5	7,340	8608	8,601	19842
6	7,345	8778	8,058	19768
Trung bình	7,341	8774,33	8,070	19495,83
RSD	0,07%	1,63%	0,22%	1,39%
Hệ số kéo đuôi		1,2		1,2
Độ phân giải		2,6		
Số đĩa lý thuyết		> 11000		> 11000

Kết quả trong Bảng 2 cho thấy: Độ lặp lại về thời gian lưu, diện tích pic của 6 lần tiêm lặp lại, hệ số kéo đuôi, độ phân giải giữa pic tạp A và pic venlafaxin, số đĩa lý thuyết của pic venlafaxin đều đạt yêu cầu. Như vậy, phương pháp đưa ra đạt yêu cầu về tính thích hợp của hệ thống sắc ký.

3.2. Độ đặc hiệu

Chuẩn bị các dung dịch tiêm sắc ký:

- Dung dịch phân giải, dung dịch chuẩn, dung dịch thử: Chuẩn bị như trong mục 2.2.2.2.

- Dung dịch placebo được chuẩn bị như dung dịch mẫu thử trong quy trình phân tích.

- Chuẩn bị các dung dịch đánh giá tạp trong các điều kiện khắc nghiệt như sau:

+ *Trong môi trường acid*: Cân lượng bột viên tương ứng 25 mg venlafaxin hydroclorid vào bình định mức 100 ml, thêm 2 ml acid hydroclorid 5 M, để yên trong 3 giờ, tiếp tục xử lý theo quy trình phân tích.

+ *Trong môi trường kiềm*: Cân lượng bột viên tương ứng 25 mg venlafaxin hydroclorid vào bình định mức 100 ml, thêm 2 ml natri hydroxyd 5 M, để yên trong 3 giờ, tiếp tục xử lý theo quy trình phân tích.

+ *Môi trường oxy hóa*: Cân lượng bột viên tương ứng 25 mg venlafaxin hydroclorid vào bình định mức

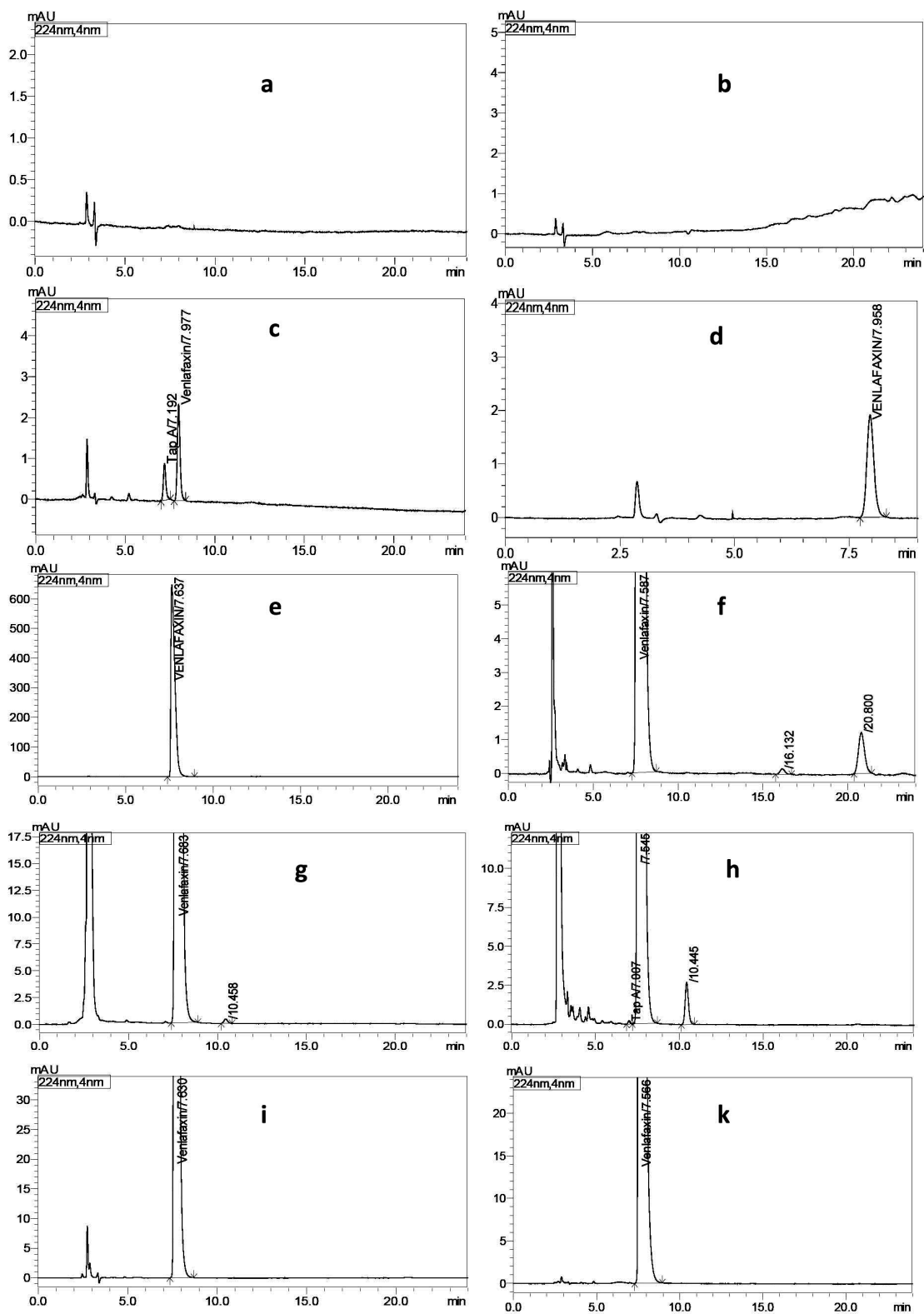
100 ml, thêm 2 ml hydrogen peroxyd 30%, để yên trong 3 giờ, tiếp tục xử lý theo quy trình phân tích.

+ *Trong môi trường nhiệt độ cao*: Cân lượng bột viên tương ứng 25 mg venlafaxin hydroclorid vào bình định mức 100 ml, thêm 70 ml pha động, đun trong cách thủy sôi 3 giờ, tiếp tục xử lý theo quy trình phân tích.

+ *Dưới ánh sáng tử ngoại*: Cân lượng bột viên tương ứng 25 mg venlafaxin hydroclorid vào bình định mức 100 ml, thêm 70 ml pha động, chiếu chùm tia UV tại 254 nm trong 24 giờ, tiếp tục xử lý theo quy trình phân tích.

Tiến hành tiêm sắc ký các dung dịch trên, sắc ký đồ thu được như trình bày trong Hình 1.

Kết quả: Thời gian lưu của pic chính trong sắc ký đồ của dung dịch thử là tương tự dung dịch chuẩn tại 7,9 phút. Pic tạp A tách hoàn toàn ra khỏi pic venlafaxin, có thời gian lưu khoảng 7,2 phút. Mẫu placebo không có pic tại thời gian lưu tương ứng với pic của venlafaxin và pic tạp A. Mẫu thử để trong điều kiện nhiệt độ 100°C trong 3 giờ và mẫu thử chiếu tia UV trong 24 giờ không thấy xuất hiện thêm pic tạp. Các mẫu thử trong môi trường acid, môi trường kiềm, môi trường oxy hóa có xuất hiện các pic tạp, tuy nhiên các pic tạp này đều tách hoàn toàn ra khỏi pic dược chất. Như vậy phương pháp đưa ra là đặc hiệu để xác định tạp chất trong viên venlafaxin giải phóng kéo dài.

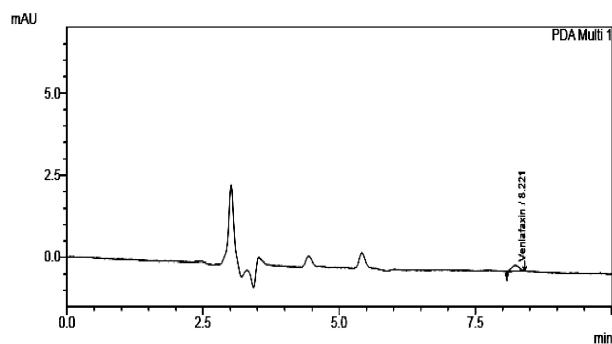


Hình 1. Sắc ký đồ các mẫu: Mẫu trắng (a), mẫu placebo (b), mẫu đánh giá độ phân giải (c), mẫu chuẩn (d), mẫu thử (e), mẫu phân hủy trong môi trường acid (f), mẫu phân hủy trong môi trường kiềm (g), mẫu phân hủy trong môi trường oxy hóa (h), mẫu phân hủy trong điều kiện nhiệt độ cao (i), mẫu dưới ánh sáng tử ngoại (k).

3.3. Xác định giới hạn phát hiện LOD và giới hạn định lượng LOQ

3.3.1. Xác định LOD

Tiến hành pha loãng dần dung dịch chuẩn venlafaxin ở mục 2.2.2.2, tiêm sắc ký các dung dịch chuẩn thu được và dung dịch mẫu trắng là pha động như điều kiện sắc ký đưa ra trong mục 2.2.2.1. Giới hạn LOD được xác định dựa vào tỷ lệ đáp ứng pic trên nhiễu (S/N) nằm giữa 3:1 và 2:1.



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

Ở nồng độ 0,045 µg/ml thì tỷ lệ S/N nằm trong khoảng tỷ lệ 3:1 và 2:1. Do vậy LOD của phương pháp được xác định là 0,045 µg/ml, sắc ký đồ thể hiện trong Hình 2.

3.3.2. Xác định LOQ

$$LOQ = 3,3 \times LOD = 3,3 \times 0,045 = 0,15 \text{ µg/ml.}$$

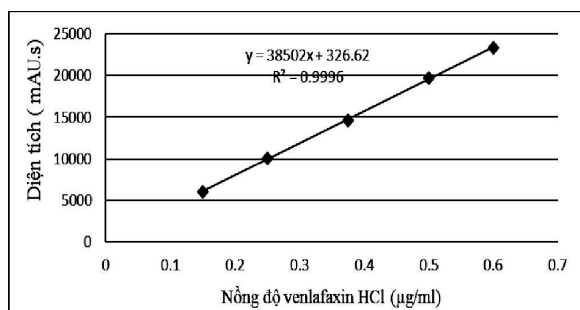
3.4. Độ tuyến tính

Từ dung dịch chuẩn gốc có nồng độ venlafaxin hydroclorid 2,5 µg/ml, chuẩn bị các dung dịch chuẩn venlafaxin hydroclorid có nồng độ khác nhau: Tại nồng độ LOQ (0,15 µg/ml); 50% (0,25 µg/ml), 75% (0,375 µg/ml), 100% (0,5 µg/ml), 120% (0,6 µg/ml) so với nồng độ định lượng tap (0,5 µg/ml) ở 100%, nồng độ này được xác định dựa vào giới hạn cho phép đối với tap bất kỳ là 0,2% và từ cách tiến hành pha dung dịch thử như ở mục 2.2.2.2.

Tiến hành chạy sắc ký các dung dịch trên. Xác định phương trình hồi quy tuyến tính, hệ số tương quan tuyến tính giữa nồng độ chất chuẩn venlafaxin hydroclorid có trong mẫu và đáp ứng pic thu được trên các sắc ký đồ bằng phương pháp bình phương tối thiểu. Kết quả được trình bày trong Bảng 3, Hình 3.

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

Nồng độ (µg/ml)	Thể tích dung dịch chuẩn gốc (ml)	Bình định mức (ml)	Diện tích pic venlafaxin (mAU.s)
0,15	3	50	6049,5
0,25	5	50	10050
0,375	3	20	14640
0,50	5	25	19755
0,60	6	25	23331
Phương trình hồi quy: $y = 38502x + 326,62$; Hệ số tương quan $r = 0,9998$			
Phần trăm hệ số chẵn tại nồng độ 100%: 1,7%			



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

Kết quả trong Bảng 3 và Hình 3 cho thấy trong khoảng nồng độ từ 0,15 µg/ml (tại LOQ) đến 0,6 µg/ml (120% so với nồng độ định lượng) có sự tương quan tuyến tính chặt chẽ giữa nồng độ và diện tích pic, hệ số tương quan $r = 0,9998$, phần trăm hệ số chẵn tại nồng độ 100% là 1,7%, nhỏ hơn 2%.

