

ĐỊNH TÍNH, ĐỊNH LƯỢNG ĐỒNG PHÂN ĐỐI QUANG LEVOCETIRIZIN CỦA CETIRIZIN BẰNG PHƯƠNG PHÁP HPLC

LÊ THỊ HUỖNG HOA, ĐỖ THU TRANG, NGUYỄN ĐĂNG LÂM
Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương

1. Đặt vấn đề

Cetirizin là thuốc kháng histamin mạnh thuộc thế hệ thứ 2 không gây buồn ngủ, dùng để điều trị viêm mũi dị ứng theo mùa hay mãn tính và chứng nổi mề đay tự phát. Các nghiên cứu đã chứng minh Levocetirizin là đồng phân tả tuyến của Cetirizin có tính kháng dị ứng mạnh, được dung nạp tốt. Levocetirizin có ái lực với receptor H1 mạnh gấp đôi Cetirizin [5].

Trong Dược điển Mỹ [4] tạp đồng phân của Levocetirizin được định lượng bằng cột L40. Ở bài báo này, chúng tôi xin giới thiệu kết quả nghiên cứu định tính, định lượng đồng phân đối quang Levocetirizin của Cetirizin bằng phương pháp HPLC dùng cột đối quang chiral -AGP.

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.
- Cân phân tích Mettler có độ chính xác 0,01 mg.
- Các bình định mức, cốc có mỏ, pipet, đĩa thủy tinh, bơm tiêm, lọ đựng mẫu và các dụng cụ thủy tinh có độ chính xác phù hợp.

2.1.2. Hóa chất, chất chuẩn

- Chất đối chiếu:
+ Levocetirizin dihydroclorid; Hãng sản xuất: LGC; Hàm lượng: 98,5% (khan).

+ Cetirizin dihydroclorid của VKN Thuốc thành phố Hồ Chí Minh; Lô: QT065101112 Hàm lượng: 99,53% (khan).

- Dung môi hóa chất: Đạt tiêu chuẩn tinh khiết dùng cho HPLC.

2.2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Đối tượng nghiên cứu:

- Siro 1-AL của Công ty FDC Limited Ấn độ có công thức bào chế cho 1 lọ 30 ml như sau:

Levocetirizin dihydroclorid 15 mg

Tá dược: Natri citrat, Dinatri edetat, Methyl hydroxybenzoat, Propyl hydroxybenzoat, Ordinary sugar, Dung dịch sorbitol 70%, Glycerin, Acid citric khan, Mùi cam RS 15215, Sunset yellow.

- Mẫu Placebo có thành phần giống siro 1-AL nhưng không chứa *Levocetirizin dihydroclorid*.

2.2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.2.1. Điều kiện sắc ký

- Cột sắc ký: Chiral AGP (150 mm x 4,0 mm), 5 μ m;
- Pha động: Acetonitril - Dung dịch đệm phosphat pH 7,0 (5:95);
- Detector UV đặt tại bước sóng: 230 nm;
- Tốc độ dòng: 0,8 ml/ phút;
- Thể tích tiêm: 10 μ l.

Dung dịch đệm phosphat pH 7,0: Hòa tan 1,36 g kali dihydrophosphat trong 1000 ml nước, điều chỉnh pH 7,0 bằng dung dịch kali hydroxyd 50%. Lọc qua màng lọc 0,45 μ m.

2.2.2.2. Phương pháp chuẩn bị mẫu

- *Dung dịch thử*: Hút chính xác 5,0 ml chế phẩm vào bình định mức 50 ml, thêm pha động vừa đủ đến vạch, lắc đều, Lọc qua màng lọc 0,45 μ m.

- *Dung dịch chuẩn Levocetirizin dihydroclorid*: Cân chính xác khoảng 25 mg chất chuẩn Levocetirizin dihydroclorid vào bình định mức 50 ml, thêm 30 ml pha động, lắc cho tan, thêm pha động vừa đủ, lắc đều. Hút chính xác 2,0 ml dung dịch trên pha loãng thành 20,0 ml bằng pha động.

- *Dung dịch chuẩn Cetirizin dihydroclorid*: Cân chính xác khoảng 50 mg chất chuẩn Cetirizin dihydroclorid vào bình định mức 50 ml, thêm 30 ml pha động, lắc cho tan, thêm pha động vừa đủ, lắc đều. Hút chính xác 2,0 ml dung dịch trên pha loãng thành 20,0 ml bằng pha động.

2.2.2.3. Ứng dụng của phương pháp

- Định tính: Dựa vào các tiêu chí:

+ Thời gian lưu: So sánh thời gian lưu của pic Levocetirizin dihydroclorid thu được từ dung dịch thử và pic thu được từ dung dịch chuẩn.

+ Phổ UV-VIS: Chồng phổ UV-VIS của pic Levocetirizin dihydroclorid trên sắc ký đồ thu được từ dung dịch thử và dung dịch chuẩn: 2 phổ phải tương ứng với nhau (đánh giá bằng hệ số chồng phổ match).

+ Dung dịch chuẩn Cetirizin phải cho 2 pic tách nhau hoàn toàn (độ phân giải > 2), trong đó một pic có thời gian lưu tương ứng với thời gian lưu của pic Levocetirizin dihydroclorid trong dung dịch chuẩn.

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

3. Kết quả và bàn luận [1],[2]

3.1. Tính thích hợp của hệ thống sắc ký

Tiến hành tiêm lặp lại 6 lần dung dịch chuẩn Cetirizin ở mục 2.2.2.2 vào hệ thống sắc ký, kết quả thể hiện ở Bảng 1.

Bảng 1. Tính thích hợp của hệ thống sắc ký

STT	R-certirizin		Levocetirizin dihydroclorid	
	Thời gian lưu (phút)	Diện tích pic (mAU.s)	Thời gian lưu (phút)	Diện tích pic (mAU.s)
1	10,225	1139773	13,876	1137112
2	10,205	1140310	13,850	1134384
3	10,203	1139655	13,851	1131951
4	10,199	1133929	13,850	1133670
5	10,183	1135338	13,831	1129278
6	10,177	1134468	13,823	1137683
Thống kê	$t_{R\text{tb}} = 10,199$ RSD = 0,15%	$S_{\text{tb}} = 1137246$ RSD = 0,24%	$t_{R\text{tb}} = 13,847$ RSD = 0,12%	$S_{\text{tb}} = 1134013$ RSD = 0,25%

Như vậy hệ thống sắc ký có độ lặp lại tốt với giá trị RSD của thời gian lưu lần lượt là 0,15% và 0,12% cho R-certirizin dihydroclorid và Levocetirizin dihydroclorid (nhỏ hơn 1%). Giá trị RSD của diện tích pic R-certirizin dihydroclorid và Levocetirizin dihydroclorid tương ứng là 0,24% và 0,25% (nhỏ hơn 2%).

3.2. Tính đặc hiệu

Chúng tôi tiến hành tiêm các mẫu sau vào hệ thống sắc ký đã lựa chọn:

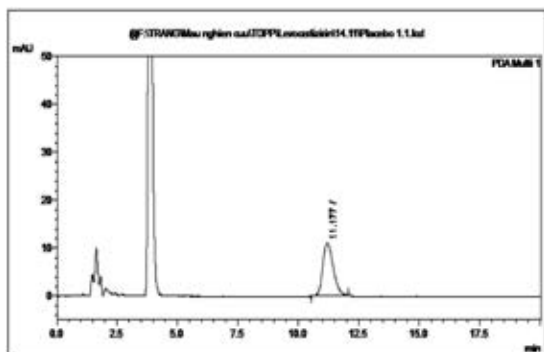
- Dung dịch placebo: Hút chính xác 5 ml mẫu placebo vào bình định mức 50 ml, thêm pha động vừa đủ đến vạch, lắc đều, Lọc qua màng lọc 0,45 μm .

- Dung dịch thử, dung dịch chuẩn: Xem mục 2.2.2.2.

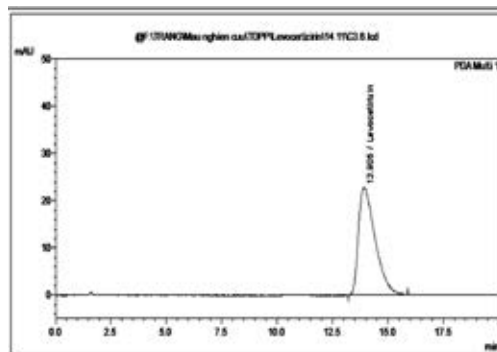
Kết quả phân tích cho thấy: Trên sắc ký đồ các mẫu

placebo không xuất hiện pic ở thời gian lưu tương ứng với thời gian lưu của Levocetirizin dihydroclorid. Trên sắc ký đồ của dung dịch thử cho các pic có thời gian lưu tương ứng với thời gian lưu của pic Levocetirizin dihydroclorid thu được từ sắc ký đồ của dung dịch chuẩn. Dung dịch chuẩn Cetirizin cho 2 pic tách nhau hoàn toàn có độ phân giải $R = 3,092$ (một pic có thời gian lưu tương ứng với thời gian lưu của pic Levocetirizin dihydroclorid trong dung dịch chuẩn).

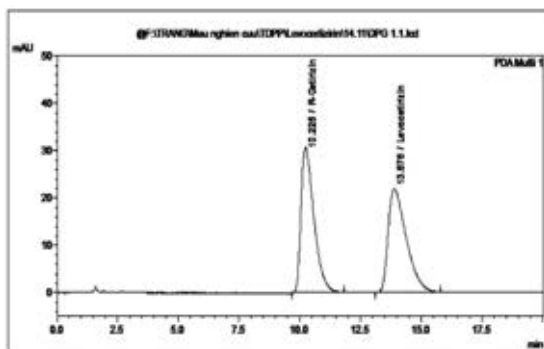
Phổ UV-VIS của pic Levocetirizin dihydroclorid thu được từ dung dịch thử tương ứng với phổ của dung dịch chuẩn. Chồng phổ UV-VIS của pic Levocetirizin dihydroclorid thu được từ dung dịch thử và dung dịch chuẩn, hệ số tương đương là 0,9996. Kết quả thể hiện ở Hình 1 và Hình 2.



