

VIỆN KIỂM NGHIỆM THUỐC TRUNG ƯƠNG

ISSN 1859 - 0055

TẠP CHÍ

**KIỂM
NGHIỆM
thuốc**

JOURNAL OF DRUG QUALITY CONTROL

SỐ 2.2022

TẬP 20-SỐ 76

NATIONAL INSTITUTE OF DRUG QUALITY CONTROL

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

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

TẠP CHÍ KIỂM NGHIỆM THUỐC SỐ 2/2022

JOURNAL OF DRUG QUALITY CONTROL N^o 2/2022

XUẤT BẢN TỪ NĂM 2003

Tổng biên tập: PGS. TS. ĐOÀN CAO SƠN

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

Thư ký biên tập: ThS. BÙI VĂN TRUNG

Trị sự: ThS. BÙI VĂN TRUNG

Hội đồng Biên tập:

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

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

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

In xong và nộp lưu chiểu tháng 07 năm 2022.

NGHIÊN CỨU XÂY DỰNG QUI TRÌNH ĐỊNH LƯỢNG CILNIDIPIN TRONG HUYẾT TƯƠNG NGƯỜI BẰNG PHƯƠNG PHÁP LC-MS/MS

PHAN THỊ NGHĨA, NGÔ ĐỨC LIÊM, TRẦN HOÀNG,
NGUYỄN THỊ THU QUỲNH, LÊ THỊ LA✉

Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương

Từ khóa: Cilnidipin, tương đương sinh học, huyết tương, thẩm định phương pháp, LC-MS/MS

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Cilnidipin ($C_{27}H_{28}N_2O_7$; KLPT: 492,528 g/mol) thuộc nhóm thuốc chẹn kênh calci, được chỉ định trong điều trị tăng huyết áp. Ở mức liều khuyến nghị sử dụng (10 mg), nồng độ tối đa của dược chất trong huyết tương người khoảng 5 - 10 ng/ml [2], [3], [5]. Do vậy, xác định nồng độ cilnidipin trong các mẫu huyết tương người bằng phương pháp sắc ký với detector thông thường là không khả thi. Dựa vào trang thiết bị hiện có và tham khảo một số phương pháp phân tích đã được các tác giả công bố [3], [5], đồng thời áp dụng các nguyên lý của phương pháp sắc ký lỏng khối phổ và độ nhạy của thiết bị, chúng tôi đã tiến hành nghiên cứu xây dựng phương pháp định lượng cilnidipin trong huyết tương người bằng phương pháp LC-MS/MS nhằm đáp ứng nhu cầu đánh giá tương đương sinh học các chế phẩm chứa cilnidipin.

2. THỰC NGHIỆM

2.1. Nguyên vật liệu

*** Chất chuẩn:**

- Cilnidipin (CILNI): Chuẩn đối chiếu của Sigma Aldrich, SKS: 0000011054, hàm lượng: 99,9 % (nguyên trạng).

- Losartan kali (IS): Chuẩn đối chiếu của Viện Kiểm nghiệm thuốc thành phố Hồ Chí Minh, SKS: QT166 090520, hàm lượng: 99,9 % (nguyên trạng) được dùng làm chuẩn nội trong phương pháp phân tích.

*** Dung môi, hóa chất:**

- Methanol, acetonitril đạt tiêu chuẩn tinh khiết dùng cho sắc ký.

- Acid formic, amoniacetat đạt tiêu chuẩn tinh khiết dùng cho phân tích sắc ký khối phổ.

*** Huyết tương trắng:** Huyết tương không có dược chất cần phân tích của Bệnh viện Trung ương quân đội 108.

2.2. Thiết bị và dụng cụ phân tích

*** Thiết bị:**

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

- Hệ thống sắc ký lỏng khối phổ Xevo TQD, Waters - Mỹ
- Cân phân tích 05 số Mettler Toledo - Thụy Sĩ ($d = 0,01$ mg);
- Tủ lạnh âm sâu MDF-U74V Panasonic - Nhật Bản (từ -50°C đến -86°C);
- Máy ly tâm lạnh Sigma 4 - 16 KS - Đức;
- Máy lắc xoáy...
- * Dụng cụ:** Bình định mức, micropipette, ống nhựa ly tâm...

2.3. Phương pháp nghiên cứu

2.3.1. Phương pháp sắc ký lỏng khối phổ

*** Điều kiện sắc ký**

- Cột sắc ký: C18; 50 x 2,1 mm; 1,7 μm . Nhiệt độ cột 40°C
- Pha động: Acetonitril : (amoniacetat 10mM + acid formic 0,1 % tt/tt) = 90 : 10
- Tốc độ dòng: 0,2 ml/phút
- Thể tích tiêm: 5 μl
- Nhiệt độ autosampler: 15°C
- Detector: Xevo TQD

*** Điều kiện khối phổ**

- Kiểu khối phổ: MS/MS, nguồn ion hóa ESI (-)
- Các thông số của thiết bị khối phổ để phát hiện CILNI và IS:

Hoạt chất	Cilnidipin	Losartan (IS)
Thông số		
Capillary voltage (kV)	1,5	1,5
Cone voltage (V)	50	50
Desolvation temperature ($^{\circ}\text{C}$)	500	500
Desolvation gas (L/H)	800	800
Cone gas (L/H)	25	25
Collision energy (V)	22	26
Ion ban đầu (parent ion)	491,14	421,13
Ion tạo thành (product ion)	122,13	126,97

* Phương pháp xử lý mẫu

- Dung dịch chuẩn: Chuẩn bị dung dịch chuẩn gốc trong methanol có nồng độ cilnidipin 1,0 mg/ml. Từ dung dịch chuẩn gốc, chuẩn bị dung dịch làm việc trong methanol có nồng độ cilnidipin 1000,0 ng/ml. Tiến hành chuẩn bị dãy nồng độ đường chuẩn từ 0,2 ng/ml đến 20 ng/ml trong huyết tương từ dung dịch chuẩn làm việc.

- Dung dịch chuẩn nội (IS): Chuẩn bị dung dịch chuẩn nội losartan có nồng độ khoảng 8 µg/ml trong hỗn hợp dung môi methanol : nước (1 : 1).

- Chiết, tách cilnidipin (CILNI) trong mẫu huyết tương người bằng phương pháp tủa protein theo quy trình như sau: hút 0,5 ml huyết tương, thêm 50 µl IS, 2 ml acetonitril vào ống nhựa. Lắc xoáy 20 giây. Ly tâm 8000 vòng/phút trong 5 phút. Hút 0,5 ml lớp dịch trong. Tiêm sắc ký.

* Phương pháp tính kết quả

Xác định nồng độ cilnidipin có trong các mẫu thử (chưa biết nồng độ) dựa vào tỷ lệ diện tích pic CILNI/IS thu được từ sắc đồ (SKĐ) của mẫu thử và đường chuẩn biểu thị mối tương quan giữa nồng độ cilnidipin có trong các mẫu chuẩn với tỷ lệ diện tích pic CILNI/IS của mẫu chuẩn.

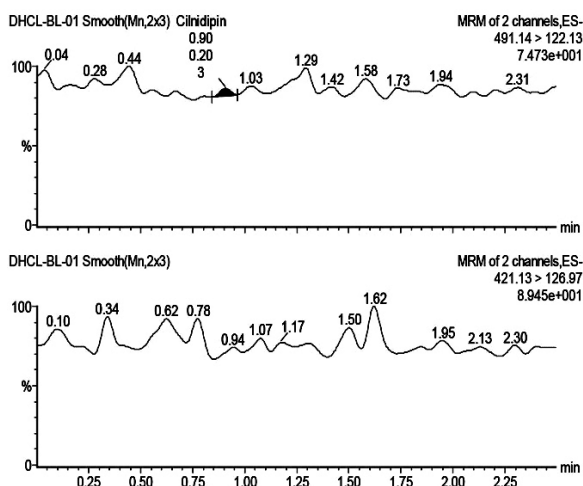
2.3.2. Thẩm định phương pháp phân tích

Tiến hành thẩm định phương pháp phân tích theo quy định của EMA [1] và US-FDA [4].

3. KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN

3.1. Xây dựng phương pháp phân tích

3.1.1. Tối ưu hóa điều kiện khối phổ và sắc ký



Hình 1. SKĐ mẫu huyết tương trắng

Điều kiện khối phổ của cilnidipin được khảo sát ở cả mode ESI (+) và mode ESI (-) trên hệ thống Water Xevo TQD, kết quả cho thấy đáp ứng cilnidipin cao hơn và ổn định khi chạy mode ESI (-). Vì vậy mode ESI (-) được lựa chọn để khảo sát các điều kiện tiếp theo. Pha động tối ưu khi chạy cilnidipin trên mode ESI (-) là pha động có tính acid.

3.1.2. Lựa chọn chuẩn nội

Khảo sát một số chất có đặc tính hóa lý tương tự với cilnidipin để làm chuẩn nội của phương pháp gồm nimodipin, glibenclamid, losartan, felodipin. Sau khi tối ưu hóa các điều kiện MS gồm thể nguồn ion, thể hội tụ, nhiệt hóa hơi, lưu lượng khí mang, lưu lượng khí bổ trợ, năng lượng phân mảnh tương tự như cilnidipin thì chọn được chuẩn nội phù hợp là losartan.

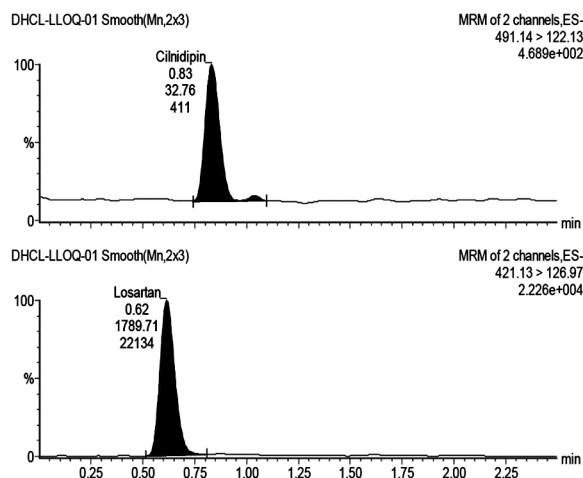
3.1.3. Lựa chọn phương pháp xử lý mẫu

Cilnidipin có thể được chiết tách ra khỏi các mẫu dịch sinh học bằng các phương pháp khác nhau như chiết lỏng lỏng, chiết pha rắn, hoặc tủa protein nhờ đặc tính hóa lý vốn có. Tuy nhiên với phương pháp tủa protein cho nhiều ưu điểm như xử lý mẫu nhanh, tỷ lệ thu hồi cao, do vậy lựa chọn xử lý mẫu bằng phương pháp tủa protein.

3.2. Thẩm định phương pháp phân tích

3.2.1. Độ đặc hiệu - chọn lọc của phương pháp

Phân tích các mẫu huyết tương trắng, mẫu huyết tương tự tạo chứa chuẩn nội và cilnidipin nồng độ khoảng 0,2 ng/ml theo phương pháp đã xây dựng và ghi lại sắc đồ - SKĐ (Hình 1, 2).



Hình 2. SKĐ mẫu huyết tương trắng có IS và CILNI nồng độ 0,2 ng/ml

Trên SKĐ của mẫu huyết trắng (hình 1), tại các thời điểm 0,83 và 0,62 phút (trùng với thời gian lưu của CILNI và IS trong SKĐ của mẫu chuẩn - hình 2) không xuất hiện các pic có các mảnh phổ khối $m/z = 491,14 \rightarrow 122,13$ (CILNI) và $m/z = 421,13 \rightarrow 126,97$ (IS). Do vậy, phương pháp phân tích có độ đặc hiệu-chọn lọc với CILNI và IS theo các quy định của phương pháp phân tích thuốc trong dịch sinh học [1], [4].

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

Nồng độ (ng/ml)	Độ đúng (%)				
	Đường chuẩn 1	Đường chuẩn 2	Đường chuẩn 3	Đường chuẩn 4	Đường chuẩn 5
0,201	98,6	101,1	103,3	98,2	103,8
0,403	102,4	100,7	97,3	108,7	92,2
1,007	97,5	92,2	90,1	82,6	100,3
2,015	106,9	105,8	94,4	103,9	98,9
4,029	101,7	88,0	109,9	110,8	101,9
8,058	98,5	101,2	99,9	100,0	100,3
16,117	92,9	106,6	103,7	101,7	102,1
20,146	101,4	104,3	101,5	94,1	100,5
$y = ax + b$	$a = 0,1092$ $b = 0,00166$	$a = 0,1047$ $b = - 0,00171$	$a = 0,1162$ $b = - 0,00063$	$a = 0,1169$ $b = - 0,00597$	$a = 0,1072$ $b = 0,00505$
Hệ số r	0,9989	0,9971	0,9975	0,9948	0,9992

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

Kết quả thẩm định cho thấy trong khoảng nồng độ từ 0,2 ng/ml đến 20 ng/ml có sự tương quan tuyến tính giữa nồng độ cilnidipin và tỷ lệ diện tích pic cilnidipin/IS với hệ số tương quan $r > 0,99$. Nồng độ cilnidipin xác định từ đường chuẩn so với nồng độ lý thuyết đều nằm trong giới hạn cho phép theo quy định của phương pháp phân tích thuốc trong dịch sinh học [1], [4].

3.3. Giới hạn định lượng dưới của phương pháp

Phân tích các mẫu huyết tương trắng và huyết tương chứa chuẩn cilnidipin có nồng độ chính xác khoảng 0,2 ng/ml (mẫu LLOQ). Xác định nồng độ cilnidipin có trong các mẫu LLOQ từ các đường chuẩn tiến hành làm song song trong cùng điều kiện (thực hiện trên 3 lô khác nhau trong 3 ngày).

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

Kết quả thẩm định cho thấy trong các mẫu trắng không xuất hiện pic tạp có cùng thời gian lưu của pic cilnidipin trong các mẫu LLOQ. Tỷ lệ giữa nồng độ

3.2. Đường chuẩn và khoảng tuyến tính

Phân tích các mẫu huyết tương chứa chuẩn nội và chuẩn cilnidipin có nồng độ khoảng 0,2 ng/ml đến 20 ng/ml theo quy trình đã xây dựng. Xác định sự tương quan giữa nồng độ cilnidipin có trong mẫu và tỉ lệ diện tích pic CILNI/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.

Trung bình cilnidipin xác định từ đường chuẩn so với nồng độ lý thuyết có trong các mẫu LLOQ của 3 lô phân tích nằm trong khoảng 103,7 % - 119,4 % (trung bình = 113,9 %, CV = 14,4 % với $n=18$) đáp ứng yêu cầu giới hạn định lượng dưới của phương pháp phân tích thuốc trong dịch sinh học [1], [4].

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 cilnidipin có nồng độ tương ứng lần lượt là 0,2 ng/ml; 0,6 ng/ml; 2,4 ng/ml; 10 ng/ml và 15 ng/ml. Xác định hàm lượng cilnidipin 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 4.

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

STT	Ngày 01 (lô 01)			Ngày 02 (lô 02)			Ngày 03 (lô 03)		
	Mẫu trắng	Mẫu chuẩn ($\approx 0,2$ ng/ml)		Mẫu trắng	Mẫu chuẩn ($\approx 0,2$ ng/ml)		Mẫu trắng	Mẫu chuẩn ($\approx 0,2$ ng/ml)	
	Diện tích pic	Nồng độ (ng/ml)	Độ đúng (%)	Diện tích pic	Nồng độ (ng/ml)	Độ đúng (%)	Diện tích pic	Nồng độ (ng/ml)	Độ đúng (%)
1	0	0,225	110,9	0	0,200	98,4	0	0,277	136,6
2	0	0,236	116,2	0	0,268	132,1	0	0,265	130,6
3	0	0,221	108,6	0	0,176	86,8	0	0,224	110,2
4	0	0,257	126,6	0	0,216	106,3	0	0,215	106,1
5	0	0,256	126,1	0	0,201	98,9	0	0,291	143,5
6	0	0,252	124,0	0	0,203	99,9	0	0,181	89,2
TB	0	0,241	118,7	0	0,211	103,7	0	0,242	119,4
CV (%)		6,6	6,7		14,7	14,7		17,5	17,5
TB (n = 18)								0,231	113,9
CV% (n = 18)								14,4	14,4

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

Độ đúng, độ lặp lại	LLOQ ($\approx 0,2$ ng/ml)		LQC ($\approx 0,6$ ng/ml)		SQC ($\approx 2,4$ ng/ml)		MQC (≈ 10 ng/ml)		MQC (≈ 15 ng/ml)	
	Độ đúng (%)	CV (%)	Độ đúng (%)	CV (%)	Độ đúng (%)	CV (%)	Độ đúng (%)	CV (%)	Độ đúng (%)	CV (%)
Trong ngày	103,7	14,7	101,9	3,3	99,6	4,7	101,0	6,3	101,6	3,3
Khác ngày	113,9	14,4	107,7	6,0	105,3	8,1	98,4	4,9	98,6	3,7

Kết quả thẩm định cho thấy ở các nồng độ thấp, trung bình và cao, phương pháp có độ đúng trung bình trong ngày và khác ngày đạt từ 98,4 % đến 113,9 %; độ lặp lại trong ngày và khác ngày với giá trị CV nhỏ hơn 15,0 %, đáp ứng yêu cầu với độ đúng, độ chính xác của phương pháp phân tích thuốc trong dịch sinh học [1], [4].