3.5. Độ đúng

- Chuẩn bị 05 mẫu tự tạo bằng cách thêm chính xác một lượng chất chuẩn venlafaxin hydroclorid vào các mẫu placebo. Lượng venlafaxin hydroclorid thêm vào

tương ứng với 5 mức nồng độ: LOQ, 50%, 75%, 100% và 120% so với nồng độ định lượng tap (0,5 µg/ml). Mỗi mức nồng độ tiến hành lặp lại 3 lần.

Tiêm các dung dịch vào hệ thống sắc ký, lưu lại sắc ký đồ, kết quả đánh giá độ đúng được trình bày trong Bảng 4.

Bảng 4. Kết quả khảo sát độ đúng của phương pháp định lượng tap

% so với nồng độ định lượng	Lượng placebo (g)	Lượng chuẩn thêm vào (µg)	Diện tích pic (mAU.s)	Lượng chuẩn tìm lại (µg)	% Thu hồi	% Thu hồi trung bình (%)
LOQ	68,3	15,462	6166	15,685	101,44	100,61 RSD = 1,64%
	68,1	15,462	6102	15,720	101,67	
	68,8	15,462	6002	15,263	98,72	
50	68,6	25,770	10130	26,097	101,27	100,44 RSD = 0,97%
	68,4	25,770	10071	25,945	100,68	
	69,0	25,770	9940	25,607	99,37	
75	68,8	38,655	14986	38,608	99,88	101,16 RSD = 2,01%
	68,2	38,655	15023	38,701	100,12	
	68,6	38,655	15526	40,000	103,48	
100	68,6	51,540	20568	52,57	102,0	100,69 RSD = 1,21%
	69,2	51,540	20408	51,782	100,47	
	68,4	51,540	19928	51,339	99,61	
120	68,8	61,848	24635	63,467	102,62	100,94 RSD = 1,48%
	68,5	61,848	23967	61,743	99,83	
	69,1	61,848	24096	62,070	100,37	

Kết quả trong Bảng 4 cho thấy tỷ lệ phần trăm thu hồi cao, từ 98,72% đến 103,48% đều nằm trong khoảng từ 95,0% - 105,0% với giá trị RSD ở cả 5 mức nồng độ từ 0,97% đến 2,01% (đều nhỏ hơn 3%).

3.6. Khoảng xác định

Từ kết quả thẩm định độ tuyến tính và độ đúng suy ra khoảng xác định là từ LOQ (0,15 µg/ml) đến 0,60 µg/ml.

3.7. Độ chính xác

3.7.1. Độ lặp lại

Chuẩn bị 02 mẫu tự tạo bằng cách thêm chính xác một lượng chất chuẩn venlafaxin hydroclorid vào các mẫu placebo. Lượng venlafaxin hydroclorid thêm vào tương ứng với mức nồng độ tại LOQ (0,15 µg/ml) và tại mức 100% so với nồng độ định lượng tap (0,5 µg/ml). Mỗi mức nồng độ tiến hành lặp lại 6 lần.

3.7.2. Độ chính xác trung gian

Tiến hành như độ lặp lại nhưng thực hiện ở ngày khác và kiểm nghiệm viên khác.

Kết quả đánh giá độ chính xác được thể hiện trong Bảng 5.

Bảng 5. Độ chính xác của phương pháp (Độ lặp lại và độ chính xác trung gian)

Kiểm nghiệm viên 1					
Tại nồng độ LOQ (0,15 µg/ml)			Tại nồng độ 100% (0,5 µg/ml)		
STT	Diện tích pic	% Định lượng	STT	Diện tích pic	% Định lượng
1	6144	102,37	1	20014	100,04
2	6166	102,74	2	20399	101,96
3	6102	101,67	3	20568	102,81
4	6217	103,59	4	20100	100,47
5	6260	104,30	5	19928	99,61
6	6154	102,54	6	20666	103,3
Trung bình = 102,87%; n = 6; RSD = 0,94%			Trung bình = 101,37%; n = 6; RSD = 1,54%		
Kiểm nghiệm viên 2					
Tại nồng độ LOQ (0,15 µg/ml)			Tại nồng độ 100% (0,5 µg/ml)		
STT	Diện tích pic	% Định lượng	STT	Diện tích pic	% Định lượng
1	6180	102,69	1	19706	98,23
2	6081	101,05	2	20544	102,46
3	6068	100,83	3	20226	100,83
4	6163	102,41	4	20163	100,51
5	6039	100,35	5	20749	103,43
6	6173	102,57	6	20327	101,33
Trung bình = 101,65%; n = 6; RSD = 1,03%			Trung bình = 100,97%; n = 6; RSD = 1,79%		
Trung bình = 102,26%; n = 12; RSD = 1,13%			Trung bình = 101,17%; n = 12; RSD = 1,59%		

Kết quả thu được cho thấy phương pháp có độ chính xác phù hợp (RSD < 2%) để phân tích tạp chất liên quan trong mẫu.

4. Kết luận

Qua quá trình khảo sát đã xây dựng được phương pháp xác định tạp chất liên quan của venlafaxin trong

viên giải phóng kéo dài. Phương pháp được thẩm định trên các tiêu chí như tính đặc hiệu, độ tuyến tính, độ chính xác, độ đúng, giới hạn phát hiện (LOD), giới hạn định lượng (LOQ). Kết quả đánh giá cho thấy phương pháp đã xây dựng phù hợp để xác định tạp chất trên mẫu viên nén venlafaxin giải phóng kéo dài.

Tài liệu tham khảo

1. Bộ Y tế (2018), “Hướng dẫn của Asean về thẩm định quy trình phân tích”, *Thông tư số 32/2018/TT-BYT* ngày 12/11/2018 của Bộ Y tế Quy định việc đăng ký lưu hành thuốc, nguyên liệu làm thuốc, trang 298-311.
2. Baldania at al. 2008, “RP-HPLC Estimation Venlafaxine hydrochloride in Table Dosage Forms”, *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 70 (1), pp. 124-128.
3. ICH Topic Q2B (1996), *Validation of Analytical Procedure: Text and Methodology*.
4. *The United States Pharmacopeia 40-NF 35* (2017), Venlafaxine Hydrochloride Extended-Release Capsules, 3, pp. 6667-6673.

SUMMARY

A reverse phase high performance liquid chromatographic method was developed and validated for the determination of related compounds in Venlafaxine extended release tablets. Chromatography was carried out on phenomenex C18

reversed-phase column (25 cm × 4.6 mm, 5 µm), using a mixture of Acetonitrile - Phosphate buffer pH 3.0 (25 : 75 v/v) as a mobile phase at a flow rate of 1.0 ml.min⁻¹. Detection was performed at 224 nm at ambient temperature. The calibration curve was linear ($r = 0.9998$) over a concentration range from 0.15 to 0.60 µg/ml. Limit of detection (LOD) and limit of quantitation (LOQ) were found 0.045 µg/ml and 0.15 µg/ml respectively. The method was validated for its linearity, precision and accuracy. The proposed method was successfully applied for the determination of related compounds of the Venlafaxine extended release tablets.

(Ngày nhận bài: 30/11/2019 ; Ngày phản biện: 19/02/2020 ; Ngày duyệt đăng: 24/03/2020)

NGHIÊN CỨU ĐỊNH LƯỢNG TENOFOVIR TRONG HUYẾT TƯƠNG NGƯỜI BẰNG PHƯƠNG PHÁP LC-MS/MS

DƯƠNG ANH HIỆP

Trung tâm Kiểm nghiệm Thuốc – Mỹ phẩm
– Thực phẩm Bắc Kạn

TẠ MẠNH HÙNG, HOÀNG VĂN ĐỨC,
ĐOÀN CAO SƠN

Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương

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

1. Đặt vấn đề

Tenofovir (TFV) là thuốc kháng virus thuộc nhóm ức chế men sao chép ngược loại nucleotid, có trong nhiều phác đồ điều trị HIV/AIDS của Tổ chức Y tế Thế giới (WHO) và điều trị viêm gan virus B. TFV được khuyến cáo sử dụng rộng rãi như một lựa chọn đầu tay trong các hướng dẫn điều trị HIV trên Thế giới, do những đặc tính an toàn, dung nạp tốt, hiệu lực cao trong phác đồ phối hợp, sử dụng tiện lợi (1 viên/ngày) giúp tăng việc tuân thủ điều trị [1]. Hiện nay, một số doanh nghiệp được đã và đang nghiên cứu sản xuất các chế phẩm chứa TFV dưới dạng các tiền thuốc (pro-drug) như Tenofovir disoproxil fumarat hay Tenofovir alafenamid nên nhu cầu nghiên cứu tương đương sinh học là điều cần thiết và xuất phát từ thực tế. Dựa vào trang thiết bị hiện có và tham khảo một số phương pháp phân tích đã được các tác giả công bố [3],[4] đồng thời dựa trên nguyên lý của phương pháp sắc ký lỏng - khối phổ, chúng tôi đã tiến hành nghiên cứu định lượng Tenofovir trong huyết tương người bằng phương pháp LC-MS/MS.

2. Thực nghiệm

2.1. Nguyên vật liệu

2.1.1. Chất chuẩn

- Tenofovir monohydrat: Chuẩn USP; SKS: R044C0; hàm lượng: 100%;

- Acyclovir: chuẩn Dược điển Việt Nam; SKS: 0105137; hàm lượng 98,87%; độ ẩm: 3,99%; nhà sản

xuất: Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương; được dùng làm chuẩn nội trong phương pháp phân tích.

2.1.2. Dung môi, hóa chất

- Acetonitril, methanol, amoni bicarbonat, acid acetic băng đạt tiêu chuẩn tinh khiết dùng cho phân tích hoặc sắc ký.

- Huyết tương trắng: Không có TFV 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 17025 và GLP.

- Máy sắc ký lỏng khối phổ AB Sciex QTRAP 6500+ (Sciex – Mỹ);

- Cân phân tích Mettler Toledo (Thụy Sĩ, độ chính xác d = 0,1 mg);

- Tủ lạnh sâu -35 °C ± 5 °C (Panasonic – Nhật Bản);

- Máy ly tâm lạnh (Sigma 4-16K – Đức);

- Máy lọc nước, ...

2.2.2. Dụng cụ

Bình định mức, pipet loại A, ống ly tâm, ...

2.3. Điều kiện phân tích

2.3.1. Điều kiện sắc ký

- Cột Luna C18; 150 x 4,6 mm; 3 µm. Cột bảo vệ: C18, 4 x 3 mm.

- Pha động: Methanol - amoni bicarbonat 10 mM tỷ lệ 10 : 90 (v/v).
- Tốc độ dòng: 0,8 ml/phút
- Thể tích tiêm mẫu: 20 μ l
- Nhiệt độ autosampler (buồng tiêm mẫu): 200°C

2.3.2. Điều kiện khối phổ

Kiểu khối phổ hai lần (MS/MS), nguồn ion hóa ESI (+). Các thông số của thiết bị khối phổ để phát hiện TFV và chất chuẩn nội (IS) được trình bày ở Bảng 1.

Bảng 1. Các thông số của detector khối phổ dùng để định lượng TFV và acyclovir

<i>Thông số</i>	<i>Hoạt chất</i>	<i>Tenofovir</i>	<i>Acyclovir (IS)</i>
Chế độ ion hóa		ESI (-)	ESI (-)
Điện thế đầu phun (V)		4500	4500
Nebulizer gas (psi)		65	65
Turbo gas (psi)		65	65
Temperature (°C)		600	600
Decluster potential (V)		40	30
Curtain gas (psi)		25	25
Collision cell exit potential (V)		15	13
Mảnh mẹ (m/z, Dalton)		286,0	224,0
Năng lượng phân mảnh (V)		28,0	26,0
Mảnh con (m/z, Dalton)		134,0	150,0

2.3.3. Phương pháp xử lý mẫu

Thêm 50 μ l dung dịch chuẩn nội (nồng độ chính xác khoảng 3 μ g/ml) vào 0,5 ml mẫu huyết tương (HT) đã rã đông ở nhiệt độ phòng, thêm 250 μ l dung dịch acid acetic 1 M. Lắc xoáy 5 giây. Thêm 2 ml acetonitril, lắc xoáy 10 giây. Ly tâm 6000 vòng/phút trong 5 phút. Lấy 500 μ l lớp dịch nổi, cô bay hơi dung môi. Hòa tan cặn trong 500 μ l nước, tiêm sắc ký.