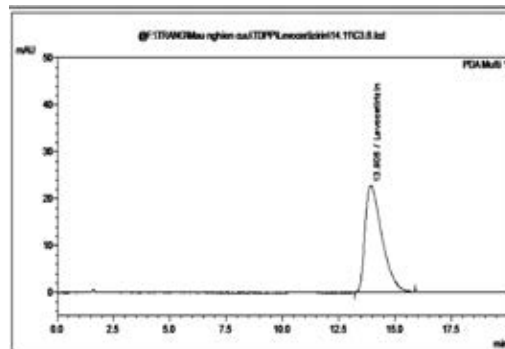
a)



b)



c)



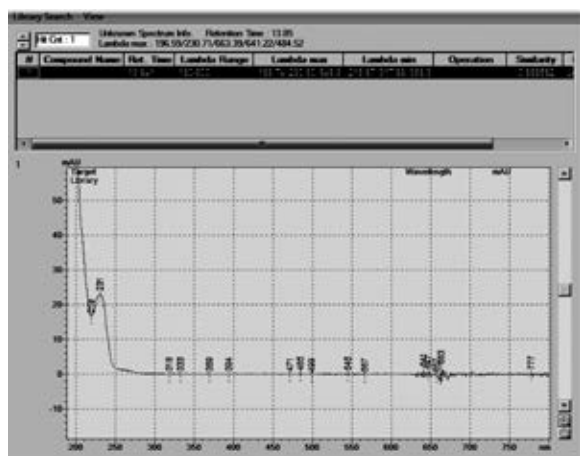
d)

Hình 1. a) SKĐ của mẫu placebo

c) SKĐ của dung dịch chuẩn Cetirizin

b) SKĐ của dung dịch chuẩn Levocetirizin

d) SKĐ của dung dịch thử



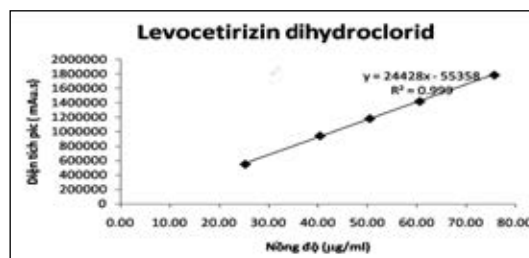
Hình 2. Chồng phổ UV-VIS của pic Levocetirizin trên dung dịch thử và dung dịch chuẩn

3.3. Độ tuyến tính, khoảng xác định

Pha một dãy các dung dịch chuẩn Levocetirizin dihydroclorid trong pha động có nồng độ từ: 25,22 - 75,65 $\mu\text{g/ml}$, tiến hành sắc ký theo điều kiện như trên. Kết quả được thể hiện ở Bảng 2 và Hình 3.

Bảng 2. Kết quả khảo sát độ tuyến tính của Levocetirizin dihydroclorid

STT	Levocetirizin dihydroclorid	
	Nồng độ ($\mu\text{g/ml}$)	Diện tích pic (mAU.s)
1	25,22	549034
2	40,35	943110
3	50,43	1182819
4	60,52	1421149
5	75,65	1786890
Phương trình hồi qui		$y = 24428x - 55358$
Hệ số tương quan		$r = 0,9999$



Hình 3. Đồ thị khảo sát sự tương quan tuyến tính giữa nồng độ và diện tích pic của Levocetirizin dihydroclorid

Như vậy có sự tương quan tuyến tính chặt chẽ giữa nồng độ và diện tích pic của Levocetirizin dihydroclorid trong khoảng nồng độ khảo sát với hệ số tương quan bằng 0,9999.

3.4. Độ chính xác

3.4.1. Độ lặp lại

Độ lặp lại của phương pháp được đánh giá dựa trên độ lệch chuẩn tương đối của 6 mẫu thử được phân tích riêng biệt theo qui trình phân tích ở mục 2.2.2.1 và 2.2.2.2. Kết quả thể hiện ở Bảng 3. Như vậy phương pháp có độ lặp lại tốt với RSD là 0,34%, nhỏ hơn 2%.

3.4.2. Độ chính xác trung gian

Độ chính xác trung gian được đánh giá dựa trên độ lệch chuẩn tương đối của 12 mẫu thử được phân tích riêng biệt ở 2 ngày khác nhau trên cùng một thiết bị. Kết quả được thể hiện ở Bảng 3.

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

STT	Kết quả định lượng ngày: 1 Thiết bị: Máy HPLC Shimazdu LC-20A Lượng cân chuẩn: 25,6 mg Diện tích pic mẫu chuẩn: 1184716			Kết quả định lượng ngày: 2 Thiết bị: Máy HPLC Shimazdu LC-20A Lượng cân chuẩn: 25,8 mg Diện tích pic mẫu chuẩn: 1186783		
	Thể tích mẫu thử (ml)	Diện tích pic (mAU.s)	% Hàm lượng	Thể tích mẫu thử (ml)	Diện tích pic (mAU.s)	% Hàm lượng
1	5,0	1097853	93,5	5,0	1095447	93,8
2	5,0	1093515	93,1	5,0	1095000	93,8
3	5,0	1091430	92,9	5,0	1094987	93,8
4	5,0	1094744	93,2	5,0	1096279	93,9
5	5,0	1095132	93,2	5,0	1093414	93,7
6	5,0	1086966	92,5	5,0	1089561	93,3
Trung bình = 93,1%; n = 6; RSD = 0,34%				Trung bình = 93,7%; n = 6; RSD = 0,22%		
Kết quả định lượng trung bình = 93,4%; n = 12; RSD = 0,45% < 3%						

Kết quả cho thấy phương pháp có độ chính xác cao, độ lặp lại trong ngày là 0,34% và 0,22% (n = 6) độ lặp lại khác ngày là 0,45% (n = 12).

3.5. Độ đúng

Độ đúng của phương pháp được đánh giá trên mẫu tự tạo (thêm chuẩn vào nền mẫu placebo sao cho sau khi xử lý theo qui trình phân tích nồng độ dung dịch cuối cùng của Levocetirizin dihydroclorid đem tiêm sắc ký phải nằm trong khoảng từ 80 - 120% so với nồng độ định lượng). Tiến hành ở 3 mức nồng độ khác nhau, mỗi nồng độ thực hiện 3 lần. Dựa vào nồng độ và diện tích pic Levocetirizin dihydroclorid của dung dịch chuẩn để tính được lượng chất chuẩn tìm lại trong mẫu. Độ đúng là tỷ lệ phần trăm giữa lượng chất chuẩn tìm lại với lượng chuẩn đã thêm vào ban đầu. Kết quả được thể hiện ở Bảng 4.

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

STT	Thể tích mẫu placebo (ml)	Lượng chuẩn thêm vào (mg)	Diện tích pic (mAU.s)	Lượng chuẩn tìm thấy (mg)	% tìm thấy
1	5,0	1,9227	893483	1,9017	98,9
2	5,0	1,9227	889423	1,8931	98,5
3	5,0	1,9227	893998	1,9028	99,0
4	5,0	2,3876	1117378	2,3783	99,6
5	5,0	2,3876	1113536	2,3701	99,3
6	5,0	2,3876	1119474	2,3827	99,8
7	5,0	2,8762	1342537	2,8575	99,4
8	5,0	2,8762	1345683	2,8642	99,6
9	5,0	2,8762	1344292	2,8612	99,5
Trung bình = 99,3%; n=9; RSD= 0,42%					

Từ kết quả khảo sát cho thấy phương pháp có tỷ lệ thu hồi cao từ: 98,5 – 99,8% với Levocetirizin dihydroclorid, như vậy phương pháp có độ đúng tốt.

3.6. Khoảng xác định

Từ kết quả về khoảng tuyến tính, độ chính xác, độ đúng của phương pháp, cho phép đưa ra kết quả khoảng xác định của phương pháp đối với Levocetirizin dihydroclorid từ: 38,45 µg/ml (ứng với 80% nồng độ định lượng) đến 57,52 µg/ml (ứng với 120% nồng độ định lượng).

3.7. Giới hạn phát hiện

Pha loãng dần dung dịch chuẩn Levocetirizin dihydroclorid ở mục 2.2.2.2 đến nồng độ thấp nhất sao cho khi tiêm vào hệ thống sắc ký tín hiệu thu được gấp khoảng 3 lần so với nhiễu đường nền. Giới hạn phát hiện của Levocetirizin dihydroclorid là 0,31 µg/ml.

3.8. Giới hạn định lượng

Pha loãng dần dung dịch chuẩn Levocetirizin dihydroclorid ở mục 2.2.2.2 đến nồng độ thấp nhất sao cho khi tiêm vào hệ thống sắc ký tín hiệu thu được cao gấp 10 lần so với nhiễu đường nền mà vẫn đạt yêu cầu về độ đúng và độ chính xác. Giới hạn định lượng của Levocetirizin dihydroclorid là: 1,0 µg/ml.

4. Kết luận

Phương pháp định lượng Levocetirizin dihydroclorid được thẩm định chặt chẽ về tính đặc hiệu, độ chính xác và độ đúng, LOD, LOQ. Phương pháp đã được thẩm định hoàn toàn phù hợp để định tính, định lượng Levocetirizin dihydroclorid trong siro 1-AL, có thể áp dụng trên các thành phẩm khác có chứa Levocetirizin dihydroclorid.