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

Tiến hành nghiên cứu độ ổn định của cilnidipin trong huyết tương trên các lô mẫu LQC và HQC. Đánh giá độ ổn định của cilnidipin trong huyết tương bằng cách so sánh nồng độ cilnidipin có trong các mẫu được bảo quản và nồng độ lý thuyết. Kết quả nghiên cứu độ ổn định cilnidipin được trình bày trong bảng 5.

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

Độ ổn định	Mẫu	Nồng độ lý thuyết (ng/ml; n=6)	Nồng độ sau bảo quản (ng/ml; n=6)	% độ ổn định
5 chu kỳ đông - rã	LQC	0,608	0,692	113,8
	HQC	15,196	13,379	88,0
Độ ổn định thời gian ngắn (6 giờ; nhiệt độ phòng)	LQC	0,608	0,682	112,1
	HQC	15,196	13,572	89,3
Độ ổn định trong autosampler (71,17 giờ/15 °C)	LQC	0,608	0,552	90,8
	HQC	15,189	14,734	97,0
Độ ổn định dài ngày (-70 °C, 101 ngày)	LQC	0,608	0,668	109,8
	HQC	15,196	13,329	87,7

Kết quả nghiên cứu độ ổn định cho thấy cilnidipin trong mẫu huyết tương ổn định sau 5 chu kỳ đông - rã đông, ổn định khi bảo quản ở nhiệt độ phòng (6 giờ) và ổn định trong thời gian dài (-70 °C, 101 ngày) (yêu cầu % độ ổn định phải đạt từ 85,0 % đến 115,0 %) [1], [4].

4. KẾT LUẬN

Nghiên cứu đã xây dựng được phương pháp định lượng cilnidipin trong huyết tương người bằng kỹ thuật

LC-MS/MS. Kết quả thẩm định cho thấy phương pháp có giá trị giới hạn lượng nhỏ (0,2 ng/ml); khoảng tuyến tính rộng (0,2 ng/ml đến 20 ng/ml); độ đúng đạt từ 98,4 % đến 113,9 %; độ lặp lại với giá trị CV < 15 % đáp ứng yêu cầu đối với phương pháp phân tích thuốc trong dịch sinh học của USFDA và EMA. 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 cilnidipin.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. European Medicines Agency, Committee for Medicinal Products for Human Use (2011): *Guideline on Bioanalytical Method Validation*.
2. <https://www.mims.com/vietnam/drug/info/atelec>.
3. Heon-Woo Lee, Ji-Hyung Seo, Hyun-Su Lee, Seo-Young Jeong, Young-Wuk Cho, Kyung-Tae Lee (2008), "Development of a liquid chromatography/negative-ion electrospray tandem mass spectrometry assay for the determination of cilnidipine in human plasma and its application to bioequivalence study", *Journal of Chromatography B*, 862, pp. 246-251.
4. U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration (2018): *Guidance for Industry - Bioanalytical Method Validation*.
5. Xianhua Zhang, Suodi Zhai, Rongsheng Zhao, Jin Ouyang, Xiaoguang Li, Willy R.G.Baeyens (2007), Determination of cilnidipine, a new calcium antagonist, in human plasma using high performance liquid chromatography with tandem mass spectrometric detection, *Analytica chimica acta*, 600, pp. 142-146.

SUMMARY

A simple, specific and sensitive LC-MS/MS method has been developed for determination of cilnidipine in human plasma. The analyte and the internal standard (losartan) were extracted from human plasma by the protein precipitation method with acetonitrile. The chromatographic conditions were achieved on the type of column (C18; 50 × 2.1 mm; 1.7 µm) with negative-ion electrospray ionization tandem mass spectrometric (ESI-MS/MS). Acquisition was performed in multiple reaction monitoring (MRM) mode, by monitoring the transitions including $m/z = 491.14 \rightarrow 122.13$ for cilnidipine and $m/z = 421.13 \rightarrow 126.97$ for IS, respectively. The mobile phase included acetonitrile and (10 mM ammonium acetate + 0.1 % formic acid) with suitable ratio at a flow rate of 0.2 ml/min. The method was validated over concentration range from 0.2 ng/ml to 20 ng/ml. The intra and inter-day precision and accuracy were within between 98.4 % and 113.9 %. This method can be used for BA-BE studies of cilnidipine preparations.

(Ngày nhận bài: 25/04/2022; Ngày phản biện: 26/04/2022; Ngày duyệt đăng: 22/06/2022)

PHÂN BIỆT DƯỢC LIỆU Ý DĨ VÀ DƯỢC LIỆU Ý DĨ GIẢ MẠO

VÕ THỊ HƯỜNG

NGUYỄN THỊ LIÊN✉

Trung tâm Kiểm nghiệm Dược phẩm, Mỹ phẩm Bình Định

Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương

Từ khóa: Ý dĩ, Ý dĩ giả mạo, mô tả, soi bột, sắc ký lớp mỏng

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Dược liệu Ý dĩ (*Semen coicis*) là hạt của quả chín đã phơi hay sấy khô của cây Ý dĩ (*Coix lacrymajobi* var. *mayuen* (Rom. Caill.) Stapf), họ lúa (Poaceae) [1]. Hạt có vị ngọt, nhạt, tính mát, có tác dụng bổ tỳ kiện vị, lợi

niệu, bổ phổi [2], ngoài ra còn là một cây lương thực có giá trị dinh dưỡng [3]. Chính vì vậy hạt Ý dĩ được bán rộng rãi trên thị trường và là một trong những loại dược liệu hay bị nhầm lẫn, giả mạo bởi những hạt có hình dạng bên ngoài tương tự cũng được gọi tên là hạt Ý dĩ.

Đứng trước thực trạng trên, chúng tôi xin nêu ra một số kết quả phân tích bằng phương pháp mô tả cảm quan, soi bột và sắc ký lớp mỏng nhằm phân biệt dược liệu Ý dĩ và dược liệu Ý dĩ giả mạo nhằm góp phần cung cấp thêm phương pháp đề phục vụ công tác kiểm tra và quản lý chất lượng dược liệu Ý dĩ tại Việt Nam.

2. THỰC NGHIỆM

2.1. Hóa chất, thiết bị

- Kính hiển vi MBL 2000 – T – PL – 30W, hãng KRUSS của Đức;

- Các hóa chất, thiết bị sắc ký lớp mỏng đạt độ tinh khiết phân tích và theo qui định của Dược điển Việt Nam V;

- Các dụng cụ thủy tinh cần thiết.

2.2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Đối tượng nghiên cứu

- Dược liệu chuẩn Ý dĩ, số lô: 01052019, của Viện Kiểm nghiệm Thuốc thành phố Hồ Chí Minh;

- Mẫu dược liệu Ý dĩ lấy trên thị trường;

- Mẫu dược liệu Ý dĩ giả mạo lấy trên thị trường.

2.2.2. Phương pháp nghiên cứu

Sử dụng các kỹ thuật phân tích sau

- Quan sát hình thái dược liệu;

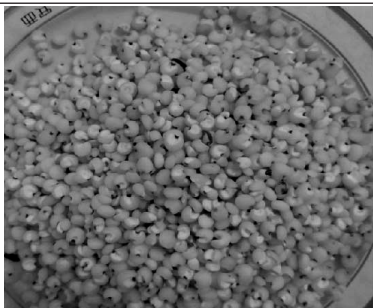
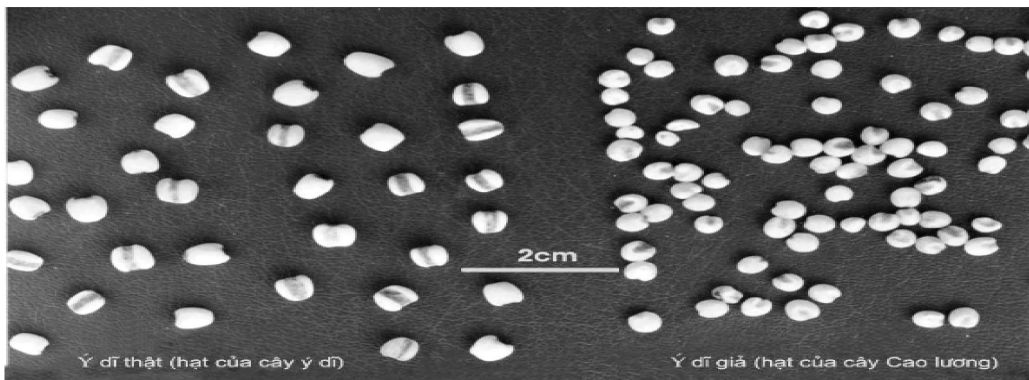
- Soi bột dược liệu dưới kính hiển vi;

- Phương pháp sắc ký lớp mỏng.

3. KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN

3.1. Mô tả

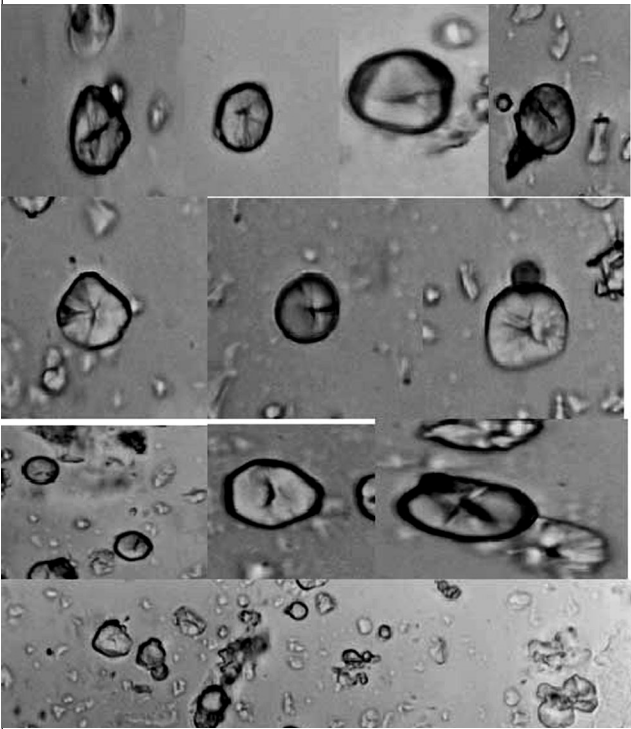
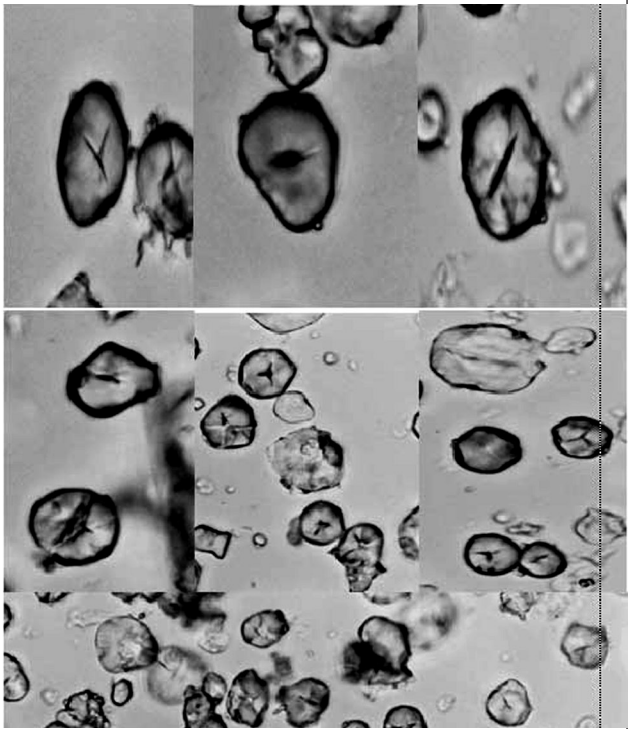
Về cảm quan, qua phân tích chi tiết chúng tôi thấy có một số đặc điểm khác biệt như (Hình 1).

Dược liệu chuẩn Ý dĩ	Dược liệu Ý dĩ giả mạo
	
	
Hạt hình trứng ngắn hay hơi tròn, dài 0,5 cm đến 0,8 cm, đường kính 0,2 cm đến 0,5 cm. Mặt ngoài màu trắng hay trắng ngà, hơi bóng, đôi khi còn sót lại những mảnh vỏ quả màu đỏ nâu. Mặt trong có rãnh hình máng, đôi khi còn sót lại vỏ, ở đầu rãnh có một chấm màu nâu đen. Đôi khi nhìn rõ vết của cuống quả. Chất rắn chắc. Chỗ vỡ màu trắng ngà, có bột.	Kích thước bằng khoảng 1/3 hạt thật, rãnh hạt bé và ngắn hơn, rãnh nằm trên đỉnh hạt.

Hình 1. Hình ảnh dược liệu chuẩn Ý dĩ và dược liệu Ý dĩ giả mạo

3.2. Soi Bột

Nghiền dược liệu thành bột mịn, rây qua rây số 125 μm . Quan sát bằng kính hiển vi với độ phóng đại 40x, 10x (Hình 2).

Dược liệu chuẩn Ý dĩ	Dược liệu Ý dĩ giả mạo
	
Nhiều hạt tinh bột. Thường thấy hạt tinh bột đơn hình đĩa, một số hình nhẫn, rón thường phân nhánh hình sao. Ít thấy hạt tinh bột kép.	Nhiều hạt tinh bột. Thường thấy hạt tinh bột đơn hình đĩa, rón thường phân nhánh hình sao, hình kẻ nứt, hình chấm.

Hình 2. Hình ảnh soi bột dược liệu chuẩn Ý dĩ và dược liệu Ý dĩ giả mạo

Nhận xét: Chưa tìm thấy sự khác biệt rõ ràng giữa hai bột dược liệu chuẩn Ý dĩ và dược liệu Ý dĩ giả mạo.

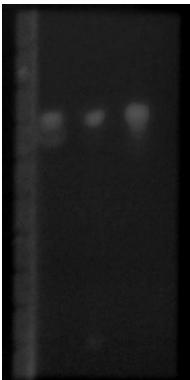
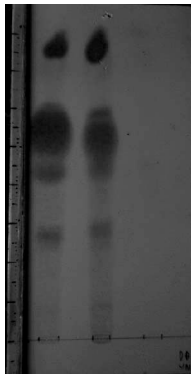
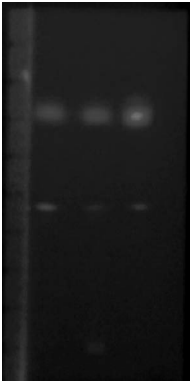
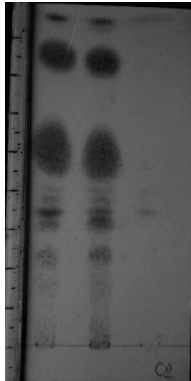
3.3. Sắc ký lớp mỏng

- Bản mỏng Silicagel 60 F₂₅₄
- Dung môi khai triển:
Ether dầu hòa (30 - 60 °C): ethyl acetat : acid acetic (10 : 3 : 0,1) [1]
Ether dầu hòa (30 - 60 °C): ether : acid acetic băng (83 : 17 : 1) [4]
- Dung dịch thử 1 (T1): Lấy 1 g bột mẫu dược liệu Ý dĩ lấy trên thị trường, thêm 10ml ether dầu hòa (30 - 60 °C) chiết siêu âm 30 phút, để nguội, lọc, bốc hơi dịch lọc trên cách thủy đến cạn, hòa cạn với 1ml ether dầu hòa (30 - 60 °C) làm dung dịch chấm sắc ký.
- Dung dịch thử 2 (T2): Lấy 1g bột mẫu dược liệu Ý dĩ giả mạo lấy trên thị trường, thêm 10 ml ether dầu hòa

(30 - 60 °C), lắc siêu âm trong 30 phút, để nguội, lọc, bốc hơi dịch lọc trên cách thủy đến cạn, hòa cạn với 1 ml ether dầu hòa (30 - 60 °C) làm dung dịch chấm sắc ký.