2.3.4. Phương pháp tính kết quả

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

3. Kết quả và bàn luận

3.1. Độ đặc hiệu - chọn lọc của phương pháp

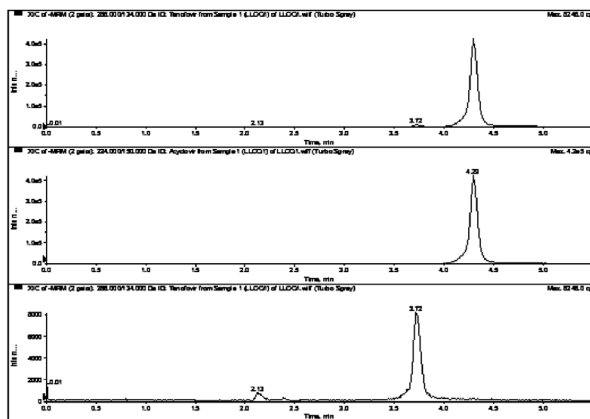
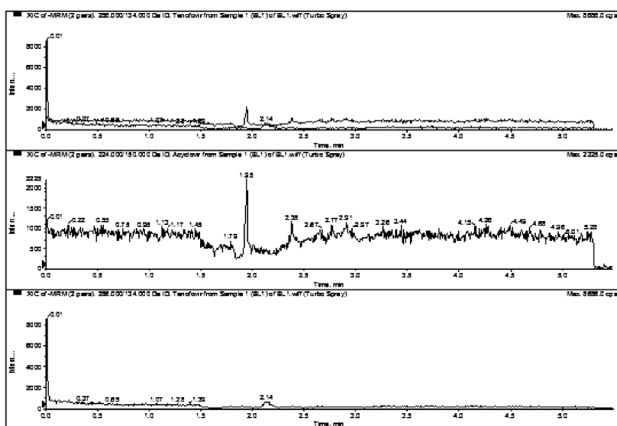
Phân tích các mẫu HT trắng, mẫu HT tự tạo

chứa chuẩn nội và TFV nồng độ khoảng 3 ng/ml theo phương pháp đã xây dựng và ghi lại sắc ký đồ (Hình 1, 2).

Trên SKĐ của mẫu HT trắng (Hình 1), tại thời điểm 3,37 phút và 4,29 phút trùng với thời gian lưu của TFV và IS trong mẫu chuẩn (Hình 2) không xuất hiện các pic có mảnh phổ khối $m/z = 286 \rightarrow 134$ (đặc trưng cho TFV) và mảnh phổ khối $m/z = 224 \rightarrow 150$ (đặc trưng cho IS). Do vậy, phương pháp phân tích có độ đặc hiệu - chọn lọc với TFV và IS theo các quy định của phương pháp phân tích thuốc trong dịch sinh học [2],[5].

3.2. Đường chuẩn và khoảng tuyến tính

Phân tích các mẫu HT chứa chuẩn nội và chuẩn TFV có nồng độ khoảng 3 ng/ml đến 600 ng/ml theo quy trình đã xây dựng. Xác định sự tương quan giữa nồng độ TFV có trong mẫu và tỉ lệ diện tích pic TFV/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 2.

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

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

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

Mẫu chuẩn Nồng độ (ng/ml)	Độ đúng (%)				
	Đường chuẩn 1	Đường chuẩn 2	Đường chuẩn 3	Đường chuẩn 4	Đường chuẩn 5
3,0	102,3	102,2	102,5	99,3	101,4
6,0	97,2	98,4	97,1	103,5	100,2
15,1	97,6	94,9	94,8	95,0	94,0
30,2	92,6	94,4	100,2	96,6	94,1
60,4	104,7	103,0	97,6	104,7	103,5
120,8	101,0	96,8	105,0	103,4	99,4
302,1	104,4	105,8	100,3	99,2	102,5
604,1	100,2	104,5	102,5	98,3	108,4
Phương trình hồi quy (y = ax+b) *	y = 0,0052 x + 0,0011	y = 0,0055 x + 0,0004	y = 0,0058 x – 0,0014	y = 0,0059 x + 0,0007	y = 0,0065 x + 0,0001
Hệ số r	0,9989	0,9987	0,9992	0,9992	0,9989

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

Kết quả thăm định cho thấy trong khoảng nồng độ từ 3 ng/ml đến 600 ng/ml có sự tương quan tuyến tính giữa nồng độ TFV và tỷ lệ diện tích pic TFV/IS với hệ số tương quan xấp xỉ bằng 1.

Nồng độ T_{TV} 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 [2],[5].

3.3. Giới hạn định lượng dưới của phương pháp

Phân tích các mẫu HT trắng và mẫu HT chứa chuẩn nội và chuẩn TFV có nồng độ chính xác khoảng 3 ng/ml (mẫu LLOQ). Xác định nồng độ TFV 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 3.

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

STT	Mẫu trắng	Mẫu chuẩn (3 ng/ml)			
	Diện tích pic	Diện tích pic TFV	Diện tích pic IS	Nồng độ TFV tìm thấy (ng/ml)	Độ đúng (%)
1	0	49280	2591127	2,9	96,5
2	0	49526	2669093	2,8	94,1
3	0	50551	2750673	2,8	93,2
4	0	50743	2670122	2,9	96,4
5	0	49381	2633820	2,9	95,1
6	0	48880	2556563	2,9	97,0
Trung bình	0	49727	2645233	2,9	95,4
CV (%)					1,6
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 TFV trong các mẫu LLOQ. Tỷ lệ giữa nồng độ TFV xác định từ đường chuẩn so với nồng độ lý thuyết có trong các mẫu LLOQ nằm trong khoảng từ 93,2% - 97,0% (trung bình = 95,4% và CV = 1,6%), đáp ứng yêu cầu giới hạn định lượng dưới của phương pháp phân tích thuốc trong dịch sinh học [2],[5].

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

Tiến hành thẩm định độ đúng, độ lặp lại trên 5 lô mẫu LLOQ, LQC, SQC, MQC, HQC chứa TFV có nồng độ tương ứng là 3 ng/ml; 9 ng/ml; 90 ng/ml, 240 ng/ml và 480 ng/ml. Xác định hàm lượng TFV có trong các mẫu bằng đường chuẩn phân tích trong cùng điều kiện. Độ đúng của phương pháp là tỷ lệ % giữa nồng độ xác định được so với nồng độ lý thuyết. Độ lặp lại của phương pháp được biểu thị bằng giá trị CV%. Kết quả xác định độ đúng, độ lặp lại của phương pháp được trình bày ở Bảng 4.

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

Độ đúng, độ lặp lại	LLOQ (≈ 3 ng/ml)		LQC (≈ 9 ng/ml)		SQC (≈ 90 ng/ml)		MQC (≈ 240 ng/ml)		HQC (≈ 480 ng/ml)	
	Độ đúng (%)	CV (%)	Độ đúng (%)	CV (%)	Độ đúng (%)	CV (%)	Độ đúng (%)	CV (%)	Độ đúng (%)	CV (%)
Trong ngày	95,4	1,6	92,8	4,5	93,6	5,4	99,8	3,0	102,7	1,3
Khác ngày	106,1	8,6	98,7	4,7	98,3	5,3	94,5	6,2	95,7	7,7

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 xấp xỉ 100%; độ lặp lại trong ngày và khác ngày với giá trị CV nhỏ hơn 15%.

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

Tiến hành nghiên cứu độ ổn định của TFV trong HT trên các lô mẫu LQC và HQC. Đánh giá độ ổn định của TFV trong HT bằng cách so sánh nồng độ TFV có trong các mẫu được bảo quản và các mẫu có nồng độ tương ứng được phân tích ngay sau khi hòa tan chuẩn TFV vào HT trắng. Kết quả nghiên cứu độ ổn định của TFV được trình bày trong Bảng 5.

Bảng 5. Kết quả nghiên cứu độ ổn định của TFV 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
4 chu kì đông - rã	LQC	9,4	8,6	-8,5
	HQC	508,0	454,5	-10,5
Độ ổn định thời gian ngắn (5 giờ, nhiệt độ phòng)	LQC	9,0	8,5	-5,2
	HQC	474,0	457,7	-3,4
Độ ổn định trong autosampler (47 giờ/20 °C)	LQC	8,9	8,8	-2,8
	HQC	449,4	424,0	-5,6
Độ ổn định dài ngày (-35 °C ± -5 °C, 90 ngày)	LQC	9,4	8,1	-14,2
	HQC	508,0	457,1	-10,0

4. Kết luận

Nghiên cứu đã xây dựng được phương pháp định lượng Tenofovir trong huyết tương người bằng phương pháp LC-MS/MS. Kết quả thẩm định cho thấy, phương pháp có giá trị giới hạn định lượng dưới nhỏ (3 ng/ml); khoảng tuyến tính rộng (từ 3 ng/ml đến 600 ng/ml); độ đúng dao động trong khoảng từ 92,8% - 106,1%; độ lặp lại với giá trị CV% nhỏ (1,3% - 8,6%), thời gian phân tích ngắn (6,0 phút cho mỗi mẫu), đáp ứng yêu cầu đối với phương pháp phân tích thuốc trong dịch sinh học của US-FDA và EMA [2],[5]. Phương pháp đã xây dựng có thể ứng dụng trong các nghiên cứu đánh giá tương đương sinh học đối với chế phẩm chứa hoạt chất Tenofovir.

Tài liệu tham khảo

1. Bộ Y Tế (2015), *Dược thư quốc gia Việt Nam*, Lần xuất bản thứ hai, Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật, trang 657-658.
2. European Medicines Agency, Committee for Medicinal Products for Human Use (2011): *Guideline on Bioanalytical Method Validation*.
3. M. Takahashi, Y. Kudaka, N. Okumura, A. Hirano, K. Banno and T. Kaneda, "Determination of plasma tenofovir concentrations using a conventional LC-MS method", *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 2007.
4. Narit Wiriyakosol, Apichaya Puangpech, Weerawut Manosuthi, Sasinapha Tomongkon, Chonlaphat Sukasem and Darawan Pinthong "A LC/MS/MS method for determination of tenofovir in human plasma and its application to toxicity monitoring", *Journal of Chromatography B* -Volume 1085, 15 May 2018, Pages 89-95
5. U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration (2013): *Guidance for Industry - Bioanalytical Method Validation*.

SUMMARY

A high throughput and specific method using ultra performance liquid chromatography tandem mass spectrometry was developed for determination of Tenofovir in human plasma. The Tenofovir and internal standard were separated from human plasma by liquid - liquid extraction technique. Analytes were chromatographed on a C18 column (150 x 4.6 mm; 3 µm) with isocratic elution using a tandem quadrupole mass detector (QTRAP 6500+ – AB Sciex). The mobile phase consists of Methanol and Ammonium bicarbonate 10 mM solution with suitable ratio. The assay was linear over the concentration range of 3 - 600 ng/ml. The LLOQ was 3 ng/ml. The intra-day and inter-day accuracy were within 92.8% - 106.1%; This method can be used for BE studies of Tenofovir preparations.

(Ngày nhận bài: 14/03/2020 ; Ngày phản biện: 20/05/2020 ; Ngày duyệt đăng: 17/06/2020)

NGHIÊN CỨU XÁC ĐỊNH HOẠT LỰC KHÁNG SINH TYROTHRICIN BẰNG PHƯƠNG PHÁP ĐO ĐỘ ĐỤC VI SINH VẬT

NGUYỄN THỊ THU HƯỜNG, TRỊNH THỊ PHƯƠNG DUNG, HỒ THỊ THOM,
NGUYỄN THỊ THU HƯỜNG, NGUYỄN THỊ THU

Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương

Từ khóa: Tyrothricin, xác định hoạt lực kháng sinh, phương pháp đo độ đục vi sinh vật.