Tài liệu tham khảo

1. Tạ Mạnh Hùng, Đoàn Cao Sơn (2012), “Hướng dẫn chung thẩm định qui trình phân tích bằng phương pháp HPLC”, *Tạp chí Kiểm nghiệm thuốc*, 10 (38), trang 1-8.
2. Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương (2007), *Đảm bảo chất lượng thuốc và một số phương pháp kiểm nghiệm thuốc*, Tài liệu đào tạo.
3. *British Pharmacopoeia* (2014).
4. *The United States Pharmacopoeia* 38 (2015).
5. www.Thuocbietduoc.com.vn

SUMMARY

A HPLC method was proposed to enantiometric Levocetirizine dihydrochloride determination of Cetirizine dihydrochloride. Chromatographic conditions are as follows: The liquid chromatograph is equipped with a 230 nm detector; a 150 x 4.0 mm column that contains 5 µm packing acid alpha glycoprotein, mobile phase is a mixture of Acetonitrile and 0.01 M potassium dihydrophosphate buffer solution pH 7.0 (5:95), the flow rate about 0.8 ml/minute, injection volume is 10 µl, temperature: ambient.

The method was validated about the specificity, linear range, precision, accuracy, LOD, LOQ, and validation results proved that this method was suitable for determination of Levocetirizine dihydrochloride in sirup.

ĐỊNH LƯỢNG ĐỒNG THỜI α -KETOVALIN CALCI, α -KETOISOLEUCIN CALCI, α -HYDROXYMETHIONIN CALCI, α -KETOLEUCIN CALCI VÀ α -KETOPHENYLALANIN CALCI TRONG CHẾ PHẨM BẰNG PHƯƠNG PHÁP HPLC

NGUYỄN THỊ HOA, MÃ VÂN KIỀU, TRẦN THỊ BÍCH VÂN, ĐOÀN CAO SƠN
Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương

1. Đặt vấn đề

Các chế phẩm có chứa α -ketovalin calci, α -ketoisoleucin calci, α -hydroxymethionin calci, α -ketoleucin calci và α -ketophenylalanin calci được phối hợp với các acid amin khác dùng để phòng tránh và điều trị rối loạn hoặc suy giảm chuyển hóa protein ở bệnh nhân suy thận mạn.

Hiện nay chưa có dạng thành phẩm kết hợp các dược chất trên trong các dược điển [1],[2],[3],[4]. Một số tiêu chuẩn cơ sở có xây dựng phương pháp định lượng đồng thời các dược chất trên phải dùng cột trao đổi cation nên không áp dụng phổ biến được. Để định lượng được đồng thời các dược chất trên với điều kiện tiến hành đơn giản hơn, chúng tôi giới thiệu kết

quả nghiên cứu xây dựng và thẩm định phương pháp định lượng đồng thời α -ketovalin calci, α -ketoisoleucin calci, α -hydroxymethionin calci, α -ketoleucin calci và α -ketophenylalanin calci trong chế phẩm bằng phương pháp HPLC.

2. Thực nghiệm

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

2.1.1. Thiết bị, dụng cụ

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

- Máy sắc ký lỏng hiệu năng cao Agilent 1260 và 1200;
- Cột Agilent C18 (150 x 4,6 mm; 5 μ m);
- Cân phân tích Mettler Toledo AB 204 độ chính xác 0,1 mg;
- Máy đo pH Mettler;
- Bộ lọc dùng cho sắc ký với màng lọc 0,45 μ m;
- Các dụng cụ thủy tinh chính xác: bình định mức, pipet.

2.1.2. Chất chuẩn: Chuẩn làm việc do Công ty Dược phẩm Việt Đức cung cấp

- α -ketovalin calci (Hàm lượng: 99,7% khan; độ ẩm: 9,3%);
- α -ketoisoleucin calci (Hàm lượng: 99,2% khan; độ ẩm: 10,7%);
- α -hydroxymethionin calci (Hàm lượng: 99,8% khan; độ ẩm: 0,1%);
- α -ketoleucin calci (Hàm lượng: 100,5% khan; độ ẩm: 10,6%);
- α -ketophenylalanin calci (Hàm lượng: 99,5% khan; độ ẩm: 5,6%).

2.1.3. Hóa chất thuốc thử

- Acetonitril, amoni oxalat, acid hydrocloric đạt tinh khiết phân tích của Merck;
- Kali dihydrophosphat, acid phosphoric, acid acetic đạt tinh khiết phân tích của Scharlau.

2.2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Đối tượng nghiên cứu

2.2.1.1. Mẫu thử: Viên nén bao phim KETOVITAL do Công ty Dược phẩm Việt Đức cung cấp:

Thành phần	Hàm lượng/một viên
α -Ketoisoleucin calci	67 mg
α -Ketoleucin calci	101 mg
α -Ketophenylalanin calci	68 mg
α -Ketovalin calci	86 mg
α -Hydroxymethionin calci	59 mg

L-lysin acetat (Tương đương 75 mg L-lysin)	105 mg
L-threonin	53 mg
L-tryptophan	23 mg
L-histidin	38 mg
L-tyrosin	30 mg
Tinh bột ngô	44 mg
Crospovidon	6 mg
Talc	19,57 mg
Colloidal silicon dioxyd	4,4 mg
Magnesi stearat	15 mg
Polyethylen glycol 6000	12,8 mg
Povidon	43,2 mg
Ethanol	vd
Lớp bao	
Eudragit E100	15 mg
Polyethylen glycol 6000	1,5 mg
Talc	7,5 mg
Quinoline yellow	0,3 mg
Titan dioxyd	0,75 mg
Ethanol	vd

2.2.1.2. Mẫu placebo: Là mẫu được chuẩn bị theo công thức bào chế nhưng không có 5 hoạt chất α -ketovalin calci, α -ketoisoleucin calci, α -hydroxymethionin calci, α -ketoleucin calci và α -ketophenylalanin calci do Công ty Dược phẩm Việt Đức cung cấp.

2.2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.2.1. Điều kiện HPLC

- Cột Agilent C18 (150 x 4,6 mm; 5 μ m) hoặc tương đương;
- Detector DAD với bước sóng phát hiện 215 nm;
- Pha động: Dung dịch đệm pH 3,0 – Acetonitril = 95 : 5;

(Dung dịch đệm pH 3,0: Hòa tan 9,71 g kali dihydrophosphat (TT) trong 1000 ml nước, điều chỉnh pH đến $3,0 \pm 0,05$ bằng acid phosphoric (TT));

- Tốc độ dòng: 1,0 ml/phút;
- Thể tích tiêm: 20 μ l.

2.2.2.2. Chuẩn bị các mẫu placebo

- *Placebo 1*: Cân 0,0831 g placebo trong bình định mức 100 ml, thêm 75 ml pha động, siêu âm 30 phút, thêm pha động vừa đủ thể tích. Lọc qua màng lọc 0,45 μ m.

- *Placebo 2 (mẫu placebo không chứa hoạt chất α -ketovalin calci)*: Cân 0,0828 g placebo và 13,2 mg chuẩn α -ketoisoleucin calci; 11,6 mg chuẩn α -hydroxymethionin calci; 20,0 mg chuẩn α -ketoleucin

calci; 13,7 mg chuẩn α -ketophenylalanin calci trong bình định mức 100 ml, thêm 75 ml pha động, siêu âm 30 phút, để nguội, thêm pha động vừa đủ thể tích. Lọc qua màng lọc 0,45 μ m.

- *Placebo 3 (mẫu placebo không chứa hoạt chất α -ketoleucin calci):* Cân 0,0837 g placebo và 17,2 mg chuẩn α -ketovalin calci, 11,9 mg chuẩn α -hydroxymethionin calci, 20,2 mg chuẩn α -ketoleucin calci, 13,4 mg chuẩn α -ketophenylalanin calci trong bình định mức 100 ml, thêm 75 ml pha động, siêu âm 30 phút, để nguội, thêm pha động vừa đủ thể tích. Lọc qua màng lọc 0,45 μ m.

- *Placebo 4 (mẫu placebo không chứa hoạt chất α -ketoleucin calci):* Cân 0,0824 g placebo và 17,3 mg chuẩn α -ketovalin calci; 13,6 mg chuẩn α -ketoleucin calci; 11,5 mg chuẩn α -hydroxymethionin calci; 13,8 mg chuẩn α -ketophenylalanin calci trong bình định mức 100 ml, thêm 75 ml pha động, siêu âm 30 phút, để nguội, thêm pha động vừa đủ thể tích. Lọc qua màng lọc 0,45 μ m.

- *Placebo 5 (mẫu placebo không chứa hoạt chất α -hydroxymethionin calci):* Cân 0,0841 g placebo và 17,4 mg chuẩn α -ketovalin calci; 13,7 mg chuẩn α -ketoleucin calci; 20,0 mg chuẩn α -ketoleucin calci; 13,5 mg chuẩn α -ketophenylalanin calci trong bình định mức 100 ml, thêm 75 ml pha động, siêu âm 30 phút, để nguội, thêm pha động vừa đủ thể tích. Lọc qua màng lọc 0,45 μ m.

- *Placebo 6 (mẫu placebo không chứa hoạt chất α -ketophenylalanin calci):* Cân 0,0835 g placebo và 17,4 mg chuẩn α -ketovalin calci; 13,2 mg chuẩn α -ketoleucin calci; 11,6 mg chuẩn α -hydroxymethionin calci; 20,3 mg chuẩn α -ketoleucin calci trong bình định mức 100 ml, thêm 75 ml pha động, siêu âm 30 phút, để nguội, thêm pha động vừa đủ thể tích. Lọc qua màng lọc 0,45 μ m.