- Dung dịch đối chiếu (C): tiến hành như dung dịch thử với dược liệu chuẩn Ý dĩ
- Cách tiến hành 1: Chấm riêng biệt lên bản mỏng 10 μl mỗi dung dịch trên. Sau khi triển khai đến khi dung môi đi được 9 cm, lấy bản mỏng ra. Để khô ở nhiệt độ phòng. Quan sát dưới ánh sáng tử ngoại ở bước sóng 366 nm [1].
- Cách tiến hành 2: Chấm riêng biệt lên bản mỏng 10 μl mỗi dung dịch trên, sau khi triển khai dung môi đi được khoảng 9 cm, lấy bản mỏng ra, để khô ở nhiệt độ phòng. Soi đèn UV 366 nm, sau đó phun vanilin 5%/ acid sulfuric, sấy 105 °C đến khi hiện rõ vết, quan sát ánh sáng thường [4].

* **Yêu cầu:** Trên sắc ký đồ của dung dịch thử phải có các vết cùng màu, cùng R_f so với các vết trên sắc ký đồ của dung dịch đối chiếu.

Hệ dung môi khai triển	Soi UV 366 nm	Phun vanilin 5%/H ₂ SO ₄ [4]
Ether dầu hỏa (30 – 60 °C) : ethyl acetat : acid acetic (10 : 3 : 0,1) [1]	 Rf=0,67	 Rf=0,83 Rf=0,49 Rf=0,3
Ether dầu hỏa (30 - 60 °C) : ether : acid acetic băng (83 : 17 : 1) [4]	 Rf=0,67 Rf=0,41	 Rf=0,84 Rf=0,56 Rf=0,39

Hình 3. Hình ảnh sắc ký lớp mỏng của dược liệu Ý dĩ và dược liệu Ý dĩ giả mạo

Nhận xét: Kết quả thể hiện ở Hình 3 cho thấy:

- Phương pháp hiện vết bằng ánh sáng tử ngoại bước sóng 366 nm cho thấy không có sự khác biệt giữa dược liệu Ý dĩ và dược liệu Ý dĩ giả mạo.

- Sử dụng thuốc thử hiện màu là dung dịch vanilin 5 % trong acid sulfuric, sấy ở 105 °C đã thấy rõ sự khác biệt giữa dược liệu Ý dĩ và dược liệu Ý dĩ giả mạo. Cụ thể là trên sắc ký đồ của dung dịch thử 1 cho các vết có cùng màu sắc và giá trị R_f với các vết trên sắc ký đồ dung dịch đối chiếu và khác với các vết trên sắc ký đồ dung dịch thử 2.

4. KẾT LUẬN

Từ các kết quả thu được cho thấy bằng các kỹ thuật: Quan sát hình thái dược liệu, phương pháp sắc ký lớp mỏng với dịch chiết ether dầu hỏa (30 - 60 °C) sử dụng hệ dung môi triển khai: ether dầu hỏa (30 - 60 °C) : ethyl acetat : acid acetic (10 : 3 : 0,1) hoặc ether dầu hỏa (30 - 60 °C) : ether : acid acetic băng (83 : 17 : 1), hiện màu bằng dung dịch vanilin 5 % trong acid sulfuric, sấy ở 105 °C có thể phân biệt được dược liệu Ý dĩ và dược liệu Ý dĩ giả mạo.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Bộ Y tế (2017), *Dược điển Việt Nam, lần xuất bản thứ năm*, Nhà xuất bản Y học, trang 1384.
2. Võ Văn Chi (2012), *Từ điển cây thuốc Việt Nam*. Nhà xuất bản Y học, Tập 2 , trang 1236.
3. Li Feng, Yonghong Zhao, Zhuqi Zhang, Shengai Zhang, Hongxia Zhang, Mingli Yu, Yiwei Ma (2020), The Edible and Medicinal Value of *Coix lacryma-jobi* and Key Cultivation Techniques for High and Stable Yield, *Natural Resources*. 11(12), pp. 569-575.
4. Chinese Pharmacopoeia Commission (2015), *Pharmacopoeia of the People's Republic of China*. English version, Volume 1, pp. 131.

SUMMARY

In this study, morphological description, powder microscopy and thin layer chromatography were used to distinguish between Coix Seed and its counterfeit. In thin layer chromatography method, the extract of Coix Seed in petroleum ether was developed by solvent system either petroleum ether : ethyl acetate : acetic acid (10 : 3 : 0.1) or petroleum ether : ether : glacial acetic acid (83 : 17 : 1), then visualized by spraying vanillin solution 5% in sulfuric acid and drying at 105 °C. Experimental results showed that morphological description and thin layer chromatography could be effective methods to discriminate genuine and counterfeit Coix Seeds.

(Ngày nhận bài: 03/03/2022; Ngày phản biện: 03/03/2022; Ngày duyệt đăng: 16/06/2022)

XÂY DỰNG QUI TRÌNH ĐỊNH LƯỢNG ACID GANODERIC A TRONG BÀO TỬ NẤM LINH CHI ĐÃ PHÁ VÁCH BẰNG KỸ THUẬT SẮC KÝ LỎNG HIỆU NĂNG CAO

NGUYỄN HỮU LẠC THỦY✉, TRỊNH THỊ DIỆU THƯỜNG, TRƯƠNG VĂN ĐẠT

Đại học Y Dược Tp Hồ Chí Minh

Từ khóa: Ganoderic acid A, Bào tử nấm linh chi, HPLC

1. Đặt vấn đề

Nấm Linh chi là một dược liệu với những tác dụng có lợi cho sức khỏe đã được thừa nhận như chống oxy hóa, loại bỏ gốc tự do [1], bảo vệ gan, chống viêm [2], giúp cải thiện tình trạng bệnh tim mạch [3], tiểu đường [4]. Hiện tại, trong USP43 - NF38 đã có các chuyên luận về thể quả nấm Linh chi [5] và bột thể quả nấm Linh chi [6], trong đó nhóm hoạt chất triterpenoid acid với các chất điển hình như acid ganoderic A đóng vai trò quan trọng. Các chuyên luận của USP43 - NF38 đều yêu cầu định lượng triterpenoid acid với chất chuẩn là acid ganoderic A bằng kỹ thuật HPLC trên cột C_{18} [5], [6]. Bên cạnh thể quả, bào tử của nấm Linh chi cũng là đối tượng được quan tâm vì những tác dụng hữu ích tiềm tàng và được sử dụng dưới nhiều dạng chế phẩm, trong đó phổ biến nhất là dạng bột bào tử sau khi phá vách.

Hiện tại trong các Dược điển chưa có phương pháp chính thức để phân tích các thành phần hoạt chất trong bào tử nấm Linh chi sau khi phá vách, trong khi điều này rất quan trọng trong việc đánh giá chất lượng các sản phẩm bào tử nấm Linh chi được phá vách. Trong nghiên cứu này, một phương pháp HPLC được xây dựng để định lượng acid ganoderic A trong bào tử nấm Linh chi đã phá vách nhằm phục vụ đánh giá hiệu quả kỹ thuật phá vách bào tử cũng như chất lượng của sản phẩm bào tử nấm sau khi phá vách.

2. Thực nghiệm

2.1. Thiết bị, vật tư, hóa chất

2.1.1. Vật tư, hóa chất

- Chất đối chiếu acid ganoderic A (Lô F01200, hàm lượng 0,95 mg/mg nguyên trạng) do USP cung cấp.
- Dung môi tinh khiết sắc ký: acetonitril (ACN), methanol (MeOH) (Merck, Đức).
- Dung môi, hóa chất tinh khiết phân tích: ethanol tuyệt đối, acid trifluoroacetic (Merck, Đức).
- Nước siêu tinh khiết: là nước cất hai lần được lọc qua bộ lọc siêu tinh khiết có cột trao đổi cation, anion và màng lọc 0,2 μm .

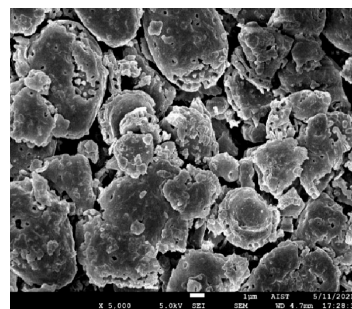
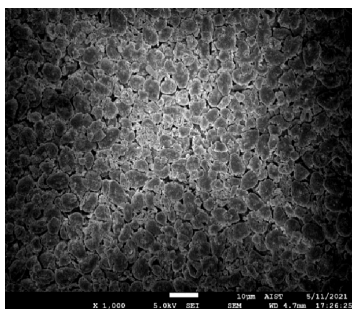
Tất cả các dung dịch pha trong nước hoặc pha loãng bằng nước như ethanol 50 %, acid trifluoroacetic 0,1 % đều được chuẩn bị hoặc pha loãng với nước siêu tinh khiết.

2.2. Trang thiết bị

- Cột sắc ký C_{18} (4,6 $\times$ 250 mm; 5 μm) (YMC - Nhật Bản).
- Hệ thống sắc ký lỏng Agilent 1290 (Mỹ) trang bị đầu dò PDA.
- Thiết bị phụ trợ (cân phân tích, máy lọc nước khử ion), dụng cụ thủy tinh các loại, autopipet, màng lọc 0,45 μm .

2.2. Đối tượng nghiên cứu

- Acid ganoderic A trong mẫu thử bào tử nấm Linh chi đã được phá vách.



Hình 1. Hình chụp SEM nguyên liệu bào tử Linh chi đã được phá vách

2.3. Phương pháp nghiên cứu

* Quy trình chuẩn bị mẫu

Cân 1,0 g bào tử nấm Linh chi đã được phá vách cho vào bình định mức 50 ml. Thêm khoảng 40 ml ethanol 50 %, siêu âm trong 30 phút. Thêm ethanol 50 % đến vạch, lắc đều, lọc. Lấy chính xác 25,0 ml dịch lọc, cô quay chân không ở 60 °C tới gần khô. Thêm chính xác 5 ml ethanol tuyệt đối vào mẫu cấn, siêu âm 10 phút. Lọc qua màng 0,45 µm, thu được dung dịch thử để phân tích bằng kỹ thuật sắc ký lỏng (HPLC).

* Điều kiện sắc ký

Các điều kiện sắc ký được tối ưu hóa để định lượng acid ganoderic A trong bào tử nấm Linh chi đã phá vách như sau:

- Cột: YMC C₁₈ (4,6 mm ´ 250 mm, 5 µm).
- Pha động: hỗn hợp acetonitril – dung dịch acid trifluoroacetic 0,1 % có thành phần thay đổi theo chương trình pha động theo (bảng 1) được duy trì ở tốc độ dòng 1,0 mL/phút.

- Thể tích tiêm mẫu: 10 µL.

- Detector UV-Vis: cài đặt bước sóng 256 nm.

* Pha chế dung dịch thử nghiệm

- *Dung dịch đối chiếu gốc*: acid ganoderic A 100 µg/ml trong methanol. Từ dung dịch đối chiếu gốc, pha loãng chính xác với ethanol để có dung dịch đối chiếu 10 mg/mL.

Pha chế dãy nồng độ các dung dịch đối chiếu từ 1,0; 2,0; 6,0; 10,0; 50,0 và 100,0 (µg/mL) để khảo sát khoảng tuyến tính.

- *Dung dịch thử*: dung dịch thử được thực hiện theo “Quy trình xử lý mẫu”.

- *Các dung dịch khảo sát độ đúng*: chuẩn bị mẫu

thử bào tử nấm Linh chi đã biết trước hàm lượng acid ganoderic A, thêm chuẩn acid ganoderic A ở mức nồng độ tương đương 50 %, 100 % và 150 % nồng độ chuẩn làm việc acid ganoderic A. Với mỗi mức thêm chuẩn thực hiện 3 mẫu độc lập. Xử lý mẫu theo “Quy trình xử lý mẫu” thu được 9 dung dịch thử độ đúng tương ứng.

- *Các dung dịch khảo sát độ lặp lại*: thực hiện phân tích trên 6 mẫu thử độc lập được pha chế theo “Quy trình xử lý mẫu”.

Dung dịch các định LOQ: dung dịch thử chuẩn bị như ở phần “Quy trình xử lý mẫu”, được pha loãng chính xác bằng ethanol tuyệt đối ở các tỷ lệ khác nhau. LOQ của phương pháp được ước lượng từ nồng độ acid ganoderic A trong dung dịch thử đã biết nồng độ và mức độ pha loãng từ dung dịch thử này cho tỷ lệ S/N tương đương 10.

Bảng 1: Chương trình dung môi

Thời gian (phút)	Acid TFA 0,1 %	Acetonitril
0	25 %	75 %
60	45 %	55 %
61	80 %	20 %
80	80 %	20 %
81	25 %	75 %
85	25 %	75 %

2.4. Thẩm định phương pháp

Phương pháp định lượng acid ganoderic A bằng sắc ký lỏng được thẩm định về tính phù hợp hệ thống, xác định khoảng tuyến tính, độ đặc hiệu, độ đúng, độ lặp lại và giới hạn định lượng theo các quy định của 2 tài liệu AOAC International [7] và ICH [8].

3. Kết quả và bàn luận

3.1. Xây dựng phương pháp

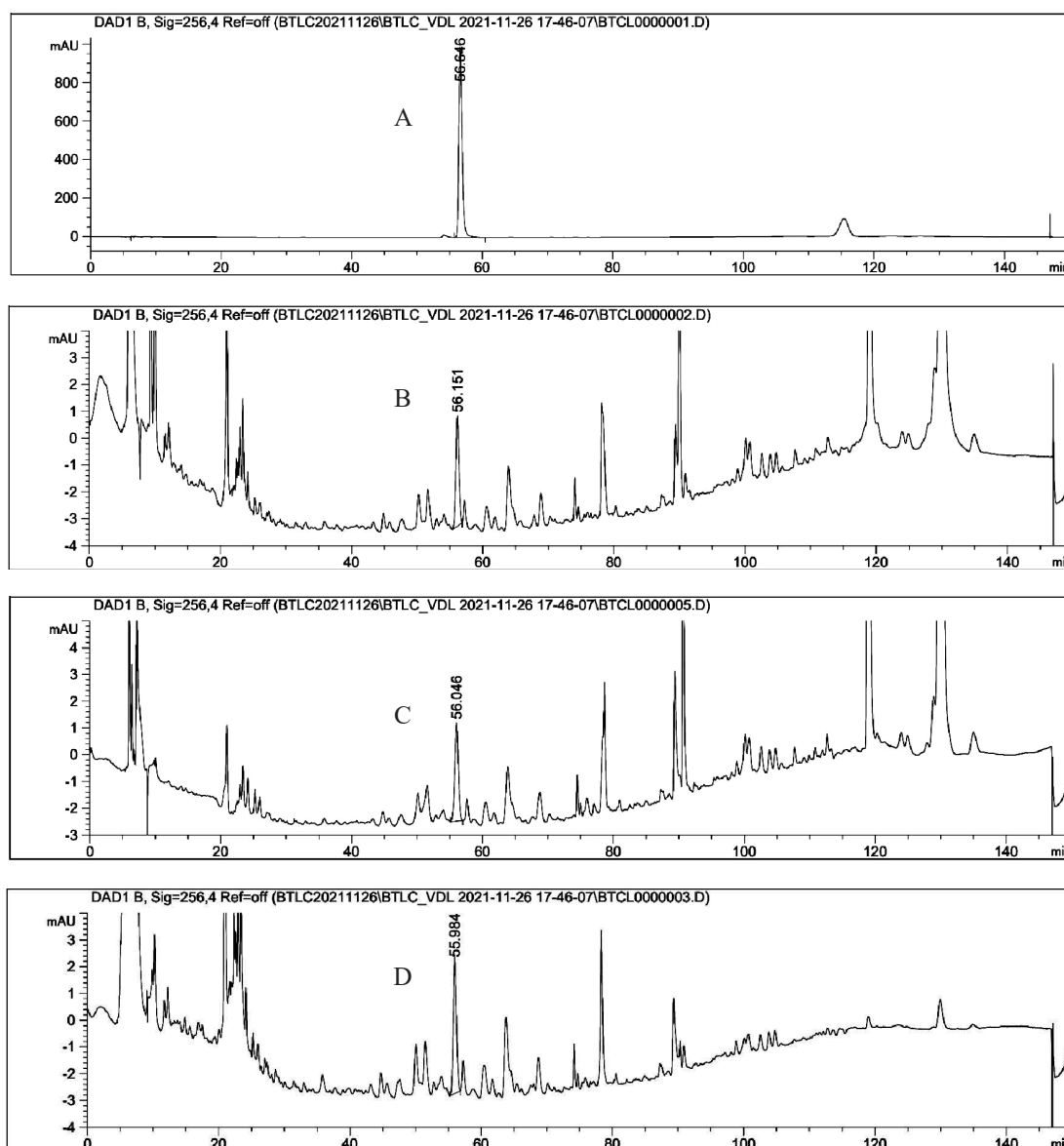
Tương tự thể quả, bào tử nấm Linh chi có thành phần hoạt chất triterpenoid với cấu trúc tương tự acid ganoderic A. Để tách được các thành phần tương tự ra khỏi nhau, cần một chương trình pha động thích hợp. Bên cạnh đó, hệ pha động phải đảm bảo có pH thấp để tăng sự ổn định của các chất có bản chất là acid trong quá trình rửa giải. Sau khi khảo sát, chương trình dung môi được lựa chọn như bảng 1, kết quả khảo sát cho thấy chương trình dung môi này tách được acid ganoderic A khỏi các thành phần khác trong nền mẫu bào tử nấm

Linh chi (Hình 1, D).