1. Đặt vấn đề

Tyrothricin là kháng sinh thuộc nhóm polypeptid, nó bao gồm chủ yếu là Gramicidin và Tyrocidin, có tác dụng kháng khuẩn tại chỗ, kháng sinh nhạy cảm trên trực khuẩn gram (+) và một số cầu khuẩn gram (-). Hiện nay trên thị trường có nhiều chế phẩm dạng gel bôi da, viên nén ngâm có chứa kháng sinh Tyrothricin. Kháng sinh này tan rất ít trong nước nên không thể triển khai định lượng bằng phương pháp khuếch tán trên thạch như các kháng sinh thông thường khác, vì vậy để đáp ứng nhu cầu kiểm soát chất lượng và góp phần nâng cao khả năng kiểm tra chất lượng thuốc, giảm thời gian phân tích xuống chỉ còn 8 giờ, trong phạm vi bài viết này chúng tôi xin giới thiệu kết quả nghiên cứu thẩm định phương pháp đo độ đục vi sinh vật để xác định hoạt lực kháng sinh Tyrothricin trong chế phẩm gel bôi da.

2. Thực nghiệm

2.1. Thiết bị, dụng cụ, hóa chất, môi trường, chủng vi sinh vật, chất chuẩn

2.1.1. Thiết bị, dụng cụ

Đã được hiệu chuẩn theo yêu cầu của GLP –WHO và ISO/IEC 17025.

- Cân phân tích Mettler Toledo MS 105 độ chính xác 0,1 mg;
- Máy đo pH Mettler Toledo S220;
- Tủ an toàn sinh học cấp 2 Safe Fast Elite 212 D;
- Tủ nuôi cấy Memmert IN 260;
- Tủ sấy Memmert UF 260 Plus;
- Nồi hấp hai cửa Priorclave;
- Máy đo quang phổ Shimadzu UV-2600;
- Bể ổn nhiệt Julabo;
- Tủ mát 2-8 °C Panasonic MPR;
- Micropipet Eppendorf thể tích 100 µl, 1000 µl, 5000 µl, 10000 µl;
- Các dụng cụ thủy tinh chính xác loại A.

2.1.2. Hóa chất, môi trường, chủng vi sinh vật, chất chuẩn

2.1.2.1. Hóa chất

- Formaldehyd (Scharlau);
- Ethanol (Scharlau).

2.1.2.2. Môi trường

- Môi trường số 3 (USP 42): pH sau tiệt khuẩn: 7,0 ± 0,05. Thành phần: Pepton 5,0 g; cao nấm men 1,5 g; cao thịt 1,5 g; natri clorid 3,5 g; dextrose 1,0 g; dikali hydrophosphat 3,68 g; kali dihydrophosphat 1,32 g; nước tinh khiết 1000 ml.

2.1.2.3. Chủng vi sinh vật

- *Enterococcus hirae* ATCC 10541; Số lô: 698-72; Nguồn gốc: ATCC (Mỹ).

2.1.2.4. Chất chuẩn

- *Chuẩn (USP RS)*: Gramicidin SKS: JOM340, hàm lượng: 1049 µg/mg (Sau sấy khô ở điều kiện áp suất 5 mm Hg, 60°C, 3 giờ).

- *Chuẩn làm việc*: Tyrothricin SKS: B2400220, hàm lượng: 1133 µg/mg (nguyên trạng).

2.2 Đối tượng, nội dung và phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Đối tượng nghiên cứu

a. Mẫu Thử

Công thức trong 1 g gel bôi da: Tyrothricin 1,0 mg; cetylpyridin clorid monohydrat 0,5 mg; propylen glycol 10,0 mg; ethanol 96% 10,0 mg; tá dược vừa đủ 1000 mg.

b. Mẫu Placebo: Cetylpyridin clorid monohydrat 0,5 mg; propylen glycol 10,0 mg; ethanol 96% 10,0 mg; tá dược vừa đủ 999 mg.

2.2.2. Nội dung nghiên cứu

- Xây dựng và thẩm định quy trình xác định hoạt lực kháng sinh Tyrothricin bằng phương pháp đo độ đục vi sinh vật.

- Ứng dụng để định lượng Tyrothricin trong gel bôi da.

2.2.3. Phương pháp nghiên cứu

- Dựa trên các tài liệu tham khảo, tiến hành khảo sát các điều kiện định lượng: quy trình nuôi cấy và nồng độ chủng vi sinh vật, quy trình xử lý mẫu thử, nồng độ làm việc của kháng sinh, thời gian nuôi cấy,... lựa chọn các điều kiện tối ưu cho phép thử.

- Dựa trên các tài liệu tham khảo và đặc điểm của phép thử vi sinh vật, tiến hành thẩm định quy trình định lượng Tyrothricin.

- Tham khảo USP 42, <81> *Antibiotics-Microbiological Assays* để tính toán kết quả định lượng.

- Tham khảo các hướng dẫn về thẩm định phương pháp định lượng bằng kỹ thuật vi sinh vật theo USP 42, <1223> *Validation of Alternative Microbiological methods*, tiến hành các nghiên cứu thẩm định: Độ đặc hiệu, độ tuyến tính, độ đúng, khoảng xác định, độ chính xác của phương pháp.

3. Kết quả và bàn luận

3.1. Xây dựng quy trình xác định hoạt lực kháng sinh Tyrothricin bằng phương pháp đo độ đục vi sinh vật

Sau khi khảo sát về quy trình cấy truyền chủng vi sinh vật, nồng độ làm việc của hỗn dịch chủng, nồng độ làm việc của kháng sinh, quy trình pha mẫu thử, thời gian tiến hành thử nghiệm, nhóm nghiên cứu đã tối ưu hóa các điều kiện thử nghiệm như sau:

3.1.1. Chuẩn bị hỗn dịch chủng làm việc

- Chế tạo hỗn dịch chủng *Enterococcus hirae* ATCC 10541 làm việc: Cấy truyền chủng 2 - 3 lần trong 24 giờ ở $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ trong môi trường số 3, thu được hỗn dịch chủng gốc có nồng độ tương đương độ đục McFarland số 2 (có độ truyền qua khoảng 35,6% ở bước sóng 600 nm). Lấy 1 ml hỗn dịch chủng gốc, cấy vào 100 ml môi trường số 3 thu được hỗn dịch chủng làm việc. Chuẩn bị hỗn dịch chủng làm việc mỗi khi tiến hành thử nghiệm.

3.1.2. Chuẩn bị dung dịch chuẩn, dung dịch thử, dung dịch placebo

* Chuẩn bị dung dịch chuẩn làm việc:

- Chuẩn bị một dung dịch chuẩn gốc Gramicidin

trong ethanol có nồng độ chính xác khoảng 1000 $\mu\text{g/ml}$. Bảo quản ở nhiệt độ $2 - 8^{\circ}\text{C}$ trong 30 ngày.

- Pha loãng từ dung dịch chuẩn gốc bằng ethanol thu được dãy dung dịch chuẩn làm việc có nồng độ 0,20 $\mu\text{g/ml}$, 0,32 $\mu\text{g/ml}$, 0,40 $\mu\text{g/ml}$, 0,48 $\mu\text{g/ml}$, 0,60 $\mu\text{g/ml}$.

* Chuẩn bị dung dịch thử làm việc:

- Cân một lượng chế phẩm tương đương với 2,5 mg Tyrothricin vào bình định mức 50 ml. Thêm ethanol đến vạch, lắc đều, thu được dung dịch thử gốc T_g có nồng độ Tyrothricin khoảng 50 $\mu\text{g/ml}$. Tiếp tục pha loãng bằng ethanol được dung dịch thử làm việc có nồng độ Tyrothricin khoảng 2,00 $\mu\text{g/ml}$.

- Tiến hành chuẩn bị 3 mẫu thử độc lập, pha các mẫu thử để có nồng độ làm việc tương đương nhau.

* Chuẩn bị dung dịch placebo làm việc:

- Tiến hành pha tương tự như pha dung dịch thử làm việc thay thế chế phẩm bằng lượng placebo tương ứng được dung dịch placebo làm việc.

3.1.3. Tiến hành

- Chuẩn bị 25 ống thủy tinh vô khuẩn, nắp kín, kích thước 1,6 cm $\times$ 20 cm hoặc 1,8 cm $\times$ 20 cm.

- Trong điều kiện vô khuẩn:

+ Hút chính xác 9 ml hỗn dịch chủng làm việc vào 24 ống nghiệm, vừa hút vừa lắc đều hỗn dịch chủng làm việc.

+ Ống thử nghiệm mẫu chuẩn: Hút chính xác 100 μl dung dịch chuẩn làm việc có nồng độ 0,20 $\mu\text{g/ml}$ vào một ống nghiệm chứa hỗn dịch chủng làm việc, tiến hành lặp lại trên 3 ống, lắc đều. Tiếp tục làm tương tự với các dung dịch chuẩn làm việc có nồng độ 0,32; 0,40; 0,48; 0,60 $\mu\text{g/ml}$.

+ Ống thử nghiệm mẫu thử: Hút chính xác 100 μl dung dịch thử làm việc vào một ống nghiệm chứa hỗn dịch chủng làm việc, tiến hành lặp lại trên 3 ống, lắc đều. Tiếp tục làm tương tự với các dung dịch mẫu thử còn lại.

+ Ống thử nghiệm mẫu trắng: Hút chính xác 100 μl ethanol vào một ống nghiệm chứa 9 ml môi trường số 3, lắc đều (mẫu trắng).

+ Nuôi cấy các ống nghiệm trong bể ổn nhiệt ở nhiệt độ $37^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ trong 4 đến 5 giờ, mỗi 2 giờ lắc đều các ống nghiệm.

- Sau thời gian nuôi cấy, dùng thử nghiệm bằng cách thêm vào mỗi ống 0,15 ml formaldehyd, lắc nhẹ.

- Đo độ truyền qua của các ống thử nghiệm ở bước sóng 530 nm so với mẫu trắng. Lắc đều các ống thử

nghiệm trước khi đo quang, chờ 10 giây để hỗn dịch ổn định rồi tiến hành đo.

- Phân tích số liệu thu được bằng phương pháp thống kê theo chuyên luận định lượng kháng sinh bằng phương pháp vi sinh vật trong USP 42, *Antibiotics-Microbial Assays* <81>.

- Từ phương trình đường chuẩn, tính nồng độ Gramicidin trong mẫu thử, sau đó lấy kết quả này nhân với 5 thu được nồng độ Tyrothricin trong mẫu thử.

3.2. Thẩm định phương pháp

- Tiến hành thẩm định các chỉ tiêu: Độ đặc hiệu, độ tuyến tính, độ đúng, khoảng xác định, độ chính xác.

3.2.1. Độ tuyến tính

- Sấy chất chuẩn Gramicidin với điều kiện áp suất 5 mm Hg, ở 60°C, trong 3 giờ

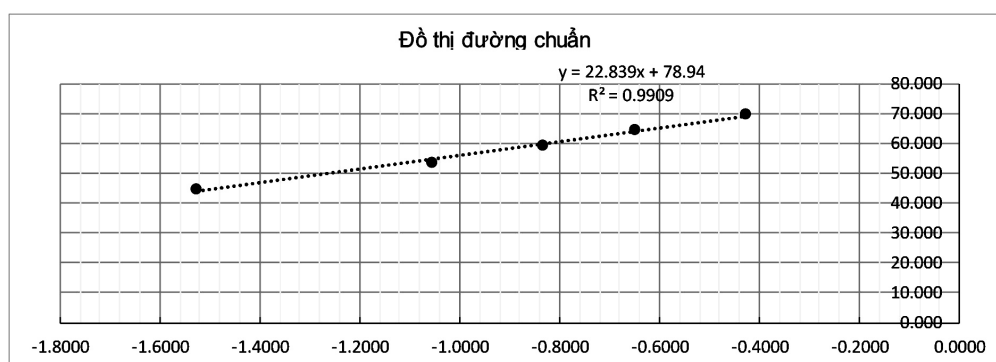
- Chuẩn bị dung dịch chuẩn Gramicidin: Cân chính xác 0,0518 g chất chuẩn Gramicidin USP RS pha vừa đủ 50 ml trong ethanol thu được dung dịch chuẩn gốc có nồng độ Gramicidin 1086,8 µg/ml. Bảo quản dung dịch chuẩn gốc ở 2 - 8 °C trong 30 ngày. Tiếp tục pha loãng từ dung dịch chuẩn gốc bằng ethanol thu được các dung dịch chuẩn làm việc S1, S2, S3, S4, S5 có nồng độ Gramicidin 0,2174 µg/ml, 0,3478 µg/ml, 0,4347 µg/ml, 0,5217 µg/ml, 0,6521 µg/ml.