2.2.2.3. Chuẩn bị các dung dịch chuẩn và thử

- *Dung dịch chuẩn α -ketovalin calci:* Cân 17,7 mg chuẩn α -ketovalin calci vào bình định mức 100 ml, thêm 75 ml pha động, siêu âm 30 phút, để nguội, thêm pha động vừa đủ thể tích. Lọc qua màng lọc 0,45 μ m.

- *Dung dịch chuẩn α -ketoleucin calci:* Cân 13,0 mg chuẩn α -ketoleucin calci vào bình định mức 100 ml, thêm 75 ml pha động, siêu âm 30 phút, để nguội, thêm pha động vừa đủ thể tích. Lọc qua màng lọc 0,45 μ m.

- *Dung dịch chuẩn α -hydroxymethionin calci:* Cân 11,2 mg chuẩn α -hydroxymethionin calci vào bình định mức 100 ml, thêm 75 ml pha động, siêu âm 30 phút, để nguội, thêm pha động vừa đủ thể tích. Lọc qua màng lọc 0,45 μ m.

- *Dung dịch chuẩn α -ketoleucin calci:* Cân 20,5 mg chuẩn α -ketoleucin calci vào bình định mức 100 ml, thêm 75 ml pha động, siêu âm 30 phút, để nguội, thêm pha động vừa đủ thể tích. Lọc qua màng lọc 0,45 μ m.

- *Dung dịch chuẩn α -ketophenylalanin calci:* Cân 14,1 mg chuẩn α -ketophenylalanin calci vào bình định mức 100 ml, thêm 75 ml pha động, siêu âm 30 phút, để nguội, thêm pha động vừa đủ thể tích. Lọc qua màng lọc 0,45 μ m.

- *Dung dịch chuẩn hỗn hợp:* Cân 34,0 mg chuẩn α -ketovalin calci; 26,2 mg chuẩn α -ketoleucin calci; 23,9 mg chuẩn α -hydroxymethionin calci; 39,0 mg chuẩn α -ketoleucin calci và 27,4 mg chuẩn α -ketophenylalanin calci vào bình định mức 200 ml, thêm 150 ml pha động, siêu âm đến khi chuẩn tan hoàn toàn, để nguội, thêm pha động vừa đủ thể tích. Lọc qua màng lọc 0,45 μ m.

- *Dung dịch thử:* Cân chính xác khoảng 0,1589 g bột chế phẩm vào bình định mức 100 ml, thêm 75 ml pha động, siêu âm 30 phút, để nguội, thêm pha động vừa đủ thể tích. Lọc qua màng lọc 0,45 μ m.

3. Kết quả và bàn luận

3.1. Độ đặc hiệu

- Lần lượt tiêm dung dịch placebo 1, placebo 2, placebo 3, placebo 4, placebo 5, placebo 6, dung dịch chuẩn đơn thành phần, dung dịch chuẩn hỗn hợp và dung dịch thử vào hệ thống sắc ký.

- Kết quả cho thấy:

+ Trên sắc ký đồ của mẫu placebo 1: Không xuất hiện pic nào có thời gian lưu tương ứng với thời gian lưu của các pic α -ketovalin calci, α -ketoleucin calci, α -hydroxymethionin calci, α -ketoleucin calci và α -ketophenylalanin calci trên sắc ký đồ của dung dịch chuẩn.

+ Trên sắc ký đồ của dung dịch chuẩn hỗn hợp: Xuất hiện 5 pic tương ứng với α -ketovalin calci, α -ketoleucin calci, α -hydroxymethionin calci, α -ketoleucin calci và α -ketophenylalanin calci.

+ Từ các dung dịch chuẩn riêng biệt xác định được thứ tự rửa giải lần lượt của các chất như sau: α -ketovalin calci, α -ketoleucin calci, α -hydroxymethionin calci, α -ketoleucin calci và α -ketophenylalanin calci.

+ Trên sắc ký đồ của mẫu placebo 2, placebo 3, placebo 4, placebo 5, placebo 6: Không xuất hiện pic nào có thời gian lưu tương ứng với thời gian lưu của pic α -ketovalin calci, α -ketoleucin calci, α -ketoleucin calci, α -hydroxymethionin calci, α -ketophenylalanin calci trên sắc ký đồ của dung dịch chuẩn.

Độ phân giải giữa pic α -ketovalin calci và α -ketoleucin calci là 18,19; giữa pic α -ketoleucin calci và α -hydroxymethionin calci là 1,59;

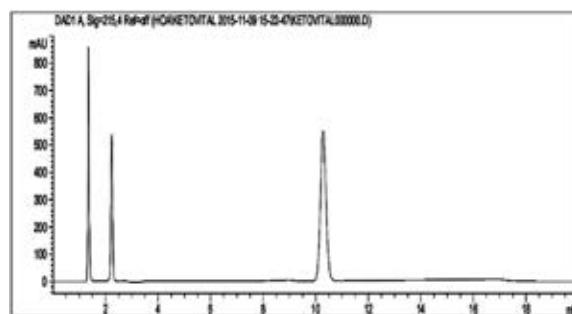
α -hydroxymethionin calci và α -ketoleucin calci là 3,46; α -ketoleucin calci và α -ketophenylalanin calci là 11,05.

+ Trên sắc ký đồ của dung dịch thử cho 5 pic có thời gian lưu tương ứng với thời gian lưu của các pic α -ketovalin calci, α -ketoisoleucin calci, α -hydroxymethionin calci, α -ketoleucin calci và α -ketophenylalanin calci trên sắc ký đồ của dung dịch chuẩn.

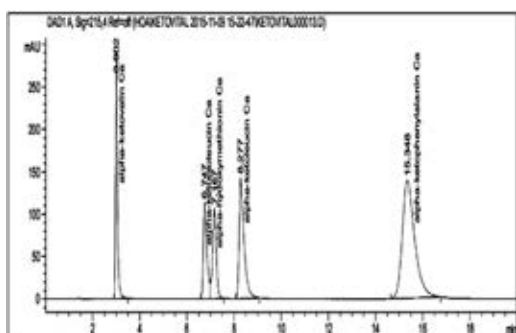
+ Phổ UV-Vis của các pic trên sắc ký đồ dung dịch thử giống phổ UV-Vis của các pic α -ketovalin calci, α -ketoisoleucin calci, α -hydroxymethionin calci, α -ketoleucin calci và α -ketophenylalanin calci trên sắc ký đồ của dung dịch chuẩn.

Như vậy phương pháp là đặc hiệu để định lượng đồng thời α -ketovalin calci, α -ketoisoleucin calci,

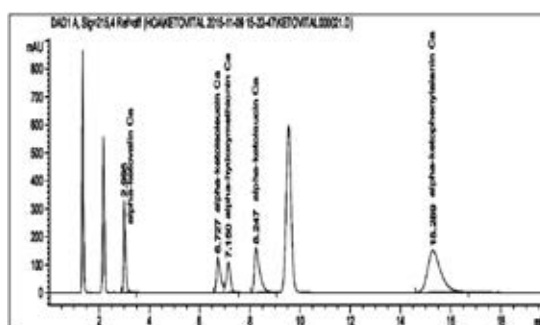
α -hydroxymethionin calci, α -ketoleucin calci và α -ketophenylalanin calci trong chế phẩm (xem Hình 1).



Sắc ký đồ dung dịch placebo 1



Sắc ký đồ dung dịch chuẩn hỗn hợp



Sắc ký đồ dung dịch thử

Hình 1. Độ đặc hiệu của phương pháp.

3.2. Độ thích hợp của hệ thống

Tiến hành tiêm 6 lần dung dịch chuẩn hỗn hợp. Ghi lại các SKĐ, xác định các thông số thời gian lưu, diện tích pic, độ phân giải. Kết quả khảo sát tính thích hợp của hệ thống sắc ký thể hiện ở Bảng 1.

Bảng 1. Độ thích hợp của hệ thống

Hoạt chất	Thời gian lưu (phút)	Diện tích pic (mAU.s)
α -ketovalin calci	3,001; n = 6; RSD = 0,03%	1643,0; n = 6; RSD = 0,05%
α -ketoisoleucin calci	6,744; n = 6; RSD = 0,03%	1222,9; n = 6; RSD = 0,07%
α -hydroxymethionin calci	7,161; n = 6; RSD = 0,05%	1192,7; n = 6; RSD = 0,04%
α -ketoleucin calci	8,271; n = 6; RSD = 0,04%	2065,4; n = 6; RSD = 0,05%
α -ketophenylalanin calci	15,331; n = 6; RSD = 0,07%	5117,3; n = 6; RSD = 0,10%

Nhận xét: Các kết quả trên ($RSD_{\text{thời gian lưu}} < 1,0\%$; $RSD_{\text{Spic}} < 2,0\%$) cho thấy hệ thống đạt yêu cầu để định lượng đồng thời α -ketovalin calci, α -ketoisoleucin calci, α -hydroxymethionin calci, α -ketoleucin calci và α -ketophenylalanin calci trong chế phẩm. Độ phân giải giữa các pic đạt yêu cầu ($R_s > 1,5$).

3.3. Độ tuyến tính

- Hòa tan một lượng chính xác các chất chuẩn α -ketovalin calci, α -ketoisoleucin calci, α -hydroxymethionin calci, α -ketoleucin calci và α -ketophenylalanin calci trong 200,0 ml pha động để thu được một dãy các dung dịch chuẩn như mô tả trong Bảng.

- Khảo sát sự tương quan giữa y (diện tích pic) và x (nồng độ) bằng phương pháp bình phương tối thiểu, kết quả chứng tỏ có sự tương quan tuyến tính chặt chẽ giữa nồng độ và diện tích pic.