Chương trình pha động này vừa đảm bảo tách được pic acid ganoderic A ra khỏi các chất khác, vừa giúp rửa cột loại tạp sau khi phân tích để đảm bảo cột sạch để thực hiện các lần tiêm mẫu tiếp theo.

Thể tích tiêm mẫu ưu tiên là các thể tích thông dụng, cho đáp ứng pic tốt. Sau khi khảo sát, thể tích tiêm 10 μ l cho độ phân giải tốt hơn và đây là thể tích tiêm được lựa chọn cho qui trình phân tích.

Acid ganoderic A có cực đại hấp thụ ở 256 nm và bước sóng này được lựa chọn để ghi sắc ký đồ (xem hình 2, A, B, D).



Hình 2. Sắc ký đồ mẫu chuẩn acid ganoderic A (A), mẫu thử trong methanol (B), mẫu thử trong ethanol (C) và mẫu thử trong ethanol 50% (D).

Về qui trình xử lý mẫu, acid ganoderic A tan được trong cả ethanol và methanol, do đó mẫu bào tử linh chi nghiền cứu được siêu âm lần lượt với các dung môi methanol, ethanol tuyệt đối, ethanol 70 % và ethanol 50 % trong cùng điều kiện. Mẫu sau phân tích được tiến hành sắc ký theo chương trình mà tác giả Đỗ Thị Hà và cộng sự phát triển để phân tích một số thành phần trong nấm linh chi [9]. Kết quả cho thấy pic khi siêu âm mẫu với ethanol 50 % thì diện tích pic acid ganoderic A thu được là lớn nhất. Tuy nhiên, khi siêu âm mẫu bào tử với dung môi ethanol 50 % thì đường và các chất phân cực hòa tan nhiều, làm ảnh hưởng đến quá trình tách pic, đặc biệt khi phân tích nhiều mẫu đồng thời. Hơn nữa hàm lượng acid GA trong mẫu không cao, nếu tăng khối lượng cân mẫu sẽ ảnh hưởng đến thể tích phân bố của mẫu hòa tan. Để giải quyết các vấn đề này, mẫu sau khi siêu âm với chính xác 50,0 ml ethanol 50 % sẽ lấy

25,0 ml để cô quay chân không loại dung môi, tiếp đến siêu âm với ethanol tuyệt đối để hòa tan acid ganoderic A, loại bớt đường và các chất phân cực.

Sau khi xác định được qui trình chuẩn bị mẫu, ở giai đoạn siêu âm với ethanol 50 %, mẫu đã được siêu âm thêm ở các mức thời gian 60 phút và 120 phút nhưng hàm lượng acid ganoderic A thu được không thay đổi so với khi siêu âm ở 30 phút. Như vậy qui trình chiết mẫu đã được tối ưu.

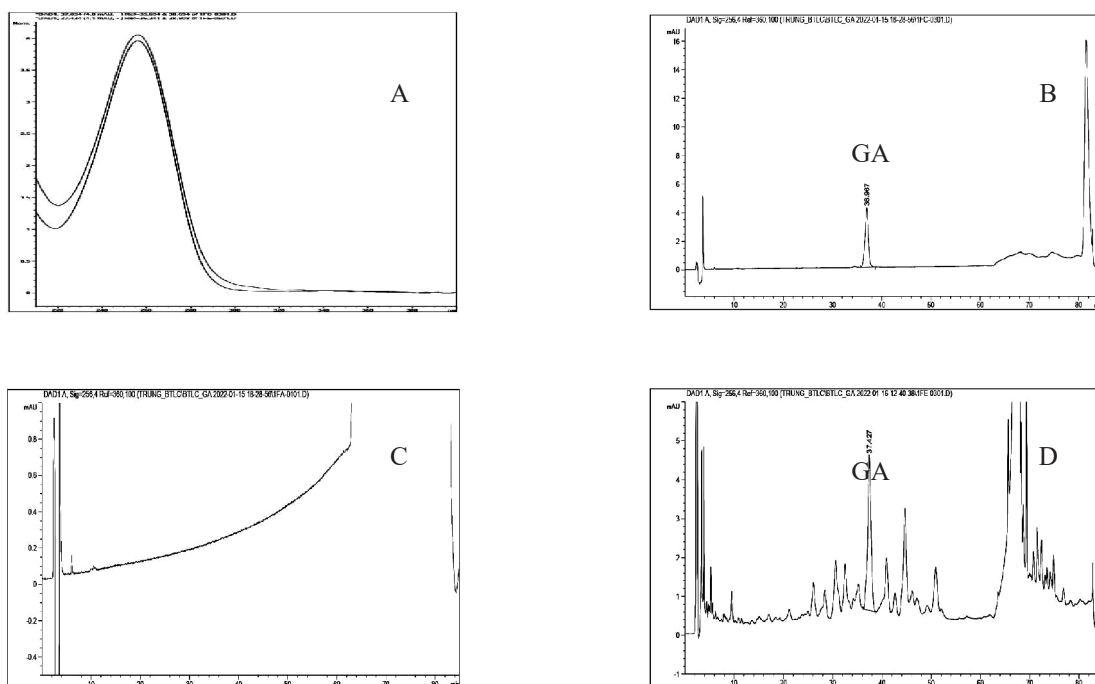
3.2. Thẩm định phương pháp

Kết quả thẩm định phương pháp trình bày trong bảng 2 và minh họa trong hình 3 cho thấy quy trình phân tích đáp ứng được các yêu cầu về độ đặc hiệu, độ lặp lại và độ đúng để áp dụng định lượng acid ganoderic A trong bào tử Linh chi đã phá vách.

Bảng 2: Tóm tắt kết quả thẩm định phương pháp

Chỉ tiêu thẩm định	Kết quả
Độ tương thích hệ thống (thực hiện trên dung dịch chuẩn acid ganoderic 10 µg/mL; n = 6)	t_R : 37,04 ± 0,13 phút ; RSD = 0,4 % S_{pic} : 194,29 ± 0,17 mAU.s ; RSD = 0,9 %
	<i>Nhận xét: RSD < 1,0% với thời gian lưu và < 2,0% với diện tích pic, phương pháp đạt yêu cầu về độ tương thích hệ thống.</i>
Độ đặc hiệu	-Trên sắc ký đồ dung dịch thử bào tử nấm Linh chi, pic của acid ganoderic A được tách hoàn toàn khỏi các pic khác (Hình 1, D). -Thời gian lưu (37 phút) và phổ UV-Vis của acid ganoderic A là tương đồng trên sắc ký đồ của dung dịch chuẩn và dung dịch thử (Hình 1, A, B, D)
Độ tuyến tính Khoảng nồng độ Phương trình hồi quy Hệ số xác định	Hàm lượng: 1 - 100 (mg/mL) $y = 20,0062x + 0,88483$ $R^2 = 0,9999$ % Intercept so với y tại nồng độ 10 mg/ml: 0,45%.
	<i>Nhận xét: có sự tương quan giữa nồng độ acid ganoderic A và diện tích pic qua hệ số tương quan $R = 0,9999$ (>0,998).</i>
Độ lặp lại trong ngày (n = 6)	Hàm lượng ganoderic A trong bào tử Linh chi: 97,9 ± 1,6 (mg/g); RSD 1,6 % <i>Nhận xét: Với mức hàm lượng acid ganoderic, yêu cầu độ lặp lại theo AOAC International là độ lệch chuẩn tương đối (RSD) ≤ 5,3 % [7]. Như vậy phương pháp có độ lặp lại tốt.</i>
Độ chính xác trung gian (n = 12; khác ngày)	Hàm lượng ganoderic A trong bào tử Linh chi: 98,0 ± 1,6 (mg/g); RSD: 1,6%; <i>Nhận xét: Với mức hàm lượng acid ganoderic, yêu cầu độ chính xác trung gian theo AOAC International là độ lệch chuẩn tương đối (RSD) ≤ 5,3 % [7]. Như vậy phương pháp có độ lặp lại tốt.</i>
	<i>Nhận xét: yêu cầu độ lặp lại theo AOAC International là RSD ≤ 8 % [7]. Như vậy phương pháp đạt yêu cầu độ lặp lại.</i>

Độ đúng (Thêm chuẩn vào nền mẫu bào tử nấm Linh chi phá vách biệt trước hàm lượng acid ganoderic A ở 3 mức khác nhau, mỗi nồng độ 3 lần, xác định tỷ lệ (%) tìm lại được so với lượng thêm vào)	- Mức 1: 50% (5 mg/ml), tỷ lệ phục hồi 97,5 – 99,6 (%) (RSD: 1,6%) - Mức 2: 100% (10 mg/ml), tỷ lệ phục hồi 98,0 – 100,8 (%) (RSD: 1,4 %) - Mức 3: 150% (15 mg/ml), tỷ lệ phục hồi 97,5 – 99,5 (%) (RSD: 1,0 %) <i>Nhận xét: tỷ lệ phục hồi của phương pháp trong khoảng 98,9 – 102,7 (%). Trong dãy nồng độ thêm vào này, tương ứng hàm lượng acid ganoderic A trong bào tử nấm Linh chi từ 25 -75 (mg/g), tỷ lệ phục hồi theo yêu cầu của AOAC International là 90 – 107 (%) [7].</i> <i>Như vậy phương pháp đạt yêu cầu về độ đúng.</i>
Giới hạn định lượng trong bào tử nấm (LOQ)	0,23 mg/l.



Hình 2. Sắc ký đồ và phổ UV-Vis (A: phổ hấp thụ UV-Vis của acid ganoderic A trên pic của dung dịch chuẩn và dung dịch thử; B: sắc ký đồ dung dịch chuẩn acid ganoderic A; C: sắc ký đồ dung môi pha mẫu; D: sắc ký đồ mẫu thử bào tử nấm Linh chi)

3.3. Bàn luận

Phương pháp định lượng acid ganoderic A trong bào tử nấm Linh chi đã phá vách cho những điểm mới về điều kiện sắc ký so với các phương pháp đã công bố. Trong đó, qui trình chuẩn bị mẫu đã được tối ưu hóa để tăng hiệu quả phân tích các thành phần trong bào tử. Còn về điều kiện sắc ký, so với điều kiện sắc ký

trong USP43, điều kiện sắc ký đã thiết lập phù hợp hơn với các thiết bị đang sử dụng tại các phòng thí nghiệm tại Việt Nam; so với điều kiện sắc ký mà nhóm tác giả Đỗ Thị Hà công bố thì qui trình đã xây dựng giúp tiết kiệm thời gian phân tích hơn do chỉ tập trung vào định lượng acid ganoderic A. Sự phù hợp của phương pháp với mục đích ứng dụng dự kiến đã được minh chứng

qua kết quả thẩm định phương pháp theo AOAC International [7] và ICH [8].

Do vậy, phương pháp có thể sử dụng để định lượng acid ganoderic A trong bào tử nấm Linh chi đã phá vách, qua đó ứng dụng đánh giá chất lượng nguyên liệu, sản phẩm chứa bào tử nấm Linh chi cũng như hiệu quả của các quy trình phá vách bào tử.

4. Kết luận

Nghiên cứu đã thiết lập được các điều kiện thực nghiệm để xây dựng phương pháp định lượng acid ganoderic A trong bào tử nấm Linh chi đã phá vách sử dụng kỹ thuật sắc ký lỏng. Phương pháp đã được thẩm định theo các yêu cầu của AOAC International và ICH. Kết quả thẩm định minh chứng sự phù hợp với ứng dụng dự kiến.

Tài liệu tham khảo

1. W.Liu, H.Wang, W.Yao, X. Gao (2010), Characterization and antioxidant activity of two low-molecular-weight polysaccharides purified from the fruiting bodies of *Ganoderma lucidum*, *International Journal of Biological Macromolecules*, 46(4), pp. 451-457
2. J.M. Lin, C. C. Lin, H.F. Chiu, J.J. Yang, S.G. Lee (1993), Evaluation of the anti-inflammatory and liver-protective effects of *Anoetochillus*, *Ganoderma lucidum* and *Gynostemma pentaphyllum* in rats, *American Journal of Chinese Medicine*, 21 (1), pp. 59-69
3. T.V. Lasukova, L.N. Maslov, A.G. Arbuzov, V.V. Burkova, L.I. Inisheva (2015), Cardioprotective activity of *Ganoderma lucidum* extract during total ischemia and reperfusion of isolated heart, *Bulletin of Experimental Biological Medicine*, 158 (6), pp. 739-741
4. Q. Liu, L. Tie (2019), Preventive and therapeutic of *Ganoderma* (Lingzhi) on diabetes, *Advanced Experimental Medicinal Biology*, 1182, pp. 201-215.
5. United States Pharmacopoeia-National Formulation (2020), *Ganoderma Lucidum* Fruiting Body, USP43-NF38, Electronic version
6. United States Pharmacopoeia-National Formulation (2020), *Ganoderma Lucidum* Fruiting Body Powder, USP43-NF38, Electronic version
7. AOAC International (2012), "Guidelines for standard method performance requirements, Appendix F", *AOAC Official Methods of Analysis*.
8. International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use (1994), Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2(R1).
9. Do Thi Ha, et. al. (2015), An Improved HPLC-DAD Method for Quantitative Comparisons of Triterpenes in *Ganoderma lucidum* and Its Five Related Species Originating from Vietnam, *Molecules*, 20, pp. 1059-1077.

Summary

A simple and accurate high performance liquid chromatography (HPLC) method was developed and validated for determination of ganoderic acid A in sporoderm-broken spores of *Ganoderma lucidum* (Lingzhi). The method was carried out on a C_{18} column (4.6 mm $\times$ 250 mm, 5 mm), using an acetonitrile – 0.1% trifluoroacetic acid solution mixture with composition varying following a gradient program as mobile phase. The mobile phase flow rate was maintained at 1.0 mL per minute. Injection volume was 10 μ L. The UV detection was set at 256 nm. The method was validated in terms of linearity, specificity, precision and percentage recoveries. Validation results proved that the proposed method was suitable for determining the content of ganoderic acid A in sporoderm-broken spores of *Genoderma lucidum*.

(Ngày nhận bài: 18/05/2022; Ngày phản biện: 18/05/2022; Ngày duyệt đăng: 09/06/2022)

* Nghiên cứu này được tài trợ bởi Sở Khoa học và Công nghệ TP. Hồ Chí Minh (DOST HCMC) cho TS Nguyễn Hữu Lạc Thủy, tại Quyết định số 888/QĐ-SKHCN và Hợp đồng số 66/2020/HD-QPTKHCN.