Tiếp tục tiến hành theo qui trình như trong mục 3.1.3.

Kết quả được báo cáo trong Bảng 1.

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

Nồng độ (µg/ml)		0,2174	0,3478	0,4347	0,5217	0,6521
Logarit nồng độ (Ln)		-1,5260	-1,0561	-0,8331	-0,6507	-0,4276
Độ truyền qua của các ống chứa các dung dịch chuẩn (%)	1	45,516	53,987	58,744	65,255	69,780
	2	45,010	54,167	59,667	64,168	69,405
	3	44,345	52,419	59,443	64,354	69,968
Độ truyền qua trung bình		44,957	53,524	59,285	64,592	69,718
Phương trình hồi quy tuyến tính $y = 22,839x + 78,94$ Hệ số tương quan $r = 0,995$						



Hình 1. Đồ thị biểu diễn mối tương quan giữa Logarit nồng độ của Gramicidin và độ truyền qua

Kết quả nghiên cứu cho thấy với các điều kiện định lượng đã chọn, trong khoảng nồng độ đã khảo sát, có sự tương quan tuyến tính chặt chẽ giữa logarit nồng độ Gramicidin và độ truyền qua với hệ số tương quan $r = 0,995$.

3.2.2. Độ đặc hiệu

- Chuẩn bị các dung dịch theo hướng dẫn trong mục 3.1.2 thu được dung dịch chuẩn S3 có nồng độ Gramicidin 0,3478 µg/ml, dung dịch thử làm việc có nồng độ Tyrothricin khoảng 2,00 µg/ml, dung dịch placebo làm việc tương ứng.

- Tiếp tục tiến hành theo qui trình ghi trong mục 3.1.3.

Kết quả được báo cáo trong Bảng 2.

Bảng 2. Kết quả thẩm định độ đặc hiệu của phương pháp

Ống	Độ truyền qua ở bước sóng 530 nm (%)			
	Mẫu chuẩn	Mẫu thử	Placebo	Mẫu trắng cây chứng
1	58,744	60,643	31,385	29,962
2	59,667	60,641	30,033	30,213
3	59,443	59,096	30,179	30,234
Trung bình	59,285	60,127	30,532	30,136

Kết quả nghiên cứu cho thấy các thành phần tá dược trong công thức thuốc, lượng dung môi ethanol để pha mẫu không ảnh hưởng đến sự phát triển của vi sinh vật chỉ thị. Khả năng ức chế sự phát triển của vi sinh vật chỉ thị là do kháng sinh có trong mẫu chuẩn và trong mẫu thử. Phương pháp đạt yêu cầu về tính đặc hiệu.

3.2.3. Độ đúng

- Sử dụng dung dịch chuẩn làm việc Gramicidin S_1 , S_2 , S_3 , S_4 , S_5 trong mục 3.2.1.

- Chuẩn bị dung dịch placebo gốc ($P_{gốc}$): Cân 2,5021 g placebo pha vừa đủ 50 ml ethanol thu được dung dịch $P_{gốc}$.

- Chuẩn bị dung dịch thử làm việc Tyrothricin: Cân chính xác khoảng 0,0466 g chuẩn làm việc

Tyrothricin pha vừa đủ 100 ml ethanol thu được dung dịch thử gốc ($T_{gốc}$) (527,978 $\mu\text{g/ml}$). Lấy 5 ml dung dịch $T_{gốc}$ pha vừa đủ 50 ml ethanol thu được dung dịch thử trung gian T_{tg} (52,798 $\mu\text{g/ml}$).

Lấy thể tích dung dịch T_{tg} phù hợp vào bình định mức 100 ml thêm 4 ml dung dịch placebo gốc ($P_{gốc}$), thêm ethanol vừa đủ đến vạch thu được dung dịch thử làm việc T có nồng độ Tyrothricin ở mức 80%, 100%, 125% so với nồng độ theo qui trình định lượng là 2,00 $\mu\text{g/ml}$. Tiếp tục tiến hành như quy trình ghi trong mục 3.1.3. Tính toán kết quả thử nghiệm theo USP 42, <81> Antibiotics- Microbiological Assays.

Kết quả được báo cáo ở Bảng 3.

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

Mức nồng độ	Mẫu thử	Nồng độ đã biết của dung dịch thử ($\mu\text{g/ml}$)	Nồng độ tìm lại của dung dịch thử ($\mu\text{g/ml}$)	Tỉ lệ tìm lại (%)	% Thu hồi trung bình
80%	1	1,6895	1,6908	100,1	100,9% RSD = 0,8%
	2	1,6895	1,7155	101,5	
	3	1,6895	1,7103	101,2	
100%	4	2,1119	2,1925	103,8	101,1% RSD = 2,6%
	5	2,1119	2,1290	100,8	
	6	2,1119	2,0818	98,6	
125%	7	2,6399	2,8141	106,6	103,0% RSD = 3,2%
	8	2,6399	2,6500	100,4	
	9	2,6399	2,6942	102,1	
Kết quả		% Thu hồi trung bình = 101,7%; RSD = 2,3%			

Kết quả cho thấy phương pháp đạt yêu cầu về độ đúng đối với phương pháp định lượng bằng vi sinh vật, với tỷ lệ thu hồi từ 98,6% đến 106,6% với RSD = 2,3%.

3.2.4. Khoảng xác định

Từ kết quả độ đúng suy ra khoảng xác định của phương pháp định lượng Tyrothricin bằng phương pháp đo độ đục là từ 1,6895 µg/ml đến 2,6399 µg/ml.

3.2.5. Độ lặp lại và độ chính xác trung gian

- Độ lặp lại của phương pháp được đánh giá trên độ lệch chuẩn tương đối của 6 mẫu thử nghiệm được

phân tích ghi trong mục 3.1.3.

- Độ chính xác trung gian được đánh giá dựa trên độ lệch chuẩn tương đối của 12 mẫu thử được phân tích bởi 2 kiểm nghiệm viên khác nhau.

- Kết quả khảo sát độ lặp lại và độ chính xác trung gian được thể hiện ở Bảng 4.

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

<i>KNV</i>	<i>Mẫu thử</i>	<i>Khối lượng mẫu thử (g)</i>	<i>Hàm lượng so với nhãn (%)</i>	<i>Phân tích thống kê</i>
KNV 1	1	2,5146	106,2	Hàm lượng trung bình = 105,1%; n = 6; RSD = 1,3%
	2	2,5241	102,7	
	3	2,5249	104,8	
	4	2,5312	104,6	
	5	2,5409	105,9	
	6	2,5263	106,4	
KNV 2	1	2,5062	102,3	Hàm lượng trung bình = 101,6%; n = 6; RSD = 1,5%
	2	2,5314	99,7	
	3	2,5421	103,0	
	4	2,5219	102,8	
	5	2,5334	102,2	
	6	2,5257	99,5	
Kết quả	Hàm lượng trung bình = 103,3%; n = 12; RSD = 2,2%			

Kết quả ở Bảng 4 cho thấy phương pháp có độ chính xác cao thể hiện độ lặp lại với $RSD \leq 1,5\%$, độ chính xác trung gian = 2,2%.

4. Kết luận

Qua khảo sát thực nghiệm, nhóm nghiên cứu đã xây dựng được quy trình xác định hoạt lực kháng sinh

Tyrothricin bằng phương pháp đo độ đục vi sinh vật trong chế phẩm dạng gel bôi da. Các kết quả thẩm định chứng tỏ phương pháp định lượng theo qui trình đưa ra có độ đặc hiệu, độ tuyến tính, độ lặp lại và độ chính xác trung gian và độ thu hồi tốt. Các điều kiện thử nghiệm có thể triển khai tại đa số các phòng thử nghiệm vi sinh.

Tài liệu tham khảo

- Bộ Y Tế (2017), *Dược điển Việt Nam*, Lần xuất bản thứ năm, Phụ lục 13.9 – Xác định hoạt lực thuốc kháng sinh bằng phương pháp thử vi sinh vật, tr. PL-318-327.
- British Pharmacopoeia Commission (2018), *British pharmacopoeia, Appendix XIV-A- Microbiological Assay of Antibiotics*, pp A410-A416.
- The United States Pharmacopeia 42 (2019), <81> Antibiotics- Microbiological Assays, pp. 6414-6442.

SUMMARY

Method was described for the extraction of Tyrothricin from gel products. The potency of Tyrothricin was demonstrated by Turbidimetric assay techniques. The method was validated in specificity, linear range, precision, accuracy and validation results proved that this method was suitable to assay Tyrothricin in gel products.

(Ngày nhận bài: 30/11/2019 ; Ngày phản biện: 20/02/2020 ; Ngày duyệt đăng: 17/06/2020)

ĐỊNH LƯỢNG CITICOLIN TRONG DUNG DỊCH UỐNG IFSAN BẰNG PHƯƠNG PHÁP SẮC KÝ LỎNG HIỆU NĂNG CAO

NGUYỄN THỊ HỒNG YẾN, NGUYỄN HỮU THẢO, TRẦN THỊ HỒNG ANH

Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương

Từ khóa: Citicolin, dung dịch uống Ifsan, định lượng, sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC).

1. Đặt vấn đề

Bệnh Alzheimer là một bệnh lý về não tác động đến trí nhớ, suy nghĩ và hành vi. Bệnh Alzheimer chiếm khoảng 60% đến 80% trong những bệnh làm suy giảm trí nhớ. Hiện tại, có hơn 5 triệu người Mỹ đang chung sống với bệnh Alzheimer [4]. Ở Việt Nam, tỷ lệ bệnh Alzheimer cũng đang gia tăng đáng kể trong những năm vừa qua [2]. Ngày nay, đã có nhiều hoạt chất được ứng dụng trong điều trị bệnh Alzheimer, trong đó có hoạt chất mới Citicolin (chưa có trong các Dược điển Mỹ (USP 42), Dược điển Anh (BP 2019), DDVN V, ...) đã được cấp phép và lưu hành trên thị trường dưới các dạng chế phẩm khác nhau. Hiện tại, trong Dược điển Trung Quốc 2015 [5] mới chỉ có chuyên luận nguyên liệu Citicolin natri và các dạng chế phẩm viên nén, thuốc tiêm mà chưa có chế phẩm dạng uống. Để đáp ứng nhu cầu kiểm tra chất lượng và góp phần nâng cao khả năng kiểm tra chất lượng thuốc, trong phạm vi bài viết này chúng tôi xin giới thiệu phương pháp định tính và định lượng Citicolin trong dung dịch uống Ifsan bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao.

2. Thực nghiệm

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

2.1.1. Thiết bị, dụng cụ

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

- Máy sắc ký lỏng Shimadzu LC 20A với detector DAD;

- Cột phân tích: Gemini Rp18 (250 x 4,6 mm; 5 µm);

- Cân phân tích: Mettler Toledo AG245;

- Máy lắc siêu âm;

- Bộ lọc dùng cho sắc ký, các dụng cụ thủy tinh chính xác khác,...

2.1.2. Hóa chất, chất chuẩn

- Kali dihydrophosphat (Scharlau, loại PA);

- Tetrabutylamoni hydroxyd loại dùng cho HPLC (Merck);

- Acid phosphoric (Scharlau, loại PA);

- Methanol loại dùng cho HPLC (Merck);

- Chất chuẩn Citicolin natri:

Nguồn gốc: Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương;

Lô SX: WS.0215298.02; Hàm lượng: 96,63% $C_{14}H_{25}N_4NaO_{11}P_2$ (nguyên trạng);

- Chất chuẩn 5' - Cytidylat:

Nguồn gốc: Dược điển Mỹ (USP);

Lô SX: FOJ 209; Hàm lượng: 99,6% (nguyên trạng);

- Nước cất dùng cho HPLC.

2.1.3. Đối tượng nghiên cứu

- Dung dịch uống IFSAN, số lô NC01. Công thức điều chế cho 100 ml như sau:

Citicolin (dạng Citicolin natri) 10 g;

Tá dược + Nước tinh khiết vừa đủ 100 ml.