Bảng 2. Kết quả khảo sát độ tuyến tính

<i>Hoạt chất</i>	<i>Khoảng tuyến tính</i>	<i>Phương trình hồi quy</i>
α -ketovalin calci	0,0764 - 0,2342 mg/ml	$y = 10406,8497x + 23,8246$ Hệ số tương quan: $r = 0,9997$ % Y = 1,45%
α -ketoisoleucin calci	0,0545 - 0,1754 mg/ml	$y = 10383,3086x + 21,2456$ Hệ số tương quan: $r = 0,9985$ % Y = 1,74%
α -hydroxymethionin calci	0,0578 - 0,1715 mg/ml	$y = 9997,4654x + 20,2131$ Hệ số tương quan: $r = 0,9987$ % Y = 1,69%
α -ketoleucin calci	0,0827 - 0,2637 mg/ml	$y = 11574,3236x + 35,8192$ Hệ số tương quan: $r = 0,9995$ % Y = 1,73%
α -ketophenylalanin calci	0,0629 - 0,2010 mg/ml	$y = 38845,4142x + 47,8492$ Hệ số tương quan: $r = 0,9992$ % Y = 0,94%

3.4. Độ đúng

- Chuẩn bị mẫu chuẩn hỗn hợp: Chuẩn bị như mục 2.2.2.2.

- Chuẩn bị mẫu thử: Cân chính xác khoảng 0,0826 g placebo và một lượng chính xác các chất chuẩn α -ketovalin calci, α -ketoisoleucin calci, α -hydroxymethionin calci, α -ketoleucin calci và α -ketophenylalanin calci vào trong các bình định mức 100 ml, thêm 75 ml pha động, siêu âm 30 phút, để nguội, thêm pha động vừa đủ thể tích để được các dung dịch thử đã biết nồng độ như trong Bảng.

Mỗi mức nồng độ làm 03 mẫu. Kết quả khảo sát độ đúng được thể hiện ở Bảng 3.

Bảng 3. Kết quả khảo sát độ đúng

<i>Hoạt chất</i>	<i>80%</i>		<i>100%</i>		<i>120%</i>		<i>Trung bình</i>	
	<i>Khả năng thu hồi (%)</i>	<i>Độ lặp lại (RSD %)</i>	<i>Khả năng thu hồi (%)</i>	<i>Độ lặp lại (RSD %)</i>	<i>Khả năng thu hồi (%)</i>	<i>Độ lặp lại (RSD %)</i>	<i>Khả năng thu hồi (%)</i>	<i>Độ lặp lại (RSD %)</i>
<i>α-ketovalin calci</i>	99,1	0,59	99,8	0,73	99,0	0,39	99,3	0,63
<i>α-ketoisoleucin calci</i>	100,5	0,82	100,3	1,26	99,9	1,09	100,2	0,97
<i>α-hydroxymethionin calci</i>	99,1	1,02	99,7	1,30	98,9	1,18	99,2	1,07
<i>α-ketoleucin calci</i>	99,7	1,36	100,8	1,52	100,6	1,01	100,4	1,26
<i>α-ketophenylalanin calci</i>	99,6	1,63	99,5	1,63	99,8	0,68	99,6	1,21

Tỷ lệ % thu hồi của α -ketovalin calci, α -ketoisoleucin calci, α -hydroxymethionin calci, α -ketoleucin calci và α -ketophenylalanin calci nằm trong khoảng 98,0% – 102,0% với RSD < 2%. Vậy phương pháp định lượng đạt yêu cầu về độ đúng.

3.5. Khoảng xác định

Trong phần đánh giá độ đúng và độ tuyến tính của phương pháp cho thấy tại nồng độ α -ketovalin calci, α -ketoisoleucin calci, α -hydroxymethionin calci, α -ketoleucin calci và α -ketophenylalanin calci bằng 80% đến 120% so với nồng độ định lượng có độ đúng, độ lặp lại tốt, nằm trong khoảng tuyến tính. Như vậy khoảng xác định của phương pháp là trong giới hạn từ 80% đến 120% so với nồng độ định lượng.

3.6. Độ lặp lại

Khảo sát trên viên nén bao phim Ketovital với các điều kiện sắc ký và cách xử lý mẫu như ở mục 2.2.2.1 và 2.2.2.3. Lặp lại thí nghiệm 6 lần. Kết quả được trình bày trong Bảng 4.

Kết quả ở Bảng 4 cho thấy phương pháp đạt yêu cầu về độ lặp lại với các giá trị RSD < 2,0%.

3.7. Độ chính xác trung gian

Tiến hành trong cùng một phòng thí nghiệm nhưng bởi 2 kiểm nghiệm viên khác nhau và hai ngày phân tích khác nhau, kết quả được trình bày trong Bảng 4.

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

<i>Hoạt chất</i>	<i>KNV 1</i>	<i>KNV 2</i>	<i>Giữa 2 KNV</i>
α -ketovalin calci	100,35%; n = 6; RSD = 0,64%	99,5%; n = 6; RSD = 0,60%	99,9%; n = 12; RSD = 0,71%
α -ketoisoleucin calci	97,2%; n = 6; RSD = 0,64%	95,9%; n = 6; RSD = 0,61%	96,5%; n = 12; RSD = 0,93%
α -hydroxymethionin calci	102,6%; n = 6; RSD = 0,69 %	103,3%; n = 6; RSD = 0,77%	103,0%; n = 12; RSD = 0,79%
α -ketoleucin calci	99,1%; n = 6; RSD = 0,92 %	98,4%; n = 6; RSD = 0,66%	98,7%; n = 12; RSD = 0,85%
α -ketophenylalanin calci	102,0%; n = 6; RSD = 0,83%	100,2%; n = 6; RSD = 0,87%	101,1%; n = 12; RSD = 1,23%

Kết quả cho thấy phương pháp định lượng đạt yêu cầu về độ chính xác trung gian với các giá trị RSD (n = 12) < 3,0%.

4. Kết luận

Phương pháp sắc ký lỏng pha đảo đã được thiết lập để định lượng đồng thời α -ketovalin calci, α -ketoisoleucin calci, α -hydroxymethionin calci, α -ketoleucin calci và α -ketophenylalanin calci trong viên nén bao phim có chứa 5 hoạt chất trên, các acid amin và các tá dược. Phương pháp đã xây dựng sử dụng cột Agilent C18 (150 x 4,6 mm; 5 μ m) trong quá trình phân tích. Pha động là dung dịch đệm phosphat pH 3,0 – Acetonitril (95 : 5); tốc độ dòng 1,0 ml/phút; thể tích tiêm 20 μ l; detector DAD ở bước sóng 215 nm. Phương pháp đã được thẩm định về độ đặc hiệu, độ thích hợp hệ thống, độ tuyến tính, độ đúng, khoảng xác định, độ lặp lại và độ chính xác trung gian. Kết quả thẩm định cho thấy phương pháp được xây dựng hoàn toàn phù hợp cho việc định lượng đồng thời α -ketovalin calci, α -ketoisoleucin calci, α -hydroxymethionin calci, α -ketoleucin calci và α -ketophenylalanin calci trong viên nén bao phim Ketovital và có thể áp dụng định lượng các hoạt chất này trong các chế phẩm thuốc có thành phần tương tự.

Tài liệu tham khảo

1. Bộ Y tế (2009), *Dược điển Việt Nam*, Lần xuất bản thứ tư, NXB Y học, Hà Nội.
2. *Dược điển Anh* (BP), (2013).
3. *Dược điển Nhật* (JP. 16), (2011).
4. *Dược điển Mỹ* (USP. 38), (2015).

SUMMARY

A reversed-phase liquid chromatography assay method was developed for simultaneous determination of α -Ketovaline calcium, α -Ketoisoleucine calcium, α -Hydroxymethionine calcium, α -Ketoleucine calcium and α -Ketophenylalanine calcium in Ketovital coated-film tablet. The method was carried by using an Agilent C18 (150 x 4.6 mm; 5 μ m) column and a buffer pH 3.0 (dissolve 9.71 g Potassium dihydrogenphosphate in 1000 ml of water, adjust pH = 3.0 $\pm$ 0.05 with Acid phosphoric) – Acetonitrile (95 : 5) as mobile phase. The flow rate of mobile phase is 1.0 ml per minute, injection volume 20 μ l, analysis was detected by a DAD detector set at 215 nm. The method was validated in specificity, linear range, accuracy, range and precision. Validation results proved that the developed method was suitable for simultaneous determination of α -Ketovaline calcium, α -Ketoisoleucine calcium, α -Hydroxymethionine calcium, α -Ketoleucine calcium and α -Ketophenylalanine calcium assay in Ketovital coated-film tablet and other products with similar ingredients.

NGHIÊN CỨU ĐỊNH LƯỢNG ISOSORBID 5 MONONITRAT TRONG HUYẾT TƯƠNG NGƯỜI BẰNG PHƯƠNG PHÁP LC-MS/MS

TẠ MẠNH HÙNG, LÊ THỊ LA, HOÀNG VĂN ĐỨC, NGÔ ĐỨC LIÊM

Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương

1. Đặt vấn đề

Isosorbid 5 mononitrat ($C_6H_9NO_6$; KLPT: 191,14 g/mol) dùng để dự phòng và điều trị lâu dài chứng đau thắt ngực. Ở mức liều khuyến nghị sử dụng 60 mg, nồng độ tối đa trong huyết tương người rất nhỏ, cỡ vài chục ng/ml [1]. Do vậy, để xác định nồng độ Isosorbid 5 mononitrat trong các mẫu huyết tương người bằng các phương pháp sắc ký với các detector thông thường là không khả thi. Tham khảo một số phương pháp phân tích đã được các tác giả công bố [2],[3],[4], đồng thời dựa trên nguyên lý của phương pháp sắc ký lỏng - khối phổ và độ nhạy của thiết bị, chúng tôi đã tiến hành nghiên cứu định lượng Isosorbid 5 mononitrat trong huyết tương người bằng phương pháp LC-MS/MS.