NGHIÊN CỨU XÂY DỰNG QUY TRÌNH XÁC ĐỊNH CHẤT CHỐNG CÔN TRÙNG DELTAMETHRIN TRONG MÀN SẢN XUẤT TỪ NHỰA BẰNG SẮC KÝ LỎNG HIỆU NĂNG CAO (HPLC)

BÙI THỊ LAN PHƯƠNG, PHẠM THỊ HIỀN✉

Trường Đại Học Dược Hà Nội

Từ khoá: HPLC hấp phụ, deltamethrin, màn netprotect, thẩm định phương pháp

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Ở nước ta công tác phòng chống dịch bệnh do côn trùng nói chung và muỗi nói riêng gây ra là một nhiệm vụ rất quan trọng. Trong số các nhóm hóa chất được Bộ Y tế cho phép sử dụng nhằm mục đích làm giảm tác hại của côn trùng, các pyrethroid tổng hợp là một nhóm hợp chất được sử dụng phổ biến. Trong điều kiện sử dụng bình thường, các pyrethroid tổng hợp an toàn cho người thực hiện biện pháp và người ở trong nhà được can thiệp hóa chất để phòng chống côn trùng truyền bệnh [1].

Trong nhóm pyrethroid tổng hợp, deltamethrin (DEL) được sử dụng phổ biến với nhiều ưu điểm, DEL đã được đưa trực tiếp vào nhựa polyetylen (PE) theo công nghệ mới để sản xuất màn chống muỗi do đó có thể sử dụng được nhiều lần trong thời gian dài do DEL được giải phóng từ từ [2]. Tuy nhiên, hàm lượng DEL phải được kiểm soát sao cho vừa có khả năng diệt côn trùng vừa không gây độc cho người sử dụng.

Nghiên cứu này được tiến hành để xây dựng quy trình định lượng DEL trong loại màn Netprotect - loại màn có tính ứng dụng cao, mang lại hiệu quả tốt - DEL liên kết với sợi PE.

2. THỰC NGHIỆM

2.1. Thiết bị, hoá chất, chất chuẩn

2.1.1. Thiết bị, dụng cụ:

- Hệ thống HPLC Thermo – Finigan, detector UV-DAD 6000 (Mỹ); Cột sắc ký Thermo Hypersil silica (150 × 4,6 mm; 5 µm).

- Bộ bốc hơi dung môi khí N₂: Thermo scientific (Mỹ)
- Máy siêu âm: Bandelin- Sonorex super RK 106, Đức
- Cân phân tích Mettler, độ chính xác 0,1mg (Thụy Sĩ).

2.1.2: Hoá chất, thuốc thử, chất chuẩn

- **Chất đối chiếu:** DEL 99,9 % (Merck – Đức).
- **Hoá chất:** n-Hexan và 1,4-Dioxan loại dùng cho

HPLC của Merck, Đức; Xylen tinh khiết phân tích của Trung Quốc.

2.2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Đối tượng nghiên cứu:

Các mẫu màn Netprotect chống muỗi mua trên thị trường và được mã hóa số kiểm soát 1058; 1540S1; 1540S2; 1544S1; 1544S2; 1545S1; 1545S2; 1553S1; 1553S2.

2.2.2. Phương pháp nghiên cứu

Trong nghiên cứu này mẫu thử được chiết bằng kỹ thuật chiết lỏng – rắn với dung môi xylen: Cân chính xác khoảng 0,25 g màn đã được cắt nhỏ vào bình cầu và thêm khoảng 15 ml xylen. Đun hồi lưu tại 130 - 145 °C trong 1 giờ (mẫu thử phải tan hoàn toàn) [3]. Để nguội bình đến nhiệt độ phòng cho nhựa đông đặc trở lại. Cân bình. Lọc dịch chiết qua màng lọc 0,45 µm. Cân chính xác khoảng 0,5 g dịch lọc cho vào lọ và cô bằng luồng khí N₂. Lấy chính xác 1 ml dung môi pha động cho vào mỗi lọ, đậy nắp và siêu âm 5 phút (cân lọ trước và sau khi siêu âm để hiệu chỉnh). Tiêm vào hệ thống sắc ký.

DEL trong mẫu thử được định lượng bằng phương pháp HPLC, kết quả được tính theo phương trình hồi quy của ngày phân tích.

Điều kiện sắc ký: Cột sắc ký Thermo Hypersil silica (150 × 4,6 mm; 5 µm). Tốc độ dòng 1 ml/phút; thể tích tiêm mẫu 20 µl. Bước sóng phát hiện 236 nm (cực đại hấp thụ của DEL). Pha động gồm n-hexan và 1,4-dioxan với các tỷ lệ 93 : 7; 95 : 5; 97 : 3 (tt : tt) [3], [4], [8].

Theo tiêu chuẩn của WHO, hàm lượng DEL trong màn Netprotect là 1,8 g/kg ± 25 % (hay trong khoảng 1,35 - 2,25 mg/g) [5], [6].

3. KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN

DEL trong màn có thể được định lượng bằng phương pháp sắc ký khí (GC), HPLC pha đảo hoặc HPLC hấp phụ. Phương pháp HPLC hấp phụ được lựa chọn để

khảo sát điều kiện định lượng do đây là phương pháp được dùng nhiều với đối tượng nền PE với tính chọn lọc cao, khả năng tách tốt (phân tách được đồng phân lập thể) và tránh hiện tượng chuyển hóa lập thể một phần DEL như trong GC.

3.1. Khảo sát điều kiện định lượng DEL

3.1.1. Quy trình xử lý mẫu

Qua tham khảo tài liệu và khảo sát thực tế, quy trình xử lý mẫu được xây dựng được như mục 2.2.2. Trong đó, quy trình này sử dụng xylen làm dung môi chiết vì dung môi này có khả năng hòa tan tốt DEL ở cả nhiệt độ phòng và nhiệt độ cao và hòa tan hoàn toàn màn PE khi đun nóng ở nhiệt độ cao khoảng 145 °C. Đồng thời sau khi đun nóng, để nguội về nhiệt độ phòng, phần nhựa bị đông đặc trở lại còn toàn bộ DEL trong màn đã chuyển sang pha chiết lỏng. Như vậy, với quy trình xử lý mẫu đã sử dụng, vừa hòa tan mẫu màn trong xylen ở nhiệt độ cao, vừa kiểm soát và hạn chế lượng dung môi chiết bị bay hơi.

3.1.2. Khảo sát điều kiện sắc ký

Từ các điều kiện sắc ký tham khảo, tiến hành khảo sát mẫu phân tích. Kết quả cho thấy với tỷ lệ n-hexan : 1,4-dioxan là 93 : 7 pic tách chưa hoàn toàn, với tỷ lệ 95 : 5 cho kết quả tách tốt. Pic tách được riêng biệt, rõ nét, cân đối, thời gian phân tích hợp lý (hình 1C). Còn tỷ lệ 97 : 3 pic tách rời nhau hoàn toàn nhưng kéo dài thời gian lưu gây tổn dung môi, hóa chất. Do đó lựa chọn tỷ lệ pha động n-hexan : 1,4-dioxan là 95 : 5.

Bước sóng phát hiện được lựa chọn ở 236 nm vì tại bước sóng này, DEL hấp thụ tương đối tốt và giảm thiểu lượng pic sắc ký của các chất không phải chất phân tích trong sắc ký đồ. Tốc độ dòng và thể tích tiêm được lựa chọn theo các điều kiện thông thường của HPLC, tương ứng là 1,0 ml/phút và 20 μ l.

3.2. Thẩm định phương pháp phân tích

3.2.1. Đánh giá độ phù hợp của hệ thống

Pha dung dịch chuẩn DEL gốc 600 μ g/ml: Cân chính xác 15,1 mg chuẩn DEL cho vào bình định mức 25 ml, thêm pha động đến vạch, lắc đều thu được dung dịch chuẩn DEL gốc 604,00 μ g/ml

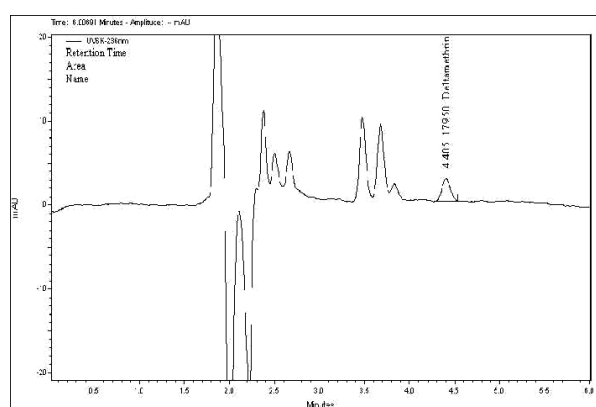
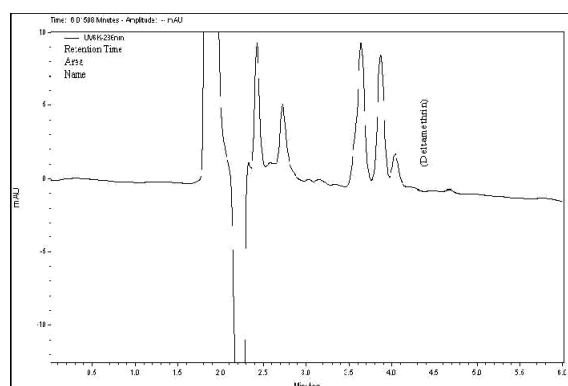
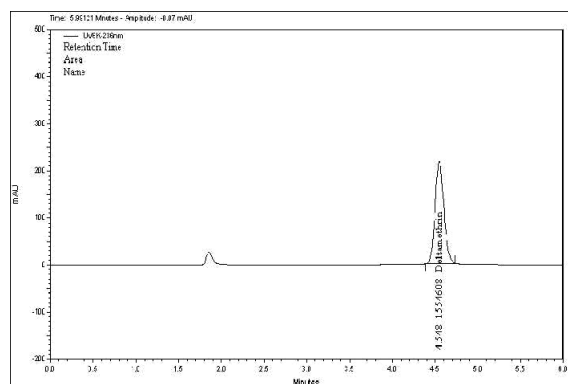
Hút chính xác 300 μ l dung dịch chuẩn gốc DEL 604,00 μ g/ml cho vào bình định mức 10 ml, thêm pha động đến vạch, lắc đều thu được dung dịch chuẩn 18,12 μ g/ml.

Tiến hành sắc ký dung dịch DEL chuẩn nồng độ 18,12 μ g/ml: độ lệch chuẩn tương đối (RSD) của diện tích pic của DEL của 6 lần tiêm liên tiếp không được lớn hơn 2 %. Kết quả cho thấy hệ thống phân tích phù hợp

yêu cầu qui định với RSD = 0,57 %.

Tính số đĩa lý thuyết (N) dựa vào pic DEL, kết quả trung bình N khoảng 9000 đạt yêu cầu quy định với N > 8000.

3.2.2. Tính chọn lọc



Hình 1: Sắc ký đồ dịch chuẩn DEL 6,04 μ g/ml (A), mẫu nền không có DEL (B), mẫu nền có thêm chuẩn DEL 6,04 ng/ml (C)

* Thực nghiệm

Chuẩn bị 3 mẫu chạy sắc ký:

- Mẫu nền không có DEL: Tiến hành theo quy trình xử lý mẫu thử với màn PE không chứa DEL

- *Mẫu chuẩn DEL 6 µg/ml*: Hút chính xác 100 µl dung dịch chuẩn 604,00 µg/ml cho vào bình định mức 10 ml, thêm pha động đến vạch, lắc đều thu được dung dịch chuẩn DEL 6,04 µg/ml.

- *Mẫu nền có thêm chuẩn DEL*: Hút chính xác 20 µl dung dịch chuẩn 6,04 µg/ml cho vào bình định mức 20 ml, thêm pha động đến vạch, lắc đều thu được dung dịch chuẩn có nồng độ 6,04 ng/ml. Cân dịch chiết mẫu nền vào lọ, cô cạn. Sau đó cho thêm 1 ml dung dịch DEL chuẩn 6 ng/ml rồi đem đi siêu âm. Tiến hành sắc ký.

* **Kết quả**: Mẫu thử thêm chuẩn cho pic chính có thời gian lưu tương ứng với thời gian lưu của pic chính trên sắc ký đồ của mẫu chuẩn. Mẫu placebo không cho pic xuất hiện ở thời gian lưu của pic chính trên sắc ký đồ mẫu chuẩn (Hình 1).

* **Nhận xét**: Như vậy phương pháp là đặc hiệu để định lượng DEL trong mẫu màn nghiên cứu.

3.2.3. Khoảng nồng độ tuyến tính

Pha từ dung dịch chuẩn gốc 604 µg/ml thành các dung dịch DEL có nồng độ 6,04; 12,08; 18,12; 24,16; 30,20 µg/ml. Tiến hành sắc ký. Thiết lập mối tương quan giữa diện tích pic và nồng độ DEL. Kết quả được trình bày ở bảng 1.

Bảng 1. Kết quả khảo sát độ tuyến tính

STT	Nồng độ (µg/ml)	Diện tích pic (mAU.s)
1	6,04	1396547
2	12,08	2764376
3	18,12	4128052
4	24,16	5482618
5	30,20	6709792
Phương trình hồi quy	$Y = 222412X + 92857$	
Hệ số tương quan R	0,9996	

Như vậy trong khoảng nồng độ phân tích từ 6 µg/ml đến 30 µg/ml, phương pháp đáp ứng được độ tuyến tính để định lượng DEL trong mẫu màn.

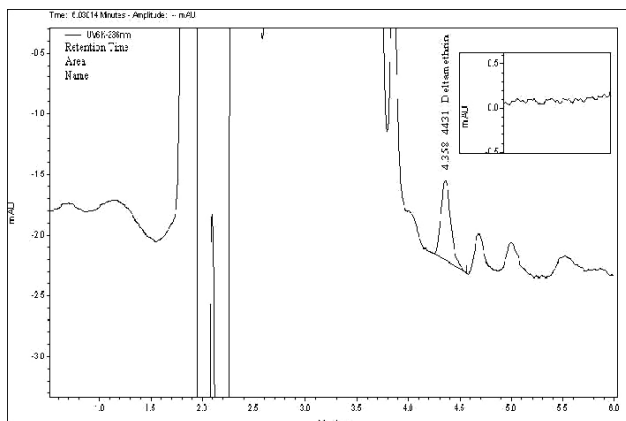
3.2.4. Xác định giới hạn định lượng (LOQ)

- Giới hạn định lượng:

Pha loãng dần chính xác bằng pha động dung dịch chuẩn DEL 6,04 µg/ml đã được pha ở mục 3.1.2. Cân

khoảng 0,5 g dịch chiết mẫu nền vào lọ, cô cạn. Hút chính xác 1 ml các dung dịch DEL chuẩn đã được pha loãng cho vào lọ và đậy nắp, siêu âm. Tiêm sắc ký.

Kết quả thu được tại nồng độ 1,51 µg/ml trên sắc ký đồ có hệ số đáp ứng pic DEL gấp 3 lần độ nhiễu đường nền (Hình 2). Do đó, xác định giới hạn định lượng ở phương pháp này LOD = 1,51 µg/ml.



Hình 2. Sắc ký đồ nền thêm chuẩn DEL 1,5 ng/ml

3.2.5. Độ chính xác

Cân chính xác khoảng 0,25 g (m_t) mẫu thử và tiến hành xử lý theo mục 3.1.1, tiêm sắc ký. Lặp lại thí nghiệm 6 lần. Hàm lượng DEL trong mẫu được tính theo công thức:

$$C_{Del} (g/kg) = (C_t \times m_{dc}) / (1000 \times m_c \times m_t)$$

Trong đó:

+ C_{Del} : hàm lượng dung dịch DEL trong mẫu thử;

+ C_t : hàm lượng dung dịch tính theo phương trình hồi quy của đường chuẩn xây dựng trong ngày;

+ m_{dc} : khối lượng dịch chiết sau khi đun;

+ m_c : khối lượng dịch lọc cân phân tích; m_t : khối lượng mẫu thử.

3.2.5.1. Độ lặp lại

Tiến hành phân tích ở mức 100 % với 6 lần cân mẫu thử độc lập tính toán hàm lượng DEL tìm được và đánh giá độ phân tán của số liệu. Kết quả thể hiện ở bảng 4 cho thấy phương pháp có độ lặp lại tốt: RSD (%) < 2,0 %

Kết quả thu được cho thấy phương pháp định lượng DEL có độ lặp lại tốt với RSD (%) = 1,45 % đáp ứng yêu cầu thẩm định đối với dung dịch có hàm lượng 10 µg/ml là RSD (%) ≤ 7,3 % [7].