- Mẫu placebo: Là lô mẫu giả được được chuẩn bị như một lô mẫu thử nhưng không có thành phần Citicolin natri.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Điều kiện sắc ký

Trên cơ sở tham khảo một số tài liệu [1],[3],[5],[6] và các trang thiết bị có sẵn, chúng tôi đã tiến hành khảo sát thành phần pha động, cột, gradient dung môi, tốc độ dòng,... để xây dựng chương trình sắc ký như sau:

- Cột Gemini RP18 (250 x 4,6 mm; 5 µm);

- Detector UV: 276 nm;

- Thể tích tiêm mẫu: 10 µl;

- Tốc độ dòng: 1,0 ml/phút;

- Pha động: Dung dịch đệm pH 4,5 - Methanol (95 : 5);

(Dung dịch đệm pH 4,5: Hỗn hợp dung dịch kali dihydrophosphat 0,1M - tetrabutylamoni hydroxyd 0,01M (1:1). Điều chỉnh pH hỗn hợp này đến 4,5 bằng acid phosphoric);

- Dung môi pha mẫu: nước cất.

2.2.2. Phương pháp chuẩn bị mẫu

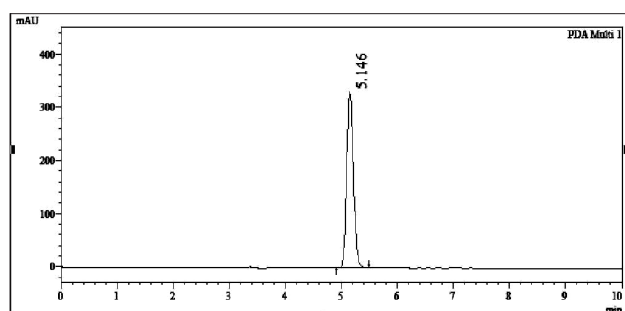
- *Dung dịch chuẩn 5' - Cytidylat*: Cân chính xác khoảng 25 mg chất chuẩn 5' - Cytidylat vào bình định mức 100 ml, hòa tan trong nước, thêm nước vừa đủ, lắc đều (dung dịch này có nồng độ 0,25 mg/ml).

- *Dung dịch chuẩn*: Cân chính xác khoảng 130 mg chất chuẩn Citicolin natri (tương ứng khoảng 125 mg Citicolin) vào bình định mức 50 ml, thêm 30 ml nước, lắc để hòa tan, thêm nước vừa đủ đến vạch, lắc đều. Hút chính xác 5,0 ml dung dịch thu được vào bình định mức 50 ml, thêm nước vừa đủ, lắc đều. Lọc qua màng lọc 0,45 μ m.

- *Dung dịch thử*: Hút chính xác 5,0 ml chế phẩm vào bình định mức 200 ml, thêm nước vừa đủ, lắc đều. Hút chính xác 5,0 ml dung dịch thu được vào bình định mức 50 ml, thêm nước vừa đủ, lắc đều. Lọc qua màng lọc 0,45 μ m.

- *Dung dịch phân giải*: Hút đồng thể tích dung dịch chuẩn 5' - Cytidylat và dung dịch chuẩn, lắc đều. Lọc qua màng lọc 0,45 μ m.

- *Dung dịch placebo*: Hút chính xác 5,0 ml mẫu placebo vào bình định mức 200 ml, thêm nước vừa đủ, lắc đều. Hút chính xác 5,0 ml dung dịch thu được vào bình định mức 50 ml, thêm nước vừa đủ, lắc đều. Lọc qua màng lọc 0,45 μ m.



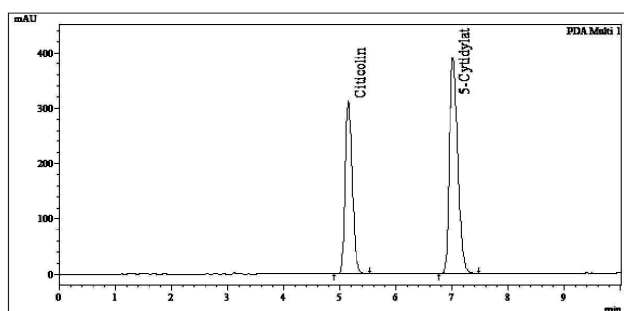
Hình 2. Sắc ký đồ dung dịch chuẩn

Tiêm riêng rẽ 10 μ l dung dịch chuẩn, dung dịch thử, dung dịch phân giải, dung dịch placebo vào hệ thống sắc ký. Ghi lại sắc ký đồ và đáp ứng của pic chính trong dung dịch chuẩn, dung dịch phân giải và dung dịch thử.

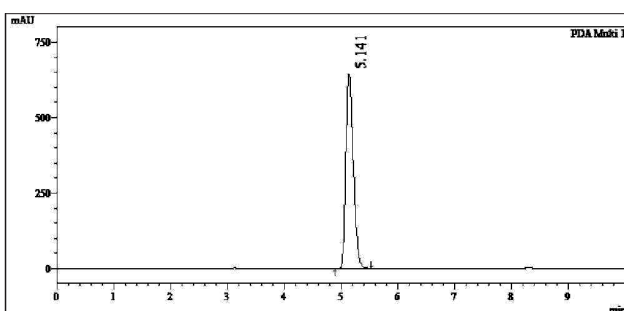
3. Kết quả và bàn luận

3.1. Lựa chọn điều kiện sắc ký

Sau khi thay đổi các điều kiện sắc ký khác nhau với các khảo sát như thay đổi cột, thay đổi pha động, tốc độ dòng,...chúng tôi đã lựa chọn được điều kiện sắc ký như đã nêu ở phần 2.2.1. Trên sắc ký đồ thu được của dung dịch phân giải thể hiện ở Hình 1, chúng tôi thấy 2 pic Citicolin và 5' - Cytidylat tách nhau rõ ràng, pic đối xứng và gọn, thời gian phân tích phù hợp (khoảng 10 phút). Trên sắc ký đồ thu được của dung dịch chuẩn và dung dịch thử (Hình 2 và Hình 3) đều cho 1 pic đối xứng, có thời gian lưu tương ứng nhau. Như vậy việc lựa chọn các điều kiện sắc ký là phù hợp.



Hình 1. Sắc ký đồ dung dịch phân giải



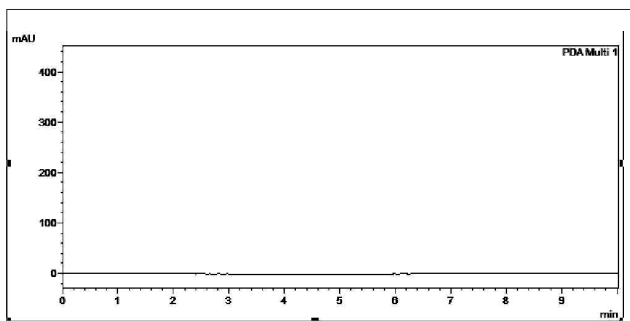
Hình 3. Sắc ký đồ dung dịch thử

3.2. Đánh giá phương pháp

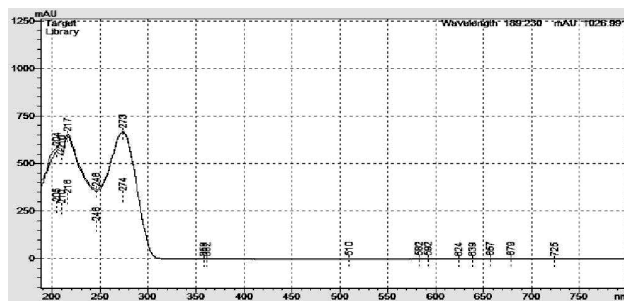
3.2.1. Khảo sát tính đặc hiệu

Tiêm lần lượt các mẫu: Dung môi pha mẫu, dung dịch placebo, dung dịch phân giải, dung dịch chuẩn và dung dịch thử vào hệ thống sắc ký. Trên sắc ký đồ dung môi pha mẫu và dung dịch placebo không có pic

ở thời gian lưu tương ứng với pic Citicolin (khoảng 5,12 phút) (Hình 4). Quét phổ tử ngoại khả kiến của dung dịch chuẩn và dung dịch thử với detector PDA cho thấy quang phổ hấp thụ tử ngoại khả kiến của hoạt chất Citicolin trong dung dịch thử giống với quang phổ hấp thụ tử ngoại khả kiến của hoạt chất trong dung dịch chuẩn, hệ số trùng phổ đều xấp xỉ 1,0 (Hình 5).



Hình 4. Sắc ký đồ dung dịch placebo



Hình 5. Hình ảnh trùng phổ UV-VIS của pic Citicolin của dung dịch thử và chuẩn

Với các điều kiện sắc ký như trên và từ các kết quả thu được đã chứng tỏ phương pháp là đặc hiệu để phân tích định tính và định lượng hoạt chất Citicolin.

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 dung dịch phân giải và tiêm

lập lại 6 lần dung dịch chuẩn có nồng độ Citicolin khoảng 0,25 mg/ml. Ghi lại các giá trị về thời gian lưu, diện tích pic, hệ số đối xứng và số đĩa lý thuyết của pic Citicolin, hệ số phân giải giữa pic Citicolin và pic 5' – Cytidylat.

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

Bảng 1. Khảo sát tính thích hợp của hệ thống sắc ký

STT	Thời gian lưu (phút)	Diện tích pic (mAU.s)	Hệ số đối xứng (T)	Số đĩa lý thuyết (N)	Hệ số phân giải (R_s)
1	5,112	2697166	1,219	5983	6,9
2	5,115	2696688	1,197	5949	
3	5,113	2692757	1,203	5794	
4	5,116	2698663	1,212	5664	
5	5,120	2700150	1,222	5732	
6	5,107	2691352	1,212	5825	
Trung bình	5,114	2696129,33	1,21	5824	
RSD (%)	0,09	0,13			

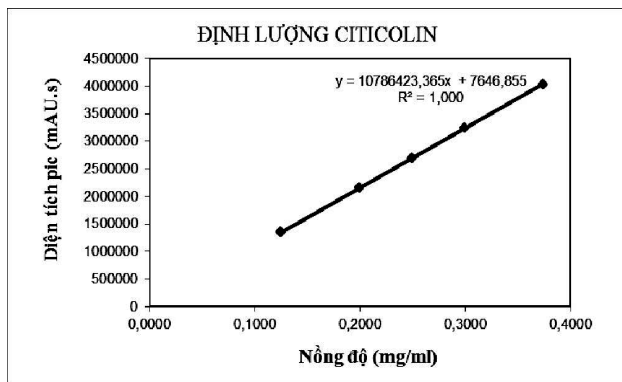
Các số liệu thu được ở Bảng 1 cho thấy hệ thống sắc ký trên phù hợp cho việc phân tích định tính và định lượng Citicolin trong chế phẩm (RSD của thời gian lưu < 1,0%; RSD của diện tích pic < 2,0%; Hệ số đối xứng (T) < 2,0; Số đĩa lý thuyết (N) > 2000; Hệ số phân giải (R_s) > 3,0).

3.2.3. Khảo sát khoảng tuyến tính

Khảo sát trên 5 dung dịch chuẩn Citicolin với 5 nồng độ từ 0,1247 – 0,3740 mg/ml, kết quả được ghi trong Bảng 2 và Hình 6.

Bảng 2. Kết quả khảo sát khoảng tuyến tính của Citicolin

Dung dịch	1	2	3	4	5
Nồng độ (mg/ml)	0,1247	0,1994	0,2493	0,2992	0,3740
Diện tích pic (mAU.s)	1350060	2159806	2696983	3238959	4037703
Kết quả	Phương trình hồi qui: $y = 10786423,36 x + 7646,86$ Hệ số tương quan tuyến tính: $r = 1,000$				



Hình 6. Đồ thị khảo sát khoảng tuyến tính của Citicolin

Với điều kiện sắc ký đã chọn, trong khoảng nồng độ đã khảo sát, có sự tương quan tuyến tính chặt chẽ giữa nồng độ và diện tích pic đáp ứng với $r = 1,000$.