2. Thực nghiệm

2.1. Nguyên vật liệu

- *Chất chuẩn của Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương:*

+ Isosorbid 5 mononitrat (5-ISMN): Chuẩn làm việc, SKS: WS. 0107224, hàm lượng: 99,76%, độ ẩm: 0,04%.

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

- *Dung môi, hóa chất:* Methanol, amoni acetat, diethylether, cloroform đạt tiêu chuẩn tinh khiết dùng cho phân tích hoặc sắc ký.

- *Huyết tương trắng:* Không có 5-ISMN của Viện Huyết học và Truyền máu Trung ương.

2.2. Thiết bị và dụng cụ phân tích

2.2.1. Thiết bị

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

- Máy sắc ký lỏng khối phổ Xevo TQD (Waters – Mỹ);

- Cân phân tích Sartorius CP224S (Thụy Sĩ, độ chính xác $d = 0,1$ mg);

- Tủ lạnh sâu $-35^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ (Sanyo – 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 sắc ký: C18; 100 x 2,1 mm; 1,7 μm . Nhiệt độ cột 40°C .

- Pha động: MeOH - dung dịch amoni acetat 2 mM (tỷ lệ thích hợp).

- Tốc độ dòng: 0,2 ml/phút.

- Detector: Xevo TQD.

- Thể tích tiêm: 5 μl .

- Nhiệt độ autosampler: 20°C .

2.3.2. Điều kiện khối phổ

Kiểu khối phổ hai lần (MS/MS), nguồn ion hóa kép ESI/APCI, cộng kết ion acetat (CH_3COO , $m/z = 59$) và quét phổ khối ở chế độ điện tích âm. Các thông số của thiết bị khối phổ để phát hiện 5-ISMN và cloramphenicol được trình bày ở Bảng dưới:

Bảng 1. Các thông số của detector khối phổ dùng để định lượng 5-ISMN và cloramphenicol

<i>Chất phân tích</i>	<i>5-ISMN</i>	<i>Cloramphenicol</i>
<i>Thông số</i>		
Điện thế mao quản (kV)	3,0	3,0
Điện thế tại đầu chóp thu nhận ion (V)	12	11
Nhiệt độ hóa hơi dung môi ($^{\circ}\text{C}$)	300	300
Tốc độ khí bay hơi dung môi (lít/h)	800	800
Tốc độ khí tại đầu chóp thu nhận ion (lít/h)	20	20
Năng lượng phân mảnh ion (V)	8	10
Ion ban đầu (Dalton)	250	321
Ion hình thành (Dalton)	59	152

2.3.3. Phương pháp xử lý mẫu

Thêm 50 μl dung dịch chuẩn nội (nồng độ chính xác khoảng 20 $\mu\text{g/ml}$) vào 0,5 ml mẫu huyết tương (HT) đã đã đông ở nhiệt độ phòng. Thêm 3 ml hỗn hợp dung môi

diethylether - cloroform (tỷ lệ thích hợp). Lắc, ly tâm 3000 vòng/phút x 10 phút. Hút 2 ml lớp trên, bốc hơi thu cặn, dưới áp suất giảm. Hòa tan cặn trong 0,5 ml pha động, tiêm sắc ký.

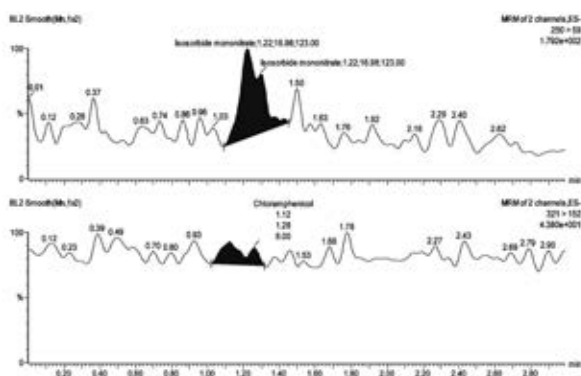
2.3.4. Phương pháp tính kết quả

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

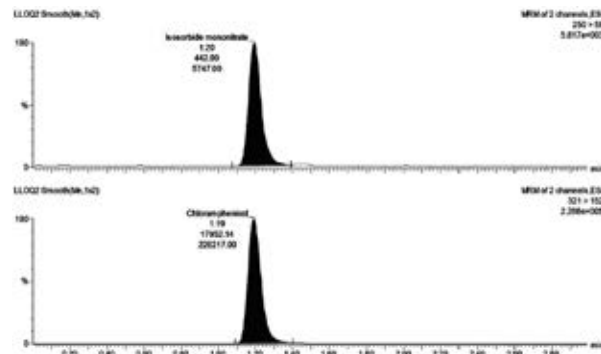
3. Kết quả và bàn luận

3.1. Độ đặc hiệu - chọn lọc của phương pháp

Phân tích các mẫu HT trắng, mẫu HT tự tạo chứa chuẩn nội và 5-ISMN nồng độ khoảng 10 ng/ml theo phương pháp đã xây dựng và ghi lại sắc đồ (Hình 1, 2).



Hình 1. SKĐ mẫu HT trắng



Hình 2. SKĐ mẫu HT trắng có IS và 5-ISMN nồng độ 10 ng/ml

Trên SKĐ của mẫu HT trắng (Hình 1), tại các thời điểm 1,20 và 1,19 phút (trùng với thời gian lưu của 5-ISMN và IS trong SKĐ của mẫu chuẩn - Hình 2) không xuất hiện các pic có các mảnh phổ khối $m/z = 250 \rightarrow 59$ (5-ISMN) và $m/z = 321 \rightarrow 152$ (IS). Do vậy, phương pháp phân tích có độ đặc hiệu-chọn lọc với 5-ISMN và IS theo các quy định của phương pháp phân tích thuốc trong dịch sinh học [5].

3.2. Đường chuẩn và khoảng tuyến tính

Phân tích các mẫu HT chứa chuẩn nội và chuẩn 5-ISMN có nồng độ khoảng 10 ng/ml đến 2000 ng/ml theo quy trình đã xây dựng. Xác định sự tương quan giữa nồng độ 5-ISMN có trong mẫu và tỉ lệ diện tích pic 5-ISMN/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

Mẫu chuẩn Nồng độ (ng/ml)	Độ đúng (%)				
	Đường chuẩn 1	Đường chuẩn 2	Đường chuẩn 3	Đường chuẩn 4	Đường chuẩn 5
10,1	105,1	101,2	102,1	98,1	102,1
20,2	87,6	96,8	95,4	103,1	94,9
100,9	108,0	99,2	101,4	103,3	99,6
201,8	108,8	108,6	100,9	101,0	109,2
403,7	91,3	106,1	101,7	100,8	103,6
1009,2	106,6	90,2	98,4	96,7	100,5
1513,8	99,5	100,3	99,9	98,0	97,5
2018,3	93,0	97,5	100,2	99,0	92,6
Phương trình hồi quy* ($y = ax + b$)	$y = 0,0020 x + 0,0026$	$y = 0,0021 x + 0,0002$	$y = 0,0021 x + 0,0033$	$y = 0,0021 x + 0,0013$	$y = 0,0020 x + 0,0014$
Hệ số r	0,9957	0,9980	0,9997	0,9996	0,9983

(*) Ghi chú: x là nồng độ 5-ISMN (ng/ml) có trong mẫu; y là tỷ lệ diện tích pic 5-ISMN/IS

Kết quả thẩm định cho thấy trong khoảng nồng độ từ 10 ng/ml đến 2000 ng/ml có sự tương quan tuyến tính giữa nồng độ 5-ISMN và tỷ lệ diện tích pic 5-ISMN/IS với hệ số tương quan xấp xỉ bằng 1.

Nồng độ 5-ISMN 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 [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 5-ISMN có nồng độ chính xác khoảng 10 ng/ml (mẫu LLOQ). Xác định nồng độ 5-ISMN 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 (10 ng/ml)			
	Diện tích pic	Diện tích pic 5-ISMN	Diện tích pic IS	Nồng độ 5-ISMN tìm thấy (ng/ml)	Độ đúng (%)
1	28	427	17568	10,6	104,8
2	17	442	17952	10,7	106,3
3	18	495	18704	11,6	115,3
4	21	460	18053	11,2	110,5
5	31	464	18300	11,1	109,9
6	38	493	18583	11,7	115,6
TB	26	464			110,4
CV (%)					4,0
Đáp ứng trung bình của LLOQ/mẫu trắng				18,2	

Kết quả thẩm định cho thấy diện tích pic 5-ISMN trong các mẫu LLOQ đều lớn hơn 5 lần so với diện tích pic tạp có cùng thời gian lưu trong các mẫu trắng. Tỷ lệ giữa nồng độ 5-ISMN xác định từ đường chuẩn so với nồng độ lý thuyết có trong các mẫu LLOQ nằm trong khoảng 104,8% - 115,6% (trung bình = 110,4% và CV = 4,0%), đáp ứng yêu cầu giới hạn định lượng dưới của phương pháp phân tích thuốc trong dịch sinh học [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 5-ISMN có nồng độ tương ứng là 10 ng/ml; 30 ng/ml; 180 ng/ml, 800 ng/ml, 1600 ng/ml. Xác định hàm lượng 5-ISMN 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 (≈ 10 ng/ml)		LQC (≈ 30 ng/ml)		SQC (≈ 180 ng/ml)		MQC (≈ 800 ng/ml)		HQC (≈ 1600 ng/ml)	
	Độ đúng (%)	CV (%)	Độ đúng (%)	CV (%)	Độ đúng (%)	CV (%)	Độ đúng (%)	CV (%)	Độ đúng (%)	CV (%)
Trong ngày	99,4	8,2	100,5	3,5	105,0	1,7	99,1	2,1	94,3	2,9
Khác ngày	97,1	7,5	101,6	6,1	103,1	5,2	101,6	3,9	98,1	3,2

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 10%.