3.2.5.2. Độ chính xác trung gian

Đánh giá dựa trên độ phân tán (RSD (%)) của 12 mẫu thử được phân tích riêng biệt giữa 2 ngày khác nhau, kết quả thể hiện ở bảng 4 và bảng 5

Bảng 4. Kết quả khảo sát độ lặp lại và độ chính xác trung gian của 2 ngày phân tích

Ngày phân tích 1						Ngày phân tích 2:				
PTHQ: Y= 222412X +92857						PTHQ: Y= 238722X +99667				
R = 0,9996						R =0,9996				
STT	m _t (g)	m _{dc} (g)	m _c (g)	S (mAU.s)	Hàm lượng DEL (mg/g)	m _t (g)	m _{dc} (g)	m _c (g)	S (mAU.s)	Hàm lượng DEL (mg/g)
1	0,2530	101,770	0,5120	3706600	1,277	0,2540	100,023	0,5021	3824801	1,224
2	0,2553	110,646	0,5075	3438629	1,285	0,2551	108,790	0,5042	3488629	1,201
3	0,2516	98,175	0,5141	3923223	1,307	0,2502	112,739	0,5012	3395124	1,241
4	0,2520	112,178	0,5023	3268445	1,265	0,2531	102,231	0,5114	3699821	1,191
5	0,2508	109,099	0,5012	3296419	1,250	0,2497	99,852	0,5089	3766419	1,207
6	0,2500	101,361	0,5055	3639724	1,279	0,2519	107,720	0,5055	3422361	1,177
TB					1,277	TB				1,207
RSD (%)					1,50%	RSD (%)				1,89%
TB = 1,242 (mg/g); RSD(%) = 3,37 % (n=12)										
So sánh độ lặp lại của 2 dãy thí nghiệm : F _{tn} = 1,426 < 5,05 = Flt (α = 0,95; 5; 5)										

Kết quả cho thấy phương pháp đạt yêu cầu về độ chính xác trung gian: RSD của 12 mẫu phân tích không quá 11 % [7] và không có sự sai khác thống kê về kết quả trung bình và độ lặp lại giữa 2 bộ số liệu.

3.2.6. Độ đúng

Hút chính xác các thể tích dung dịch chuẩn DEL gốc 600 µg/ml vào mẫu màn trắng sao cho lượng DEL thêm ở mức 70 % - 100 % - 130% lượng DEL có trong mẫu màn theo yêu cầu của WHO và nồng độ đem định lượng nằm trong khoảng tuyến tính.

Bảng 5. Kết quả khảo sát độ đúng

STT	V _{chuẩn gốc} (µl)	m _{dc} (g)	m _c (g)	S (mAU.s)	m _{tìm lại} (mg)	%Tìm lại	TB	RSD (%)
1	550	10,0023	0,5046	3334801	0,289	87,56	87,20	1,68
2	550	10,0125	0,5007	3234565	0,282	85,60		
3	550	10,1265	0,5056	3334582	0,292	88,46		
4	750	10,0027	0,512	4765320	0,410	91,21	91,14	0,68
5	750	10,1204	0,5085	4705365	0,413	91,72		
6	750	9,9581	0,5028	4665882	0,407	90,49		
7	1000	10,0556	0,5123	6259220	0,544	90,70	89,81	0,85
8	1000	10,5368	0,5089	5852471	0,536	89,36		
9	1000	10,2275	0,5201	6158210	0,536	89,38		

Kết quả thu được ở bảng 5 cho thấy phương pháp đảm bảo về độ đúng. Tỷ lệ thu hồi nằm trong khoảng 87,53 % - 91,19 % thỏa mãn yêu cầu tỷ lệ thu hồi nằm trong khoảng 80 % - 110 % đối với dung dịch phân tích có nồng độ 10 µg/ml [7].

*** Nhận xét**

Qua các bước thẩm định cho thấy phương pháp được chọn có độ chính xác, tính chọn lọc, độ đúng cao; khoảng nồng độ tuyến tính phù hợp với mục đích phân tích. Do đó, phương pháp phân tích có độ tin cậy cao có thể sử dụng. Sau đây, tiến hành phân tích một số mẫu

thực theo phương pháp đã được thẩm định.

3.2 Kết quả phân tích một số mẫu chứa DEL

Tiến hành phân tích một số mẫu màn Netprotect theo qui trình xử lý mẫu và điều kiện sắc ký đã xây dựng ở trên. Kết quả trình bày ở bảng 6.

Bảng 6. Kết quả định lượng DEL trong mẫu thực

Kí hiệu mẫu	m_t (g)	m_{dc} (g)	m_c (g)	S (mAU.s)	Nồng độ DEL trong mẫu (mg/g)
1540S1	0,2514	11,6816	0,5013	2987992	1,211
1540S2	0,2527	11,0423	0,5098	3057081	1,146
1544S1	0,2504	11,8085	0,5084	3338314	1,357
1544S2	0,2500	12,1128	0,5012	3872987	1,645
1545S1	0,2532	12,1803	0,5055	2438117	1,009
1545S2	0,2512	11,6102	0,5073	3303393	1,318
1553S1	0,2545	11,7437	0,5052	3403970	1,363
1553S2	0,2575	12,0683	0,5054	2667532	1,079
1058	0,2516	12,2541	0,5035	3603675	1,529

Theo tiêu chuẩn của WHO, hàm lượng DEL trong màn Netprotect là $1,8 \text{ g/kg} \pm 25\%$ [5], [6]. Kết quả ở bảng trên cho thấy, trong tổng số 9 mẫu màn đem định lượng, có 4 mẫu màn gồm 1544S1; 1544S2; 1553S1; 1058 có nồng độ DEL thỏa mãn tiêu chuẩn, 5 mẫu màn còn lại có nồng độ DEL thấp hơn quy định.

3.3. Bàn luận

Phương pháp định lượng tìm được có tính chính xác và khả thi cao, với nhiều ưu điểm:

+ Quy trình chiết nhanh gọn, thời gian hợp lí, hiệu suất cao, dung môi chiết rẻ tiền dễ kiếm.

+ So với *iso*-octan, pha động sử dụng *n*-hexan thay thế giúp giảm chi phí, thời gian phân tích mà vẫn đảm bảo tách tốt DEL khỏi tạp chất.

Bước đầu áp dụng phương pháp phân tích một số

mẫu thực cho thấy phương pháp có tính khả thi và cần thiết.

4. KẾT LUẬN

Xây dựng được phương pháp sắc ký lỏng hấp phụ để định lượng dethamethrin trong màn Netprotect. Phương pháp sử dụng cột C18 ($150 \times 4,6 \text{ mm}$; $5 \mu\text{m}$), tốc độ dòng $1,0 \text{ ml/phút}$, thể tích tiêm $20 \mu\text{l}$, bước sóng phát hiện 236 nm , pha động *n*-hexan : 1,4-dioxan là 95 : 5. Phương pháp đã được thẩm định về tính đặc hiệu, tính thích hợp của hệ thống sắc ký, độ lặp lại, độ chính xác trung gian và tỷ lệ thu hồi. Kết quả thẩm định cho thấy phương pháp HPLC hấp phụ đã xây dựng hoàn toàn phù hợp cho việc định lượng DEL tẩm trong màn Netprotect. Bước đầu đã áp dụng phân tích một số mẫu màn chứa DEL trên thị trường.

Tài liệu tham khảo

1. CDC Ninh Bình (2018), Sử dụng hóa chất diệt côn trùng để phòng chống dịch bệnh, (<http://cdc.ninhbinh.gov.vn/tin-tuc-su-kien/tin-trong-nuoc/su-dung-hoa-chat-diet-con-trung-de-phong-chong-dich-benh.html>).
2. Chow-Yang Lee and William H. Robinson (2005), Technology for Conversion of Conventional Mosquito in The Field into long lasting bed nets, *Proceedings of the Fifth International Conference on Urban Pests*, Perniagaan Ph'ng @ P&Y Design Network, Malaysia, pp. 288-294.
3. IPCS International Programme on Chemical Safety (1990), Environmental health criteria 97-Deltamethrin, World Health Organization, Geneva, pp. 12-15.
4. World Health Organization (1989), Technical Deltamethrin, WHO/SIT/24.R1., pp. 50-55.

5. WHO specifications and evaluations for public health pesticides (2010), Deltamethrin long-lasting (incorporated into filaments) insecticidal net.
6. World Health Organization (2010), Netprotect® specifications, (<http://www.bestneteurope.com/Products/Netprotect/Specifications.aspx>).
7. Ludwig Huber (2007), Validation and Qualification in Analytical Laboratories, Informa Healthcare USA, Inc, pp.125-155.
8. CIPAC Collaborative international pesticides analytical council limited, Determination of deltamethrin in PermaNet® by high performance liquid chromatography.

Summary

A rapid, simple, sensitive and accurate high – performance liquid chromatographic method was developed and validated for determination of deltamethrin in Netprotect net. Deltamethrine was extracted from finely cut nets by xylene heating at 130-145 °C in 1 hour; the solvent was then evaporated to dryness and the residues reconstituted in mobile phase for HPLC analysis. The HPLC method employed a Thermo Hypersil silica column (150 × 4.6 mm; 5 µm) with a mixture of n-hexan - 1,4-dioxan (95 : 5, v/v) maintaining at flow rate of 1.0 ml/min as mobile phase. The injection volume was 20 µl and the UV-Vis detector was set at wavelength of 236 nm for recording chromatograms.

The method was validated in terms of specificity, linearity, precision and accuracy according to current international requirements, and was proved as suitable and reliable for intended application. The method was applied to determine the content of deltamethrin in 9 samples of commercialized Netprotect nets, in which 5 samples were found containing levels of deltamethrine lower than the acceptance range.

(Ngày nhận bài: 01/06/2022; Ngày phản biện: 01/06/2022; Ngày duyệt đăng: 22/06/2022)

XÂY DỰNG VÀ THẨM ĐỊNH PHƯƠNG PHÁP ĐỊNH LƯỢNG RABEPRAZOL TRONG VIÊN NÉN BAO TAN TRONG RUỘT

NGÔ QUANG TRUNG, BÙI THỊ LAN PHƯƠNG✉

Trường Đại học Dược Hà Nội

Từ khoá: *rabeprazole, sắc ký lỏng hiệu năng cao pha đảo (HPLC RP), thẩm định phương pháp*

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Rabeprazol (RABE) là một thuốc trong nhóm thuốc ức chế bơm proton (PPI) thế hệ sau được sử dụng trong điều trị các bệnh do vi khuẩn H. Pylory gây ra. Với ưu điểm có pKa cao (~5,0, độ pH kích hoạt khoảng 50 % bơm proton) nên các phân tử được kích hoạt hoạt động ở pH cao nhanh hơn và nhiều hơn các PPI [1]. Rabeprazol ít nhạy cảm và không chịu ảnh hưởng bởi tính đa hình của các isoenzym Cyp2 C19 của cytochrom P450 nên con đường chuyển hoá của nó dễ được dự đoán hơn các PPI khác. Đồng thời, rabeprazol không thải trừ qua Cyp2 C19 ở gan nên hiệu quả điều trị cũng ổn định hơn [2], [3]. Do đó, rabeprazol trong thời gian gần đây đang được sử dụng rộng rãi trong lâm sàng để điều trị các bệnh về acid dạ dày và H. pylory [4].

Hiện nay, có nhiều phương pháp được sử dụng để định lượng rabeprazol trong nguyên liệu và chế phẩm, như sử dụng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) pha đảo, phương pháp đo quang phổ hồng ngoại (UV-Vis), điện di mao quản... [5],[6],[7],[8]... Tuy vậy, các phương pháp này hiện vẫn còn một số vấn đề như: trong các dược điển, chỉ đưa ra phương pháp định lượng trong nguyên liệu bằng HPLC nhưng sử dụng chương trình pha động gradient [5] không thuận lợi trong việc triển khai phân tích thường quy; các phương pháp định lượng dùng UV-Vis hay điện di mao quản chưa thích hợp trong việc triển khai tại nhiều phòng phân tích, kiểm nghiệm vì độ tin cậy chưa cao, phụ thuộc nhiều vào nền mẫu. Nghiên cứu này được tiến hành nhằm mục đích đưa ra một phương pháp định lượng đơn giản và hiệu quả để có thể áp dụng định lượng rabeprazol trong

viên nén sử dụng trong kiểm soát quy trình bào chế và kiểm nghiệm chế phẩm bào chế được.

2. THỰC NGHIỆM

2.1. Thiết bị, hóa chất và chất chuẩn

2.1.1. Thiết bị và dụng cụ: Đã được hiệu chuẩn theo GLP

- Máy sắc ký lỏng Agilent 1260 Infinity với detector PDA.

- Máy sắc ký lỏng Shimadzu 20A với detector PDA.

- Cân phân tích Mettler-Toledo AB204, độ chính xác 0,1 mg.

- Các dụng cụ thủy tinh cần thiết.

2.1.2. Hóa chất, chất chuẩn

- Chất chuẩn: chuẩn đối chiếu rabeprazol natri của Viện Kiểm nghiệm Thuốc TP Hồ Chí Minh, hàm lượng 92,9 % (nguyên trạng), số lô: QT226 040619;

- Hoá chất: Methanol (MeOH); Acetonitril (MeCN), kali dihydrophosphat (KH_2PO_4), natri hydroxyd (NaOH) đạt tiêu chuẩn tinh khiết dùng cho phân tích hoặc cho HPLC.

2.2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Đối tượng nghiên cứu

- Mẫu thử: viên nén Rabeprazol 20 mg bao tan trong ruột, số lô 0422L02, ngày sản xuất 20/04/2022 (Viện Công nghệ Dược phẩm Quốc gia).

- Mẫu placebo (mẫu trắng): có các thành phần như viên nén rabeprazol 20 mg bao tan trong ruột nhưng không chứa rabeprazol.

2.2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.2.1. Điều kiện sắc ký [8]

- Cột sắc ký HPLC Zorbax Eclipse XDB-C18 (150 x 4,6 mm, 5 μm) và cột Phenomenex Gemini C18 (150 x 4,6 mm, 5 μm).

- Tốc độ dòng: 1,0 ml/phút

- Detector: 284 nm

- Pha động: acetonitril : methanol : đệm KH_2PO_4 pH 7,2 (25 : 25 : 50)

- Thể tích tiêm: 10 μl

2.2.2.2. Phương pháp chuẩn bị mẫu

- Dung môi hòa tan (DMHT): MeOH và MeCN tỷ lệ 1 - 1.

- *Dung dịch thử*: Cân chính xác lượng mẫu chứa 40 mg rabeprazol (RABE) cho vào bình định mức 100 ml. Thêm khoảng 50 ml DMHT, lắc siêu âm trong 15 phút, thêm đệm pH 7,2 đến vạch. Lấy chính xác 5 ml dung dịch này cho vào bình định mức 50 ml, định mức bằng dung môi pha động, lọc qua màng lọc 0,45 μm .

- *Dung dịch chuẩn gốc*: Cân chính xác khoảng 40 mg chất chuẩn rabeprazol vào bình định mức 100 ml, thêm khoảng 50 ml DMHT, lắc siêu âm 10 phút cho tan hoàn toàn, bổ sung đệm pH 7,2 vừa đủ đến vạch, lắc đều.

- *Đường chuẩn*: Từ dung dịch chuẩn gốc pha các dung dịch chuẩn nồng độ 20 $\mu\text{g/ml}$, 30 $\mu\text{g/ml}$, 40 $\mu\text{g/ml}$, 50 $\mu\text{g/ml}$, 60 $\mu\text{g/ml}$ bằng pha động.

- Xác định nồng độ RABE trong các mẫu dựa vào diện tích RABE thu được từ sắc ký đồ mẫu và đường chuẩn phân tích trong cùng điều kiện.

3. KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN

Nghiên cứu được thực hiện trên máy sắc ký lỏng Agilent 1260 Infinity với detector PDA và cột sắc ký HPLC Zorbax Eclipse XDB-C18 150 x 4,6 mm, 5 μm .

Tham khảo từ tiêu chuẩn định lượng rabeprazol trong nguyên liệu của USP 42 [5], trong nghiên cứu này tiến hành định lượng rabeprazol trong viên nén bằng HPLC-DAD đẳng dòng với thành phần pha động acetonitril : methanol : đệm KH_2PO_4 pH 7,2 (25 : 25 : 50) tốc độ 1,0 ml/phút.