Bảng 3. Kết quả khảo sát độ chính xác của phương pháp

STT	Kiểm nghiệm viên 1 (Ngày 1)			Kiểm nghiệm viên 2 (Ngày 2)		
	Lượng cân chuẩn: 134,81 (mg) Diện tích pic chuẩn: 2696129,33 (mAU.s)			Lượng cân chuẩn: 134,24 (mg) Diện tích pic chuẩn: 2681682,67 (mAU.s)		
	Lượng mẫu thử (ml)	Diện tích pic (mAU.s)	Hàm lượng (%)	Lượng mẫu thử (ml)	Diện tích pic (mAU.s)	Hàm lượng (%)
1	5,0	2716311	100,47	5,0	2699797	100,18
2	5,0	2717401	100,51	5,0	2704993	100,37
3	5,0	2716834	100,49	5,0	2704081	100,34
4	5,0	2713843	100,38	5,0	2706418	100,42
5	5,0	2721110	100,65	5,0	2702635	100,28
6	5,0	2715146	100,43	5,0	2701428	100,24
Trung bình = 100,49%; n = 6; RSD = 0,09%				Trung bình = 100,30%; n = 6; RSD = 0,09%		
Trung bình = 100,40%; n=12; RSD = 0,13%						

Với điều kiện sắc ký đã chọn, phương pháp có độ chính xác trung gian tốt, RSD với 12 mẫu thử của 2 kiểm nghiệm viên là 0,13% (nhỏ hơn 3,0%), có thể áp dụng để định tính và định lượng các mẫu thành phẩm.

3.2.5. Khảo sát độ đúng

Độ đúng được xác định bằng phương pháp thêm chuẩn. Cân một lượng chính xác chất chuẩn Citicolin natri khoảng 208 mg, 260 mg và 312 mg (tương ứng với khoảng 200 mg, 250 mg và 300 mg Citicolin) và 2,5 ml mẫu placebo vào bình định mức 100 ml, thêm nước vừa đủ đến vạch, lắc đều. Pha loãng 5,0 ml dung dịch này thành 50,0 ml bằng nước, thu được các dung dịch có nồng độ tương ứng 80%, 100%, 120% so với nồng độ định lượng. Mỗi mức nồng độ tiến hành 3 mẫu độc lập. Tiến hành sắc ký theo điều kiện đã ghi ở mục 2.2.1 và ghi lại diện tích pic, tính lượng hoạt chất thu hồi với dung dịch chuẩn ở mục 3.2.1. Khảo sát tính đặc hiệu. Kết quả khảo sát độ đúng được thể hiện ở Bảng 4.

3.2.4. Khảo sát độ chính xác

3.2.4.1. Khảo sát độ lặp lại

Khảo sát thực nghiệm trên chế phẩm dung dịch uống IFSAN với các điều kiện sắc ký và cách xử lý mẫu như ở mục 2.2.1 và 2.2.2, lặp lại thí nghiệm 6 lần, kết quả được trình bày trong Bảng 3 (ngày 1). Như vậy phương pháp có độ lặp lại trong ngày tốt với RSD là 0,09% (nhỏ hơn 2,0%).

3.2.4.2. Khảo sát độ chính xác trung gian

Xác định độ chính xác trung gian bằng cách xác định hàm lượng hoạt chất trong các mẫu thử bởi kiểm nghiệm viên khác, tiến hành thử nghiệm với điều kiện thực nghiệm tại thời điểm khác nhau với các điều kiện sắc ký và cách xử lý mẫu như ở mục 2.2.1 và 2.2.2, lặp lại thí nghiệm 6 lần, kết quả được trình bày trong Bảng 3 (ngày 2).

Bảng 4. Kết quả khảo sát độ đúng của phương pháp.

STT	Lượng Citicolin chuẩn thêm vào (mg)	Diện tích pic (mAU.s)	Lượng Citicolin tìm lại (mg)	% Citicolin tìm lại	% Thu hồi trung bình
1	208,82	2159585	208,69	99,94	TB = 100,07%; RSD = 0,25%
2	209,18	2162754	208,99	99,91	
3	207,96	2159634	208,69	100,35	
4	259,30	2694915	260,42	100,43	TB = 100,51%; RSD = 0,46%
5	258,18	2698625	260,77	101,01	
6	260,46	2697743	260,69	100,09	
7	314,66	3240970	313,18	99,53	TB = 99,28%; RSD = 0,25%
8	316,02	3238818	312,98	99,04	
9	314,90	3234794	312,59	99,27	

Kết quả khảo sát cho thấy phương pháp có độ đúng cao với tỷ lệ tìm lại từ 99,04% đến 101,01% nằm trong khoảng từ 98,0% - 102,0%, đảm bảo tốt cho việc định lượng Citicolin trong chế phẩm.

3.2.6. Khoảng xác định

Kết quả đánh giá độ đúng, độ chính xác, ở các mức nồng độ 80%, 100% và 120% so với nồng độ định lượng, hàm lượng hoạt chất đảm bảo khả năng tìm lại, độ chính xác và nằm trong khoảng tuyến tính. Vậy khoảng xác định của phương pháp là từ 80% đến 120% so với nồng độ định lượng.

4. Kết luận

Qua khảo sát thực nghiệm, chúng tôi đã lựa chọn được một hệ sắc ký lỏng hiệu năng cao để định lượng Citicolin trong chế phẩm dung dịch uống. Phương pháp có tính đặc hiệu, có sự tương quan tuyến tính chặt chẽ giữa diện tích pic đáp ứng và nồng độ hoạt chất, độ lặp lại, độ chính xác trung gian tốt và độ đúng cao với các điều kiện trang thiết bị, hóa chất thuốc thử phù hợp với đa số các phòng thí nghiệm. Với các kết quả thu được, chúng tôi đề nghị có thể áp dụng phương pháp định lượng đã nghiên cứu cho chế phẩm dung dịch uống chứa thành phần Citicolin.

Tài liệu tham khảo

- Bộ Y tế (2017), *Dược điển Việt Nam*, Lần xuất bản thứ năm, NXB Y học, Hà Nội, Phụ lục 5.3 “*Phương pháp sắc ký lỏng*”.
- Thế giới tiếp thị Online - www.thegioitietpht.vn/benh-alzheimer-dang-gia-tang-dang-ke-o-viet-nam.
- Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương (2010), *Đảm bảo chất lượng thuốc và một số phương pháp kiểm nghiệm thuốc*, Tài liệu đào tạo.
- Alzheimer’s Association - www.alz.org/asian/about/what_is_alzheimers.asp.
- China Medical Science Press (2015), “Citicoline Sodium Injection”, *Pharmacopoeia of The People’s Republic of China*, Volume 2, pp. 389-390.
- H. K. Maradiya and Vasundhara H. Pansara (2013), “Development and Validation of Reverse-phase High-performance Liquid Chromatography Method for Estimation of Citicoline Sodium in Bulk and Dosage Form”, *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 75(2), pp. 238-241.

SUMMARY

An HPLC method for determination of Citicoline in oral solution is introduced:

The chromatographic condition is programmed as follows:

- Mobile phase: pH 4.5 Buffer solution - Methanol (95 : 5) (pH 4.5 Buffer solution: a mixture of equal volume of 0.1M Potassium dihydrogen phosphat solution and 0.1M Tetrabutylammonium hydroxide solution, adjusted with Phosphoric acid to a pH of 4.5).

- Detector UV: 276 nm

- Column: Gemini RP18 (250 x 4.6 mm; 5 µm)

- Flow rate: 1.0 ml/min

- Injection volume: 10 µl

The method was validated about the specificity, system suitability, linear range, precision, accuracy and validation results proved that this method was suitable for determination of Citicoline in oral solution.

(Ngày nhận bài: 14/11/2019 ; Ngày phản biện: 14/02/2020 ; Ngày duyệt đăng: 24/03/2020)

DANH MỤC THUỐC KHÔNG ĐẠT CHẤT LƯỢNG ĐÃ ĐƯỢC BỘ Y TẾ XỬ LÝ TỪ 01/12/2019 ĐẾN 31/05/2020

HÀ THỊ MINH CHÂU
Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương

Để tăng cường giám sát các cơ sở sản xuất, kinh doanh trong việc thực hiện thu hồi thuốc vi phạm chất lượng, đồng thời giúp cho các đồng nghiệp có thêm thông tin về những hoạt chất và các tên thuốc cần lưu ý về chất lượng, chúng tôi tập hợp danh mục các thuốc vi phạm chất lượng từ 01/12/2019 đến 31/05/2020 mà Bộ Y tế đã ra văn bản thông báo thuốc giả, thuốc bị thu hồi, rút số đăng ký của thuốc và đình chỉ lưu hành: 30 thuốc bị đình chỉ và thu hồi; phát hiện 01 thuốc giả.

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

Danh mục đình chỉ lưu hành thuốc từ ngày 01/12/2019 đến ngày 31/05/2020

STT	Tên thuốc	Số lô	Ngày sản xuất	Hạn dùng	Số đăng ký	Tên cơ sở sản xuất	Tên cơ sở đơn vị nhập khẩu	Chỉ tiêu không đạt	Văn bản xử lý	Hình thức xử lý
1	Viên nén LIV-Z Tablets (Levocetirizine dihydroclorid 5mg)	MYTHB1801	06/03/2018	05/03/2020	VN-18014-14	Maxtar Bio-Genics (India)	Công ty Cổ phần Dược liệu Trung ương 2 (Phytopharma)	Định lượng	Công văn: số 20787/QLD-CL ngày 11/12/2019	Đình chỉ lưu hành và thu hồi toàn quốc
2	Viên nang mềm Actiso PV	0117	24/10/2017	23/10/2020	VD-18159-17	Công ty Cổ phần Dược phẩm Phúc Vinh		Độ rắn	Công văn: số 21263/QLD-CL ngày 18/12/2019	Đình chỉ lưu hành và thu hồi trên địa bàn tỉnh Thanh Hóa
3	Viên nén CELOGOT	190084	20/03/2019	19/03/2022	VN-19909-16	Celogen Pharma Pvt., Ltd. (India)	Công ty TNHH Thương mại Dược phẩm Trần Thắng	Định lượng	Công văn: số 21496/QLD-CL ngày 26/12/2019	Đình chỉ lưu hành và thu hồi trên địa bàn thành phố Hà Nội
4	Thuốc Cốm Trẻ Việt	150719	15/07/19	15/01/21	NC56-H09-19	Viện Dược liệu		- Kích thước hạt - Đồng đều khối lượng - Giới hạn độ nhiễm khuẩn	Công văn: số 56/QLD-CL ngày 08/01/2020	Đình chỉ lưu hành và thu hồi trên địa bàn tỉnh Yên Bái
5	Viên nén bao phim Ibufadi (Ibuprofen 400mg)	151018	30/10/2018	30/10/2021	VD-28797-18	Công ty Cổ phần Dược Hà Tĩnh		Độ hòa tan	Công văn: số 117/QLD-CL ngày 09/01/2020	Đình chỉ lưu hành và thu hồi trên địa bàn tỉnh Thanh Hóa

6	Viên nén Young II Captopril Tablet (Captopril 25 mg)	1802		29/6/2020	VN-20970-18	Young II Pharm. Co., Ltd. (Korea)	Công ty TNHH MTV Dược Sài Gòn (Sapharco)	- Định lượng - Giới hạn Captopril disulfid - Độ đồng đều đơn vị phân liều	Công văn: số 235/QLD- CL ngày 13/01/2020	Đình chỉ lưu hành và thu hồi toàn quốc
7	Viên nén bao phim Buclapoxime (Cefpodoxime proxetil Tablets USP 200 mg)	BCT1018003		09/10/2020	VN-17278-13	Brawn Laboratories Ltd. (An Độ)	Công ty TNHH Nutri Pharma USA	Định lượng	Công văn: số 838/QLD- CL ngày 22/01/2020	Đình chỉ lưu hành và thu hồi toàn quốc
8	Thuốc tiêm B-Comene (Vitamin B complex)	190813	13/8/2019	12/08/2022	VN-18188-14	Zhangjiakou Kaiwei Pharmaceutical Co., Ltd. (Trung Quốc)	Công ty Cổ phần Dược Trung ương Mediplantex	Định lượng Pyridoxin hydroclorid và Calci panitotenat	Công văn: số 950/QLD- CL ngày 05/02/2020	Đình chỉ lưu hành và thu hồi trên địa bàn thành phố Hà Nội
9	Viên nén Piracetam (Piracetam 800mg)	071019	23/10/2019	23/10/2022	VD-22578-15	Công ty Cổ phần Dược Vật tư Y tế Thái Bình		Đồng đều khối lượng	Công văn: số 1238/ QLD-CL ngày 07/02/2020	Đình chỉ lưu hành và thu hồi trên địa bàn thành phố Hà Nội
10	Viêm da Bảo Phương	110619	26/6/2019	26/6/2022	V43-H12-16	Cơ sở sản xuất thuốc y học cổ truyền Bảo Phương		- Định tính Khương hoàng - Định lượng Berberin clorid - Giới hạn nhiễm khuẩn	Công văn: số 1980/QLD-CL và công văn số 65/YHCT-QLD, ngày 10/2/2020	Đình chỉ lưu hành và thu hồi trên địa bàn thành phố Hà Nội
11	Tư Âm Bồ Thận Đại Hồng Phúc	04D19	15/06/2019	15/06/2022	V611-H12-10	Công ty TNHH Y học cổ truyền Đại Hồng Phúc		Định tính Phục Linh	Công văn: số 66/YHCT- QLD ngày 10/02/2020	Đình chỉ lưu hành và thu hồi trên địa bàn thành phố Hà Nội
12	Thuốc Cốm Trẻ Việt	150719	15/07/19	15/07/21	NC56-H09-19	Viện Dược liệu		- Kích thước hạt - Đồng đều khối lượng - Giới hạn độ nhiễm khuẩn	Công văn: số 2240/ QLD-CL ngày 10/03/2020	Đình chỉ lưu hành và thu hồi toàn quốc
13	Viên hoàn cứng phong tê thấp Bà Giăng	05.03.2018		03/2020	V23-H12-16	Cơ sở sản xuất thuốc y học cổ truyền Bà Giăng		Độc tính bất thường	Công văn: số 169/YHCT- QLD ngày 19/03/2020	Đình chỉ lưu hành và thu hồi trên địa bàn tỉnh Bà Rịa - Vũng Tàu