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

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

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

Độ ổn định	Mẫu	Nồng độ ban đầu (ng/ml; n = 6)	Nồng độ sau bảo quản (ng/ml; n = 6)	% Sai khác
3 chu kì đông - rã	LQC	33,1	34,1	3,2%
	HQC	1625,2	1797,5	10,6%
Độ ổn định thời gian ngắn (6 giờ, nhiệt độ phòng)	LQC	33,1	29,4	-11,1%
	HQC	1625,2	1493,3	-8,1%
Độ ổn định trong autosampler (72 giờ/20 °C)	LQC	31,9	30,2	-5,1%
	HQC	1594,8 9	1590,0	-0,3%
Độ ổn định dài ngày (-35 °C ± -5 °C, 70 ngày)	LQC	33,1	33,0	-0,2%
	HQC	1625,2	1838,9	13,2%

4. Kết luận

Nghiên cứu đã xây dựng được phương pháp định lượng Isosorbide 5 mononitrat 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 (10 ng/ml); khoảng tuyến tính rộng (từ 10 ng/ml đến 2000 ng/ml); độ đúng dao động trong khoảng 94,3%-105,0%; độ lặp lại với giá trị CV% nhỏ (1,7%-8,2%), thời gian phân tích ngắn (3,0 phút cho mỗi mẫu), đáp ứng yêu cầu đối với phương pháp phân tích thuốc trong dịch sinh học của US-FDA và EMA. 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 Isosorbide 5 mononitrat.

Tài liệu tham khảo

1. Bộ Y tế (2015), *Dược thư quốc gia Việt Nam*, Lần xuất bản thứ 2, Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật, trang 846-847.
2. Deepak S. Jain, Gunta Subbaiah, Mallika Sanyal, Pranav S. Shrivastav, Usha Pal, Shailesh Ghataliya, Abhijeet Kakad, Jignesh Bhatt, Vaneet Munjal, Heena Patel (2006), “An extensive study on isosorbide-5-mononitrate acid adducts for quantification in human plasma using liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry and its application to bioequivalence sample analysis”. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, Volume 20, Issue 19, pp. 2921–2931.
3. Lara C. Silva, Lina S.O.B. Oliveira, Gustavo D. Mendes, Gabriel Garcia, Alberto dos Santos Pereira, Gilberto De Nucci (2006), “Quantification of isosorbide 5-mononitrate in human plasma by liquid chromatography–tandem mass spectrometry using atmospheric pressure photoionization”. *Journal of Chromatography B*, 832 (2006), pp. 302–306.
4. Li Peng-fei, Liu Li-hong, Ma Ping, Sun Jian-zi, Tong Wei-hang; Yang Jing-yan, Wang Wen-jian (2008), “LC-MS/MS determination of isosorbide-5-mononitrate in human plasma”. *Chinese Journal of Pharmaceutical Analysis*, Vol. 28, No. 4, pp. 528-531.
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 Isosorbide 5 mononitrate in human plasma. The 5-ISMN and IS were extracted from human plasma by using the mixture of Diethylether and Chloroform. Analytes were chromatographed on a C18 column (100 x 2.1 mm; 1.7 µm) with isocratic elution using detector Xevo TQD. The mobile phase consists of Methanol and Ammonium acetate solution with suitable ratio. The assay was linear over the concentration range of 10-2000 ng/ml. The LLOQ was 10 ng/ml. The intra-day and inter-day accuracy were within 94.3% - 105.0%. This method can be used for BE studies of Isosorbide 5 mononitrate preparations.

ĐÁNH GIÁ KHẢ NĂNG ĐỊNH LƯỢNG SILDENAFIL CITRAT TRONG VIÊN NÉN BẰNG PHƯƠNG PHÁP QUANG PHỔ CẬN HỒNG NGOẠI

BÙI VĂN TRUNG, TRẦN THỊ BÍCH VÂN, BÙI QUỐC THÁI,
TRẦN VIỆT HÙNG, ĐOÀN CAO SƠN
Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương

1. Đặt vấn đề

Số lượng thuốc trên thị trường ngày càng lớn, chủng loại ngày càng đa dạng, các phương pháp phân tích truyền thống cho kết quả chính xác nhưng tốn rất nhiều thời gian.... Với sự phát triển của khoa học và công nghệ, nhiều phương pháp phân tích mới được ứng dụng không những giúp phân tích thuốc nhanh, chính xác mà các thiết bị còn có cấu tạo rất gọn nhẹ, tiện dụng giúp phân tích thuốc cả trong quá trình sản xuất và tại hiện trường.

Năm 2013, Viện Kiểm nghiệm thuốc TW triển khai đề tài Nghị định thư “*Nghiên cứu một số phương pháp phân tích phát hiện nhanh thuốc giả sử dụng các thiết bị phổ hiện đại (Phổ Raman, Phổ hồng ngoại gần chuyển dạng Fourier và phổ nhiễu xạ tia X-XRD)*”. Quá trình nghiên cứu cho thấy phương pháp quang phổ Raman nổi bật lên với khả năng định tính nhanh với độ đặc hiệu cao và khả năng phát hiện được chất trong mẫu ở nồng độ thấp [6]. Còn phương pháp quang phổ cận hồng ngoại (NIR) cũng thể hiện rất nhiều lợi thế bởi khả năng định lượng trực tiếp với độ chính xác cao [5].

Các công bố trước đó chủ yếu tập trung vào việc xây dựng các mô hình phân tích chung cho các sản phẩm khác nhau của cùng dạng bào chế viên nén hoặc viên

nang, do đó trên đối tượng cụ thể thì độ chính xác của phép phân tích chưa cao, kết quả phân tích chỉ mang tính chất sàng lọc [2],[3]. Để khai thác thêm những thế mạnh của phương pháp quang phổ cận hồng ngoại, chúng tôi đã tiến hành nghiên cứu đánh giá khả năng định lượng của phương pháp này trên một vài đối tượng cụ thể. Trong bài báo này, chúng tôi tiến hành đánh giá khả năng định lượng trực tiếp sildenafil citrat trong một số nền viên nén tự tạo.

Nhóm nghiên cứu rất mong nhận được sự hợp tác của các đồng nghiệp đang công tác tại các phòng kiểm tra chất lượng cũng như các phòng thí nghiệm của các công ty sản xuất dược phẩm trong cả nước để đánh giá thêm hiệu quả của phương pháp quang phổ NIR trên các mẫu thực tế.

2. Thực nghiệm

2.1. Nguyên vật liệu và thiết bị nghiên cứu

2.1.1 Nguyên vật liệu

- Chất chuẩn: Sildenafil citrat do Viện Kiểm nghiệm thuốc TW sản xuất, Hàm lượng = 98,35% (nguyên trạng), SKS: WS.0214265.02;

- Tá dược:

TT	Tá dược	Xuất xứ	TT	Tá dược	Xuất xứ
1	Aerosil	Việt Nam	7	Magnesi stearat	Trung Quốc
2	CaHPO ₄	Việt Nam	8	Natri croscamelose	Trung Quốc
3	Cellulose vi tinh thể	Việt Nam	9	Natri lauryl sulfat	Trung Quốc
4	Crospovidon	Trung Quốc	10	Povidon	Việt Nam
5	HPMC	Trung Quốc	11	Talc	Trung Quốc
6	Lactose	Trung Quốc	12	Tinh bột ngô	Trung Quốc

2.1.2. Thiết bị

Các thiết bị sử dụng trong nghiên cứu đã được hiệu chuẩn theo ISO/IEC 17025 và GLP.

- Máy quang phổ cận hồng ngoại IS50 NIR của hãng Thermo Scientific gồm phần mềm OMNIC phiên bản 9.2 dùng để đo phổ; phần mềm TQ Analyst phiên bản 9.2 dùng để xây dựng phương pháp và định lượng.

- Máy quang phổ cận hồng ngoại cầm tay Micro Phazir của hãng Thermo Scientific, phần mềm Micro

Phazir phiên bản 4.0 dùng để đo phổ; Phần mềm Method Generator phiên bản 4.0 dùng để xây dựng phương pháp định lượng.

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

2.2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Đối tượng nghiên cứu

Một số viên nén mô hình tự tạo chứa sildenafil.

2.2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.2.1. Nguyên tắc chung

Trong phương pháp quang phổ NIR, đáp ứng phổ NIR của cả dược chất và tá dược là khá lớn. Do đó, khi thay đổi tỉ lệ khối lượng của dược chất trong nền mẫu thì tỉ lệ các đặc trưng của dược chất và tá dược cũng thay đổi theo. Việc xác định tỉ lệ (kl/kl) của dược chất trong nền mẫu được xác định thông qua mối liên quan giữa tỉ lệ đáp ứng phổ đặc trưng của dược chất và đáp ứng phổ đặc trưng của tá dược trong nền mẫu.

Bằng các phương pháp toán hóa (PCL, PLS, MLR, PCR), xác định được mối liên hệ tuyến tính giữa sự thay đổi đặc trưng phổ và tỉ lệ dược chất. Sau đó từ phổ đồ của mẫu phân tích, so sánh với giá trị phổ trong đường tuyến tính vừa thiết lập để quy ra hàm lượng (kl/kl) của dược chất, và cuối cùng tính ra khối lượng hoặc hàm lượng (so với nhãn) của dược chất trong mẫu [4].