3.1. Tính thích hợp hệ thống

Tiến hành phân tích 6 lần mẫu chuẩn nồng độ 40 $\mu\text{g/ml}$. Ghi lại các giá trị diện tích pic, thời gian lưu và hệ số kéo đuôi Tailing factor (T), tính độ lệch chuẩn tương đối (RSD) theo yêu cầu. Kết quả trình bày ở Bảng 1.

Bảng 1. Kết quả đánh giá tính thích hợp hệ thống

Lần đo	Diện tích pic (mAU.s)	Thời gian lưu (phút)	T
1	937,8	2,760	1,135
2	936,4	2,768	1,151
3	940,7	2,782	1,159
4	923,6	2,765	1,112
5	928,3	2,775	1,152
6	926,7	2,776	1,163
TB	932,3	2,771	1,145
RSD (%)	0,74	0,29	

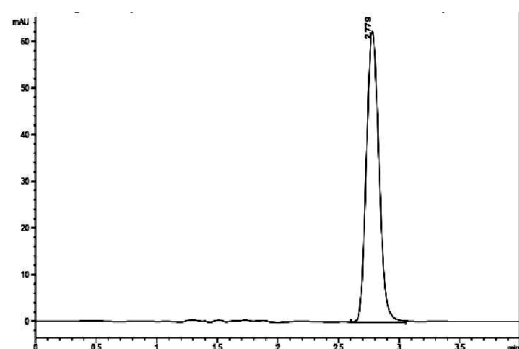
Kết quả cho thấy hệ thống có độ ổn định tốt: RSD diện tích pic (%) < 2 %; RSD thời gian lưu (%) < 1 %; T < 2; đạt yêu cầu về tính thích hợp của hệ thống, đảm bảo cho việc định lượng RABE để phân tích trong chế phẩm.

3.2. Độ đặc hiệu

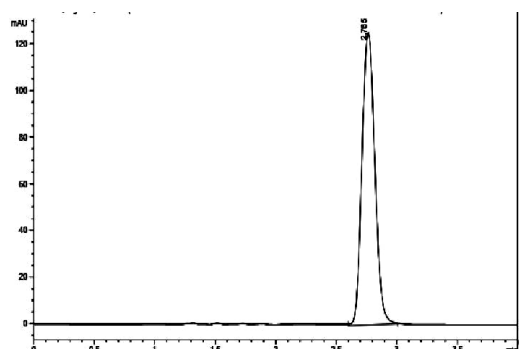
Tiến hành phân tích các mẫu trắng, mẫu đối chiếu chứa RABE và mẫu thử theo phương pháp đã xây dựng và ghi lại sắc ký đồ (SKĐ) (hình 1).



Mẫu placebo



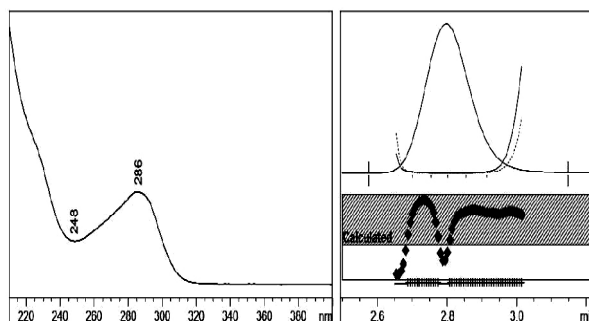
Mẫu đối chiếu 20 µg/ml



Mẫu thử

Hình 1. Sắc ký đồ độ đặc hiệu (HPLC Agilent 1260)

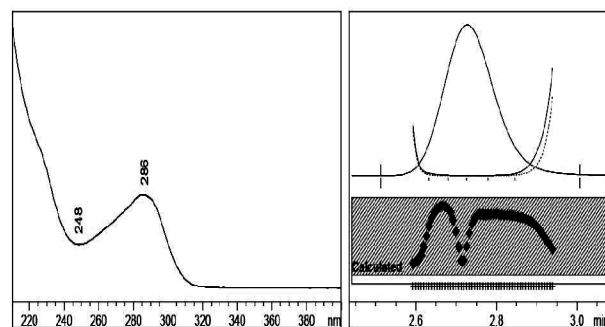
Trên SKĐ của mẫu đối chiếu và mẫu thử (hình 1) xuất hiện pic tại thời điểm 2,7 phút của RABE. SKĐ của mẫu placebo (Hình 1) không xuất hiện các pic tại thời điểm trên.



-> The purity factor exceeds the calculated threshold limit. <-

Purity factor : 999.968 (46 of 55 spectra exceed the calculated threshold limit
Threshold : 999.987 (Calculated with 46 of 55 spectra)

Phổ hấp thụ UV-Vis chất đối chiếu
và độ tinh khiết tính toán



-> The purity factor exceeds the calculated threshold limit. <-

Purity factor : 999.979 (53 of 53 spectra exceed the calculated threshold limit
Threshold : 999.987 (Calculated with 53 of 53 spectra)

Phổ hấp thụ UV-Vis chất đối chiếu
và độ tinh khiết tính toán

Tham chiếu phổ hấp thụ UV-Vis tại thời điểm pic 2,7 phút của mẫu chất đối chiếu và mẫu thử cho thấy cả 2 phổ hấp thụ tương đồng và có đỉnh – vực hấp thụ trùng nhau (286 248 nm) cũng như độ tinh khiết tính toán (purity) của pic tại thời điểm 2,7 phút đều trên 99,99 %.

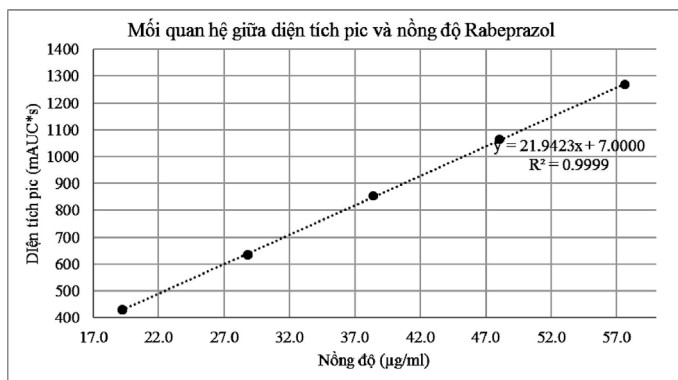
Do vậy, phương pháp phân tích có độ đặc hiệu – chọn lọc với RABE để phân tích trong chế phẩm.

3.3. Độ tuyến tính

Phân tích các dung dịch chuẩn chứa RABE có nồng độ từ 20 đến 60 µg/ml. Xác định sự tương quan giữa nồng độ RABE trong mẫu và diện tích pic tương ứng thu được trên SKĐ bằng phương pháp hồi quy tuyến tính. Kết quả xác định mối tương quan này được trình bày ở Bảng 2.

Bảng 2. Kết quả thẩm định độ tuyến tính

STT	% so với định lượng	Lượng cân chuẩn (mg)	Độ pha loãng	Nồng độ (µm/ml)	Diện tích pic (mAU,s)
1	50	41,3	100 x 1,0/20	19,2	428,5
2	75		100 x 1,5/20	28,8	635,8
3	100		100 x 2,0/20	38,4	853,1
4	125		100 x 2,5/20	48,0	1064,3
5	150		100 x 3,0/20	57,6	1267,9
Phương trình hồi quy (PTHQ): Y = 21,942*X + 7,000					
R = 0,99995; tỷ lệ hệ số chặn/mức 100 % nồng độ = 0,8 %					



Hình 2. Đồ thị khảo sát sự tương quan tuyến tính giữa nồng độ và diện tích pic

Kết quả thẩm định cho thấy, trong khoảng nồng độ từ 20 đến 60 $\mu\text{g/ml}$ của RABE có sự tương quan tuyến tính giữa nồng độ với diện tích pic của RABE với hệ số tương quan lớn hơn 0,998; tỷ số hệ số chặn với mức 100 % nồng độ < 2 %.

3.4. Độ đúng

Chuẩn bị các mẫu tự tạo bằng phương pháp thêm chuẩn vào các mẫu giả được ở các mức 80 %; 100 % và 120 % so với mức hàm lượng ghi nhãn. Tiến hành phân tích mẫu theo quy trình phân tích, mỗi mức thực hiện 03 mẫu độc lập.

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

Mức	TT	$m_{\text{thêm}}$ (mg)	S_{pic} (mAU.s)	$m_{\text{tìm lại}}$ (mg)	Thu hồi (%)	TB (%)	RSD (%)
80 %	1	33,0	766,8	33,5	101,5	101,2	0,70
	2	32,8	754,2	32,9	100,4		
	3	34,2	797,3	34,8	101,6		
100 %	1	41,2	956,5	41,8	101,4	100,4	0,85
	2	41,0	936,7	40,9	99,7		
	3	42,8	981,1	42,8	100,1		
120 %	1	49,4	1131,6	49,4	99,9	99,9	0,62
	2	49,2	1118,4	48,8	99,3		
	3	51,4	1181,9	51,6	100,5		

Kết quả khảo sát thẩm định độ đúng trình bày ở bảng 3 cho thấy phương pháp có độ đúng đạt yêu cầu: nằm trong khoảng 98 - 102 % và RSD < 2,0 %.

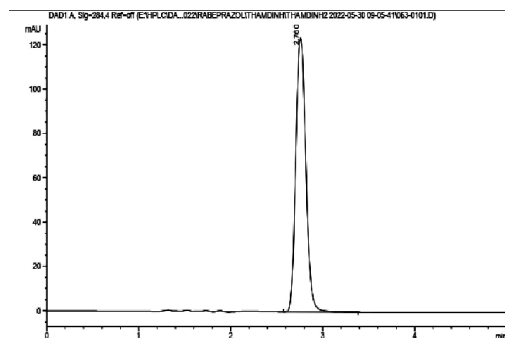
3.5. Khoảng xác định

Từ kết quả độ tuyến tính và độ đúng, khoảng xác định của phương pháp đối với RABE từ 32 đến 48 µg/ml.

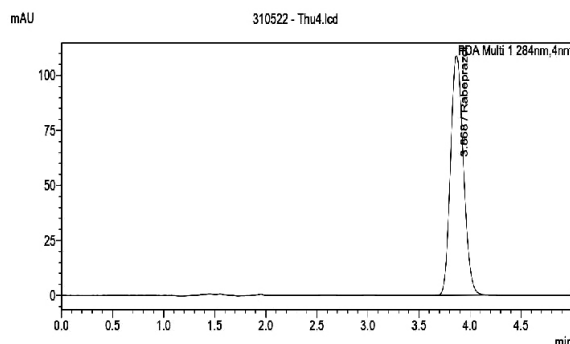
3.6. Độ chính xác

3.6.1. Độ lặp lại

Tiến hành phân tích ở mức 100 % với 6 lần cân mẫu



Máy Agilent 1260



Máy Shimadzu 20A

Hình 3. Sắc ký đồ độ lặp lại trên 2 máy sắc ký HPLC

3.6.2. Độ chính xác trung gian

Đánh giá dựa trên độ phân tán (RSD) của kết quả định lượng 12 mẫu thử được phân tích riêng biệt giữa 2 kiểm nghiệm viên (KNV) khác nhau, ngày phân tích khác nhau trên 2 máy sắc ký HPLC và cột sắc ký khác nhau. Kết quả thể hiện ở bảng 4.

Bảng 4. Kết quả khảo sát độ chính xác

STT	Kiểm nghiệm viên 1			Kiểm nghiệm viên 2		
	HPLC Agilent 1260 Infinity			HPLC Shimadzu 20A		
	Cột sắc ký Zorbax Eclipse XDB-C18			Cột sắc ký C18 (150 x 4,6 mm; 5 μm)		
	C18 (150 x 4,6 mm; 5 μm)					
	PTHQ: y = 22,882x + 0,94			PTHQ: y = 22,485x + 978,6		
	R ² = 0,9996			R ² = 0,9998		
	<i>m_{thử}</i> (g)	<i>S_{pic}</i> (mAU.s)	<i>HL</i> (%)*	<i>m_{thử}</i> (g)	<i>S_{pic}</i> (mAU.s)	<i>HL</i> (%)*
	1	0,3047	971,5	105,1	0,3049	946,976
2	0,3068	976,3	104,9	0,3047	930,568	106,2
3	0,3049	986,9	106,7	0,3053	929,828	105,9
4	0,3050	985,4	106,5	0,3048	933,649	106,5
5	0,3048	987,9	106,8	0,3067	931,469	105,6
6	0,3052	981,0	106,0	0,3049	942,549	107,5
TB = 106,4 %; RSD% = 0,42 % (n = 6)				TB = 106,5 %; RSD % = 0,92 % (n = 6)		
TB = 106,3 %; RSD % = 0,86 % (n = 12)						
So sánh độ lặp lại của 2 dãy thí nghiệm : F _{tn} = 4,861 < 5,05 = Flt (α = 0,95; 5; 5)						
So sánh giá trị trung bình của 2 dãy thí nghiệm: t _{tn} = 0,269 < 2,228 = t _{lt} (α = 0,95; 10)						

* hàm lượng % so với nhãn

Kết quả cho thấy phương pháp đạt yêu cầu về độ chính xác trung gian: không có sự sai khác thống kê về kết quả trung bình và độ lặp lại giữa 2 bộ số liệu khi thay đổi các yếu tố ngày chạy, KNV phân tích, máy sắc ký HPLC và cột sắc ký.

Phương pháp có độ chọn lọc – đặc hiệu cao hơn khi dùng UV-Vis [6]; có độ lặp lại, độ ổn định tốt hơn cũng như dễ phổ biến hơn so với điện di mao quản [7]. Phương pháp dùng chương trình đẳng dòng cho kết quả ổn định hơn khi dùng chương trình biến đổi pha động (gradient) HPLC [5].

4. KẾT LUẬN

Bài báo đã đưa ra được phương pháp định lượng RABE trong viên nén bao tan trong ruột được sản xuất bởi Viện Công nghệ dược phẩm Quốc gia bằng phương pháp HPLC pha đảo. Phương pháp được thẩm định và đáp ứng được các yêu cầu về tính đặc hiệu, độ thích hợp hệ thống, độ tuyến tính, độ đúng, khoảng xác định, độ lặp lại và độ chính xác trung gian theo các qui định của AOAC International. Phương pháp đã xây dựng tin cậy, đơn giản, phù hợp với các điều kiện phân tích tại Việt Nam. Do đó, có thể áp dụng phương pháp này để triển khai kiểm soát hàm lượng rabeprazole trong viên nén bao tan trong ruột được sản xuất tại các cơ sở nghiên cứu, nhà máy sản xuất thuốc.

Tài liệu tham khảo

1. Kromer W, Kruger U, Huber R, et al. (1998), Differences in pH-dependent activation rates of substituted benzimidazoles and biological in vitro correlates, *Pharmacology*, 56, pp. 57–70.
2. Furuta T, Shirai N, Sugimoto M, et al. (2005), Influence of CYP2C19 pharmacogenetic polymorphism on proton pump inhibitor-based therapies, *Drug Metab Pharmacokinet.*, 20, pp. 153–67.
3. Adachi K, Katsube T, Kawamura A, et al. (2000), CYP2C19 genotype status and intragastric pH during dosing with lansoprazole or rabeprazole, *Aliment Pharmacol Ther.*, 14, pp. 1259–66.
4. Fabio Pace, Stefano Pallotta, Stefania Casalini, and Gabriele Bianchi Porro, (2007), A review of rabeprazole in the treatment of acid-related diseases, *Therapeutics and Clinical Risk Management*, 3(3), pp. 363–379.
5. United State pharmacopoeia 42.
6. Nafisur Rahman, Zehra Bano, and Syed Najmul Hejaz Azmi (2008), Quantitative Analysis of Rabeprazole Sodium in Commercial Dosage Forms by Spectrophotometry, *Chem. Pharm. Bull.*, 56(7), pp. 995–1001.
7. Garcia et al., (2005), Validation of a Capillary Electrophoresis Method for Analysis of Rabeprazole Sodium in a Pharmaceutical Dosage Form, *Journal of AOAC International*, Vol. 88, No. 4.
8. Shan Ren, Mi-Jin Park, Hongkee Sah, Beom-Jin Lee (2008), Effect of pharmaceutical excipients on aqueous stability of rabeprazole sodium, *International Journal of Pharmaceutics*, 350, pp. 197–204.
9. European Medicines Agency (1995), Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2 (R1).