14	Viên nén Alsoben (Misoprostol 200 mcg)	190020	14/03/2019	13/03/2022	VN-8946-09	Unimed Pharmaceuticals Inc. Korea	Công ty TNHH Sinh dược phẩm Hera	- Độ hòa tan - Độ đồng đều hàm lượng - Định lượng	Công văn: số 2899/QLD-CL ngày 27/03/2020	Đình chỉ lưu hành và thu hồi toàn quốc
15	Thuốc tiêm B-Comene (Vitamin B complex)	190813	13/8/2019	12/08/2022	VN-18188-14	Zhangjiakou Kaiwei Pharmaceutical Co., Ltd. (Trung Quốc)	Công ty Cổ phần Dược Trung ương Mediplantex	Định lượng Pyridoxin hydrochlorid và Calci pantothenat	Công văn: số 2808/QLD-CL ngày 25/03/2020	Đình chỉ lưu hành và thu hồi toàn quốc
16	Viên hoàn cứng Hoa Việt vị quần thống	010819	26/08/2019	26/08/2021	V12-H12-16	Cơ sở sản xuất thuốc y học cổ truyền Hoa Việt		Định tính Mộc hương và Bán hạ	Công văn: số 2809/QLD-CL ngày 25/03/2020	Đình chỉ lưu hành và thu hồi toàn quốc
17	Viên nang cứng Chloramphenicol 250mg	0218	17/5/2018	17/5/2021	VD-24891-16	Công ty Cổ phần Dược phẩm và Sinh học y tế		Độ hòa tan	Công văn: số 2865/QLD-CL ngày 26/03/2020	Đình chỉ lưu hành và thu hồi toàn quốc
18	Viên nén Clorocid TW3 (Cloramphenicol 250mg)	Tất cả các lọ đóng gói dạng lọ			VD-25305-16	Công ty Cổ phần Dược phẩm Trung ương 3		Thuốc có nguy cơ làm giả nhiều trên thị trường	Công văn: số 3028/QLD-CL ngày 31/03/2020	Đình chỉ lưu hành và thu hồi toàn quốc
19	Viên nén nhai Incepan 400 Chewable Tablet (Albendazole 400 mg)	18003	NOV 18	OCT 21	VN-17916-14	Incepta Pharmaceuticals Ltd. (Bangladesh)	Công ty TNHH Thương mại DMP Nam Phương	Độ hòa tan	Công văn: số 3425/QLD-CL ngày 08/04/2020	Đình chỉ lưu hành và thu hồi toàn quốc
20	Viên nén vitamin B1 250 mg (Thiamin mononitrat 250 mg)	0319	240319	230322	VD-15756-11	Công ty Cổ phần Dược phẩm Quảng Bình		Độ tan rã	Công văn: số 3594/QLD-CL ngày 10/04/2020	Đình chỉ lưu hành và thu hồi trên địa bàn tỉnh Bà Rịa Vũng Tàu
21	Viên nang cứng Clorocid TW3 250mg (Cloramphenicol 250mg)	0319	150719	150722	VD-20846-14	Công ty Cổ phần Dược phẩm Trung ương 3		Tạp chất liên quan	Công văn: số 3679/QLD-CL ngày 13/04/2020	Đình chỉ lưu hành và thu hồi trên địa bàn tỉnh Bắc Kạn
22	Viên nén ALZYLTEX (Cetirizin 2HCl 10mg)	0219	220319	220323	VD-30582-18	Công ty Cổ phần Dược phẩm và Sinh học Y tế		Độ hòa tan	Công văn: số 4693/QLD-CL ngày 22/04/2020	Đình chỉ lưu hành và thu hồi trên địa bàn thành phố Hạ Long, tỉnh Quảng Ninh

23	Dekasiam (Acid acetylsalicylic 100mg)	101218		13/12/2020	VD-22510-15	Công ty Cổ phần Dược phẩm Sao Kim		- Độ hòa tan - Tạp chất liên quan - Định lượng	Công văn: số 5555/ QLD-CL ngày 04/05/2020	Đình chỉ lưu hành và thu hồi trên địa bàn toàn quốc
24	Viên nén Renapril 10 mg (Enalapril maleat 10 mg)	279318	280818	280820	VN-18124-14	Balkanpharma - Dupnitsa AD (Bulgaria)	Công ty Cổ phần Xuất nhập khẩu Y tế TP. Hồ Chí Minh (Yiteco)	Tạp chất liên quan	Công văn: số 5576/ QLD-CL ngày 04/05/2020	Đình chỉ lưu hành và thu hồi trên địa bàn toàn quốc
25	Viên nang mềm Vitamin A&D (Vitamin A 5000 IU Vitamin D3 400 IU)	170618		23/06/20	VD-16285-12	Công ty Cổ phần Dược phẩm Trung ương Vidipha		Định lượng vitamin A	Công văn: số 5577/ QLD-CL ngày 04/05/2020	Đình chỉ lưu hành và thu hồi trên địa bàn toàn quốc
26	Viên nén Bài Thạch	270819	30/08/2019	30/08/2022	VD-19811-13	Công ty Cổ phần Dược Danapha		Giới hạn nhiễm khuẩn	Công văn: số 6477/ QLD-CL ngày 21/05/2020	Đình chỉ lưu hành và thu hồi trên địa bàn thành phố Hà Nội
27	Siro thuốc ho Bạch Ngân PV	010120	06/01/2020	05/01/2023	VD-27167-17	Công ty Cổ phần Dược Phúc Vinh		Định tính Bách Bộ	Công văn: số 6478/ QLD-CL ngày 21/05/2020	Đình chỉ lưu hành và thu hồi trên địa bàn Đà Nẵng
28	Viên nén bao phim Tormeg-20 (Atorvastatin 20mg)	0807065	22/10/2018	22/10/2020	VN-18783-15	Pharmathen S.A, Greece	Chi nhánh Công ty Cổ phần Dược phẩm TBYT Hà Nội (Hapharco)	Định lượng	Công văn: số 6518/ QLD-CL ngày 22/05/2020	Đình chỉ lưu hành và thu hồi trên địa bàn thành phố Hồ Chí Minh
29	Cốm pha dung dịch uống Exomuc®	3684	23/10/2018	23/10/2021	VN-15149-12	Sophartex (France)	Công ty Cổ phần Dược phẩm Tedis - Việt Hà	Định lượng	Công văn: số 6519/ QLD-CL ngày 22/05/2020	Đình chỉ lưu hành và thu hồi trên địa bàn thành phố Hà Nội
30	Viên nén Captopril (Captopril 25 mg)	0119	22/02/2019	22/02/2022	VD-20545-14	Công ty Cổ phần Dược phẩm và Sinh học Y tế			Công văn: số 6526/ QLD-CL ngày 25/05/2020	Đình chỉ lưu hành và thu hồi trên địa bàn toàn quốc

Danh mục thuốc giả từ ngày 01/12/2019 đến ngày 31/5/2020

STT	Tên thuốc	Số lô	Ngày sản xuất	Hạn dùng	Số đăng ký GP nhập khẩu	Tên cơ sở sản xuất và đơn vị nhập khẩu ghi trên nhãn	Văn bản xử lý
1	Tanganil	1916018	29/04/2019	29/04/2022		Pierre Fabre Medicament Production	Công văn: số 21261/QLD-CL ngày 18/12/2019

MỤC LỤC

Trang

● *Nghiên cứu khoa học*

- Xây dựng và thẩm định quy trình định tính, định lượng nguyên liệu Monotropein bằng phương pháp HPLC.
BẠCH THỊ THẨM, TRẦN THỊ THU TRANG, NGUYỄN TUẤN ANH, PHẠM VĂN KIẾN, TRẦN VIỆT HÙNG, ĐOÀN CAO SƠN 1
 - Xây dựng và thẩm định phương pháp HPLC để xác định tạp chất liên quan trong viên Venlafaxin giải phóng kéo dài.
NGUYỄN VĂN HÀ, VŨ THỊ THU GIANG, NGUYỄN THỊ THANH HUYỀN, ĐOÀN CAO SƠN 6
 - Nghiên cứu định lượng Tenofovir trong huyết tương người bằng phương pháp LC-MS/MS.
TẠ MẠNH HÙNG, HOÀNG VĂN ĐỨC, DƯƠNG ÁNH HIỆP, ĐOÀN CAO SƠN 13
 - Nghiên cứu xác định hoạt lực kháng sinh Tyrothricin bằng phương pháp đo độ đục vi sinh vật.
NGUYỄN THỊ THU HƯỜNG, TRỊNH THỊ PHƯƠNG DUNG, HỒ THỊ THƠM, NGUYỄN THỊ THU HƯƠNG, NGUYỄN THỊ THU 18
- ### ● *Thông tin khoa học - Tin tức*
- Định lượng Citicolin trong dung dịch uống Ifsan bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao.
NGUYỄN THỊ HỒNG YẾN, NGUYỄN HỮU THẢO, TRẦN THỊ HỒNG ANH 23
 - Thuốc không đạt chất lượng đã được Bộ Y tế xử lý từ 01/12/2019 đến 31/05/2020.
HÀ THỊ MINH CHÁU 28

CONTENTS

Page

● *Scientific researches*

- Development and validation of HPLC method for identification and determination of Monotropein material.
BẠCH THỊ THẨM, TRẦN THỊ THU TRANG, NGUYỄN TUẤN ANH, PHẠM VĂN KIẾN, TRẦN VIỆT HÙNG, ĐOÀN CAO SƠN 1
- Development and validation of HPLC method for determining of related impurities in extended-release Venlafaxine tablets.
NGUYỄN VĂN HÀ, VŨ THỊ THU GIANG, NGUYỄN THỊ THANH HUYỀN, ĐOÀN CAO SƠN 6
- Study on determination of Tenofovir in human plasma by LC-MS/MS method.
TẠ MẠNH HÙNG, HOÀNG VĂN ĐỨC, DƯƠNG ÁNH HIỆP, ĐOÀN CAO SƠN 13
- Study on determination of the potency of antibiotic Tyrothricin by Turbidimetric method.
NGUYỄN THỊ THU HƯỜNG, TRỊNH THỊ PHƯƠNG DUNG, HỒ THỊ THƠM, NGUYỄN THỊ THU HƯƠNG, NGUYỄN THỊ THU 18

● *Technical information – News*

- Determination of Citicolin in Ifsan oral solution by High Performance Liquid Chromatography method.
NGUYỄN THỊ HỒNG YẾN, NGUYỄN HỮU THẢO, TRẦN THỊ HỒNG ANH 23
- Substandard pharmaceuticals recalled from December 2019 to May 2020 on decision of Ministry of Health.
HÀ THỊ MINH CHÁU 28