SUMMARY

A simple reversed-phase HPLC method was developed for assay of rabeprazole in delayed-release tablets. The HPLC system consisted of a C18 column (150 × 4.6 mm, 5 μm), an mixture of acetonitrile - methanol - phosphate buffer pH 7.2 (25 : 25 : 50, v/v/v) maintaining at flow rate of 1.0 ml per minute as mobile phase, and a diode array detector was set at 284 nm for recording chromatograms of 10 μl of samples. The validation results indicated that in the working range from 32 - 48 μg/ml of rabeprazole, the studied method was satisfied the requirements of specificity, linearity, accuracy and precision according to AOAC international guideline. In short, the developed method was suitable for determining rabeprazole in delayed-release tablets.

(Ngày nhận bài: 03/06/2022; Ngày phản biện: 03/06/2022; Ngày duyệt đăng: 16/06/2022)

THUỐC GIẢ, THUỐC KHÔNG ĐẠT CHẤT LƯỢNG BỊ THU HỒI VÀ THUỐC ĐÃ ĐƯỢC BỘ Y TẾ RÚT SỐ ĐĂNG KÝ TỪ NGÀY 01/12/2021 ĐẾN NGÀY 31/05/2021

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 01/12/2021 đến 31/05/2022 mà Bộ Y tế đã ra văn bản thông báo thuốc giả, thuốc bị thu hồi, rút số đăng ký gồm: 7 thuốc giả, 15 thuốc bị thu hồi và 134 thuốc rút số đăng ký.

(Chỉ tiết về danh mục thuốc xin xem ở bảng dưới đây)

1. Danh mục thuốc giả bị phát hiện từ ngày 01/12/2021 đến ngày 31/5/2022

STT	Tên thuốc	Số lô	Hạn dùng	Tên cơ sở sản xuất và đơn vị nhập khẩu ghi trên nhãn	Văn bản xử lý
1	Stivarga 40mg (film kapli tablet, Regorafenib)	BXJL3D1	04.2024	Bayer Türk Kimya San. Ltd. Şti	Công văn: số 2050/QLD-CL ngày 24/03/2022
2	Xarelto 10mg (film kapli tablet, Rivaroksaban)	9LB04017	04/2022	Như trên	Như trên
3	Xarelto 15mg (film kapli tablet, Rivaroksaban)	BLB02500	03/2024	Như trên	Như trên
4	Xarelto 20mg (film kapli tablet, Rivaroksaban)	ALB08020	11/2023	Như trên	Như trên
5	Actemra® 400mg/20mL	B2101B32		F. Hoffmann-La Roche Ltd, Thổ Nhĩ Kỳ	Công văn: số 2066/QLD-CL ngày 25/03/2022
6	Molnupiravir 400mg			Manufactured by Công ty TNHH, Chi nhánh 1 số 40 đại, P. An Phu, Tx. Thuan An, Tỉnh Binh Duong, Vietnam	Công văn: số 3520/QLD-CL ngày 05/05/2022
7	Voltaren 75mg sulución inyectable	81111	12.2023	Novatis Farmacéutica, S.A Gran Via de les Corra Catalenes, 764 08013 Barcelona	Công văn: số 4261/QLD-CL ngày 25/05/2022

2. Danh mục thuốc bị đình chỉ lưu hành do không đạt chất lượng từ ngày 01/12/2021 đến ngày 31/05/2022

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 Medcardil 5 tablets (Enalapril maleate 5mg)	D90226	20/02/2019	19/02/2022	VN-15971-12	Medley Pharmaceuticals Ltd., India	Công ty cổ phần Dược - Thiết bị Y tế Đà Nẵng (DAPHARCO)	Tạp chất liên quan; Độ cứng	Công văn: số 13170/QLD-CL ngày 28/10/2021	Thu hồi tại các cơ sở kinh doanh được, cơ sở khám bệnh, chữa bệnh trên địa bàn thành phố Hồ Chí Minh và các cơ sở kinh doanh được, cơ sở khám bệnh, chữa bệnh không nằm trên địa bàn TP. Hồ Chí Minh đã mua lô thuốc do công ty TNHH Dược phẩm Hiệp Phát cung cấp (nếu có)
2	Siro Nutrohadi F	030221	24/02/2021	23/02/2024	VD-18684-13	Công ty cổ phần Dược Hà Tĩnh		Định lượng Riboflavin, Thiamin, Hydrochlorid, Tocopherol, acetat	Công văn: số 13749/QLD-CL ngày 18/11/2021	Thu hồi tại các cơ sở kinh doanh được, cơ sở khám bệnh, chữa bệnh trên địa bàn Hà Nội và các cơ sở kinh doanh được, cơ sở khám bệnh, chữa bệnh không nằm trên địa bàn Hà Nội đã mua lô thuốc do công ty TNHH thương mại dược phẩm Gia Hân cung cấp (nếu có)
3	Viên nén bao phim Fexophar 180 (Fexophenadin HCl 180mg)	007-051220	05/12/2020	05/12/2023	VD-19971-13	Công ty cổ phần dược phẩm TV. Pharm		Độ hòa tan	Công văn: số 19e/QLD-CL ngày 02/12/2021	Thu hồi tại các cơ sở kinh doanh được, cơ sở khám bệnh, chữa bệnh trên địa bàn thành phố Hà Nội và các cơ sở kinh doanh được, cơ sở khám bệnh, chữa bệnh không nằm trên địa bàn Hà Nội đã mua lô thuốc do công ty TNHH dược phẩm France Việt Nam cung cấp (nếu có)

4	Viên nang cứng Globonir (Cefdinir 300mg)	CI 09	30/04/2021	29/04/2023	VN-22569-20	Global Pharma Healthcare Pvt. Ltd, (India)	Công ty TNHH Thương mại Dược phẩm Hoàng Trần	Tính chất; Độ hòa tan	Công văn: số 15477/ QLD- CL ngày 31/12/2021	Thu hồi tại các cơ sở kinh doanh được, cơ sở khám bệnh, chữa bệnh trên địa bàn Hà Nội và các cơ sở kinh doanh được, cơ sở khám bệnh, chữa bệnh không nằm trên địa bàn Hà Nội đã mua lô thuốc do công ty TNHH Thương mại được phẩm Khánh Huy cung cấp (nếu có)
5	Viên nén bao phim Quinoneg 500 (Acid nalidixic 500mg)	P532	10/06/2021	09/06/2024	VN-15896-12	Flamingo Pharmaceuticals Ltd., (India)	Công ty cổ phần Dược - Thiết bị Y tế Đà Nẵng	Độ đồng đều khối lượng	Công văn: số 1e/QLD- CL ngày 20/01/2022	Thu hồi tại các cơ sở kinh doanh được, cơ sở khám bệnh, chữa bệnh trên địa bàn Hà Nội và các cơ sở kinh doanh được, cơ sở khám bệnh, chữa bệnh không nằm trên địa bàn Hà Nội đã mua lô thuốc do công ty TNHH Thương mại và Dược phẩm Quốc tế Nam Khanh cung cấp (nếu có)
6	Viên nén bao đường Mộc hoa trắng (Mộc hoa trắng 1000 mg)	081019	03/10/2019	3/10/2022	VD-19084-13	Công ty cổ phần dược vật y tế Hải Dương		Định lượng	Công văn: số 3e/QLD- CL ngày 20/01/2022	Thu hồi tại các cơ sở kinh doanh được, cơ sở khám bệnh, chữa bệnh trên địa bàn Hà Nội và các cơ sở kinh doanh được, cơ sở khám bệnh, chữa bệnh không nằm trên địa bàn Hà Nội đã mua lô thuốc do công ty TNHH Kinh doanh Tổng hợp An Phú cung cấp (nếu có)

7	Viên nén bao phim Adazol (Albendazole 400mg)	002201	01/02/2020	01/02/2023	VD-22783-15	Công ty cổ phần được phẩm 3/2		Độ hòa tan	Công văn: số 678/QLD-CL ngày 28/01/2022	Thu hồi tại các cơ sở kinh doanh được, cơ sở khám bệnh, chữa bệnh trên địa bàn Hà Nội và các cơ sở kinh doanh được, cơ sở khám bệnh, chữa bệnh không nằm trên địa bàn Hà Nội đã mua lô thuốc do công ty TNHH Thương mại được phẩm Đông Á cung cấp (nếu có)
8	Povidon-Iod (Povidon Iod 10%)	090421	20/04/2021	20/04/2024	VD-18443-13	Công ty cổ phần được vật tư y tế Hải Dương		Hàm lượng iod	Công văn: số 1488/QLD-CL ngày 03/03/2022	Thu hồi tại các cơ sở kinh doanh được, cơ sở khám bệnh, chữa bệnh trên địa bàn tỉnh Đắk Lắk
		110421	23/04/2021	23/04/2024						
9	Viên nang cứng Omsergy (Omeprazole 20mg)	OSB012103	08/01/2021	07/07/2023	VN-20406-17	Saga Laboratories - India	Công ty cổ phần Xuất nhập khẩu Y tế Tp. Hồ Chí Minh (YTECO)	Độ hòa tan; Tạp chất liên quan	Công văn: số 1490/QLD-CL ngày 03/03/2022	Thu hồi tại các cơ sở kinh doanh được, cơ sở khám bệnh, chữa bệnh trên địa bàn thành phố Hồ Chí Minh và các cơ sở kinh doanh được, cơ sở khám bệnh, chữa bệnh không nằm trên địa bàn TP. Hồ Chí Minh đã mua lô thuốc do công ty TNHH Việt Thủy Sĩ cung cấp (nếu có)
10	Viên nén Rotundin (Rotundin base 30mg)	01		08/09/2024	VD-30855-18	Công ty TNHH MTV 120 Arnephaco		Tạp chất liên quan	Công văn: số 2597/QLD-CL ngày 07/04/2022	Thu hồi tại các cơ sở kinh doanh được, cơ sở khám bệnh, chữa bệnh trên địa bàn tỉnh Hải Dương và các cơ sở kinh doanh được, cơ sở khám bệnh, chữa bệnh không nằm trên địa bàn tỉnh Hải Dương đã mua lô thuốc do chi nhánh Công ty cổ phần được - vật tư y tế Hải Dương tại Từ Kỳ cung cấp (nếu có)

11	Viên nén Navacarzol (Carbimazole 5mg)	210175/2	05/2021	05/2024	VN-17813-14	Industrial Farmaceutica Nova Argentina S.p.A (Italy)	Công ty cổ phần Dược phẩm Thiên Thảo	Độ dày; Độ cứng; Tập chất liên quan; Định lượng	Công văn: số 2984/QLD- CL ngày 19/04/2022	Thu hồi toàn quốc
12	Viên nang mềm Sofkof (Dextromethorphan HBr 10mg; Phenylephrin HCl 5mg; Chlorpheniramin maleat 2mg)	X671	23/03/2021	22/03/2024	VN-16617-13	XL Laboratories Pvt., Ltd. (Ấn Độ)	Công ty cổ phần Xuất nhập khẩu Y tế TPHCM (YTECO)	Độ hòa tan Chlorpheniramin maleat	Công văn: số 3445/QLD- CL ngày 04/05/2022	Thu hồi tại các cơ sở kinh doanh được, cơ sở khám bệnh, chữa bệnh trên địa bàn Hà Nội và các cơ sở khám doanh được, cơ sở khám bệnh, chữa bệnh không nằm trên địa bàn Hà Nội đã mua lô thuốc do công ty TNHH Dược phẩm Trung Nghĩa cung cấp (nếu có)
13	Viên nén Neometin (Metronidazol 500mg; Neomycin sulphat 108,3mg; Nystatin 22,73mg)	074	07/2020	07/2022	VN-17936-14	Genome Pharmaceutical (Pvt) Ltd (Pakistan)	Công ty TNHH Nacopharm Miền Bắc	Định lượng Neomycin sulfat	Công văn: số 3446/QLD- CL ngày 04/05/2022	Thu hồi tại các cơ sở kinh doanh được, cơ sở khám bệnh, chữa bệnh trên địa bàn Hà Nội và các cơ sở khám doanh được, cơ sở khám bệnh, chữa bệnh không nằm trên địa bàn Hà Nội đã mua lô thuốc do công ty TNHH Dược phẩm Thăng Lợi cung cấp (nếu có)
14	Viên bao đường Neurobion (Vitamin B6 200mg, Vitamin B1 (Thiamin mononitrat) 100mg, Vitamin B12 200mcg)	D0083217 D0006203	14/11/2020 15/10/2020	13/11/2013 14/10/2023	VN-20021-16	PT. Merek Tbk (Indonesia)	Chi nhánh công ty TNHH Zuellig Pharma, Việt Nam	Đồng đều khối lượng	Công văn: số 3447/QLD- CL ngày 04/05/2022	Thu hồi toàn quốc

15	Cốm pha hỗn dịch uống Zinnat Suspension (Cefuroxim axetil 125mg)	7S6A	13/11/2022	VN-20513-17	Glaxo Operations UK Limited (Anh)	Chi nhánh công ty TNHH Zuellig Pharma, Việt Nam	Cảm quan Độ ẩm Tập chất liên quan	Công văn: số 3534/QLD- CL ngày 09/05/2022	Thu hồi toàn quốc (tự nguyên)
		2P7N	16/07/2022						

3. Danh mục thuốc bị rút số đăng ký từ ngày 01/12/2021 đến ngày 31/5/2022

Danh mục gồm 134 thuốc, xem chi tiết tại các quyết định thu hồi: Quyết định số 701/QĐ-QLD ngày 07/12/2021; Quyết định số 147/QĐ-QLD ngày 31/03/2022; Quyết định số 186/QĐ-QLD ngày 19/04/2022; Quyết định số 222/QĐ-QLD ngày 27/04/2022 và Quyết định số 291/QĐ-QLD ngày 30/05/2022 của Cục quản lý Dược.

MỤC LỤC

Trang

● *Nghiên cứu khoa học*

- Nghiên cứu xây dựng qui trình định lượng Cilnidipin trong huyết tương người bằng phương pháp LC-MS/MS. 1
PHAN THỊ NGHĨA, NGÔ ĐỨC LIÊM, TRẦN HOÀNG, NGUYỄN THỊ THU QUỲNH, LÊ THỊ LA✉
- Phân biệt dược liệu Ý dĩ và dược liệu Ý dĩ giả mạo. 5
VÕ THỊ HƯỜNG, NGUYỄN THỊ LIÊN✉
- Xây dựng qui trình định lượng acid Ganoderic A trong bào tử nấm linh chi bằng kỹ thuật sắc ký lỏng hiệu năng cao. 9
NGUYỄN HỮU LẠC THUY✉, *TRINH THỊ DIỆU THUỜNG, TRƯƠNG VĂN ĐẠT*
- Nghiên cứu xây dựng qui trình xác định chất chống côn trùng Deltamethrin trong màn sản xuất từ nhựa bằng sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC). 15
BÙI THỊ LAN PHƯƠNG, PHẠM THỊ HIỀN✉
- Xây dựng và thẩm định phương pháp định lượng Rabeprazol trong viên nén bao tan trong ruột. 20
NGÔ QUANG TRUNG, BÙI THỊ LAN PHƯƠNG✉
- *Thông tin khoa học – Tin tức*
- Thuốc giả, thuốc không đạt chất lượng bị thu hồi và thuốc đã được Bộ Y tế rút số đăng ký từ 01/12/2021 đến 31/05/2022. 26
HÀ THỊ MINH CHÂU

CONTENTS

Page

● *Scientific researches*

- Development of an analytical procedure for determination of Cilnidipin in human plasma by LC-MS/MS method. 1
PHAN THI NGHIA, NGO DUC LIEM, TRAN HOANG, NGUYEN THI THU QUYNH, LE THI LA✉
- Distinctions between *Semen coicis* and its counterfeit. 5
VO THI HUONG, NGUYEN THI LIEN✉
- Determination of Ganoderic A acid in sporoderm-broken spore of *Genoderma lucidum* (Lingzhi) by HPLC. 9
NGUYEN HUU LAC THUY✉, *TRINH THI DIEU THUONG, TRUONG VAN DAT*
- Study on development of an analytical procedure for determination of Deltamethrin in Netprotects. 15
BUI THI LAN PHUONG, PHAM THI HIEN✉
- Development and validation of an analytical procedure for determination of Rabeprazol in delayed-release tablets. 20
NGO QUANG TRUNG, BUI THI LAN PHUONG✉
- *Technical information - News*
- Counterfeit drugs, substandard pharmaceuticals were recalled and drug licenses were withdrew from December 2021 to May 2022 according to Decisions of Ministry of Health. 26
HÀ THỊ MINH CHÂU