2.2.2.2. Điều kiện phân tích

Thông số	Máy NIR để bàn	Máy NIR cầm tay
Chế độ đo	Phản xạ khuếch tán	Phản xạ khuếch tán
Độ phân giải	8 cm ⁻¹	12 cm ⁻¹
Dải đo	4000 cm ⁻¹ đến 10000 cm ⁻¹	4167 cm ⁻¹ đến 6250 cm ⁻¹

2.2.2.3. Xây dựng công thức và chế tạo viên mô hình

Nghiên cứu xây dựng công thức bào chế và chế tạo 5 loại viên nén mô hình chứa sildenafil citrat trên các nền mẫu khác nhau. Nền mẫu của các loại viên mô hình được mô phỏng theo công thức cấu tạo chung của các thuốc viên nén chứa sildenafil với hàm lượng sildenafil citrat trong mỗi viên tương đương với khoảng 100 mg sildenafil. Đồng thời, trên mỗi nền mẫu chế tạo thêm viên có hàm lượng sildenafil thay đổi xung quanh hàm lượng viên mô hình để sử dụng xây dựng và thẩm định các quy trình phân tích.

Bản chất của phép định lượng là xác định tỉ lệ khối lượng của dược chất trong nền mẫu, từ tỉ lệ khối lượng ấy và khối lượng viên có thể quy ngược ra hàm lượng sildenafil thực tế trong viên. Để đảm bảo độ ổn định và chính xác của phép đo, các viên nghiên cứu được chế tạo với khối lượng khoảng 500 mg, còn hàm lượng (kl/kl) của sildenafil trong các mẫu viên vẫn đảm bảo đúng như đã dự kiến.

2.2.2.4. Xây dựng quy trình phân tích

- Xác định khoảng hàm lượng tuyến tính cần khảo sát. Xây dựng các viên nén có hàm lượng sildenafil citrat thay đổi xung quanh hàm lượng của viên mô hình trên từng nền tá dược tương ứng.

- Khảo sát các phương pháp toán hóa để lựa chọn phương pháp phù hợp cho việc xây dựng đường chuẩn định lượng.

2.2.2.5. Đánh giá quy trình phân tích

Đánh giá độ tuyến tính; độ đặc hiệu; độ đúng và độ lặp lại của quy trình phân tích.

3. Kết quả và bàn luận

3.1. Viên mô hình

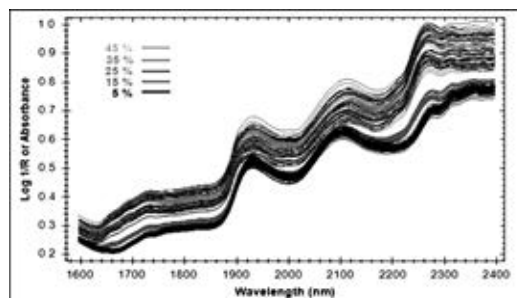
Công thức các viên mô hình được xây dựng dựa trên nền tá dược cơ bản của viên nén, gồm các tá dược như độn, rã, dính, trơn... Hàm lượng (kl/kl) của sildenafil citrat trong công thức các viên mô hình được thể hiện trong Bảng 1.

Bảng 1. Hàm lượng sildenafil citrat trong công thức các viên mô hình

TT	Tên công thức	Hàm lượng (% kl/kl)
1	Công thức 1	25,25
2	Công thức 2	24,36
3	Công thức 3	25,45
4	Công thức 4	24,93
5	Công thức 5	23,41

3.2. Quy trình phân tích

Do hàm lượng (kl/kl) sildenafil citrat ở các công thức viên mô hình là khoảng 25%, để đảm bảo độ chính xác cho phép đo, lựa chọn 5 điểm hàm lượng tương ứng là 5%, 15%, 25%, 35% và 45% để xây dựng đường tuyến tính. Mỗi điểm hàm lượng đo phổ của 5 viên.

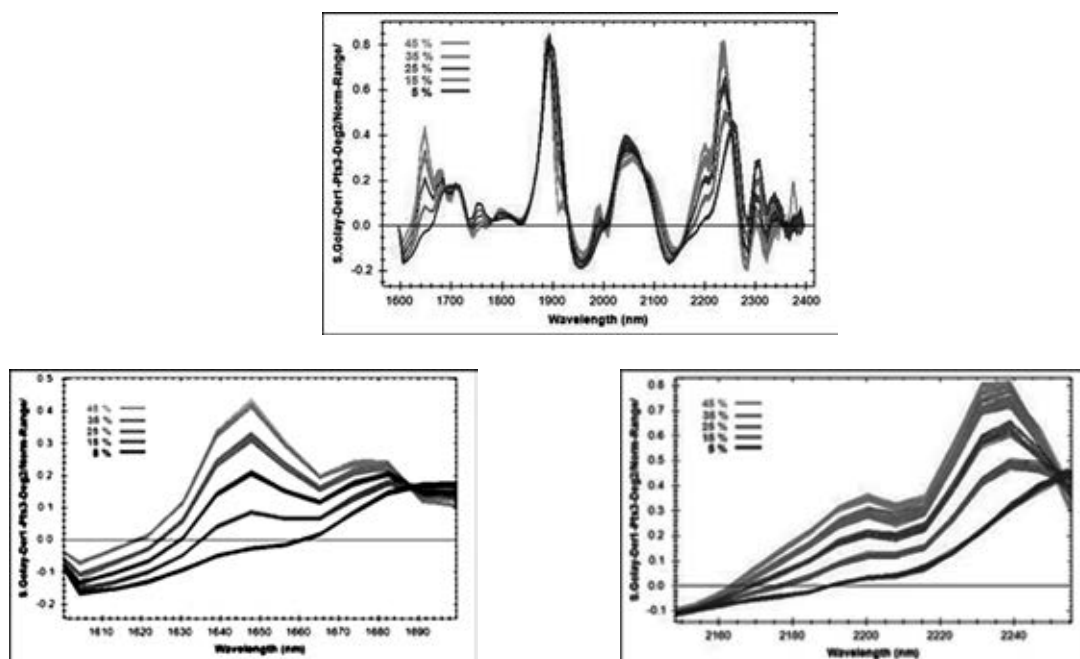


Hình 1. Phổ đồ NIR thu được từ các nồng độ khác nhau trên nền viên nén công thức 1 bằng máy cầm tay

Phổ thu được ở Hình 1 cho thấy vì quang trình giữa các lần đo trong chế độ phản xạ khuếch tán là khác nhau nên cường độ phổ thu được cũng khác nhau nên kết quả chồng phổ cho thấy cường độ phổ ở các nồng độ đo khác nhau là khác nhau, cường độ phổ giữa các lần đo liên tiếp của cùng một nồng độ cũng khác nhau đáng kể. Do đó, rất khó có thể tìm được mối liên quan nhất quán giữa đáp ứng phổ và nồng độ chất phân tích.

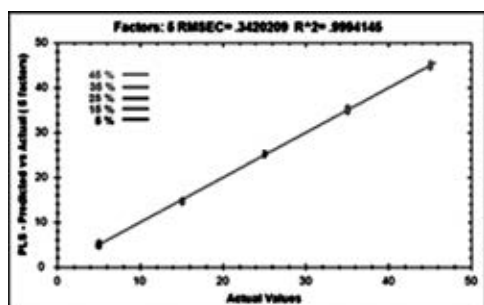
Để có thể xây dựng được phương pháp định lượng cần phải có sự can thiệp của các phương pháp toán hóa. Trước tiên, đó là các phương pháp tiền xử lý phổ. Nhóm nghiên cứu đã khảo sát trên nhiều phương pháp tiền xử

lý phổ khác nhau, và đã chọn ra được phương pháp thích hợp, tiền xử lý phổ bằng đạo hàm bậc nhất. Sau đạo hàm, phổ đồ của các mẫu đã được sắp xếp lại, đã xuất hiện một số vị trí mà đáp ứng phổ thay đổi theo sự thay đổi của hàm lượng sildenafil citrat trong mẫu (Hình 2). Các vị trí này định hướng cho việc lựa chọn các vị trí phổ để xây dựng phương pháp định lượng.



Hình 2. Phổ đạo hàm bậc 1 của các phổ đồ thu được ở Hình 1

Bước tiếp theo, lựa chọn các phương pháp xây dựng đường chuẩn định lượng. Trong các phương pháp toán hóa được sử dụng để xây dựng đường chuẩn (hồi quy thành phần chính (PCR), hồi quy tuyến tính đa biến (MLR) và hồi quy tuyến tính từng phần (PLS)), chúng tôi chọn phương pháp PLS vì nó tiện hiệu chỉnh và trực quan hơn. Hình 3 là đường chuẩn định lượng đại diện cho các đường chuẩn mà chúng tôi đã xây dựng.



Hình 3. Đường chuẩn định lượng sildenafil citrat bằng máy cảm tay trên nền viên mô hình công thức 1 được xây dựng bằng phương pháp PLS

Làm tương tự cho các nền mẫu khác, quy trình được thực hiện như nhau trên cả máy để bàn và máy cảm tay. Kết quả về đường tuyến tính thu được như sau:

Bảng 2. Hệ số tương quan tuyến tính của các quy trình phân tích

Tên viên mô hình	Máy để bàn	Máy cảm tay
Công thức 1	1,0000	0,9997
Công thức 2	0,9999	0,9995
Công thức 3	1,0000	0,9998
Công thức 4	1,0000	0,9997
Công thức 5	1,0000	0,9992

Đường tuyến tính đã xây dựng cũng chính là cơ sở để chiếu phổ để tính toán ra hàm lượng chất phân tích ở các nồng độ khác nhau.

3.3. Đánh giá quy trình phân tích

3.3.1. Đánh giá độ tuyến tính

Kết quả đánh giá độ tuyến tính được trình bày ở Bảng 2. Các quy trình phân tích đã xây dựng có hệ số tương quan R rất cao (trên 0,999) và hệ số tuyến tính của máy để bàn cao hơn máy cảm tay.

3.3.2. Đánh giá độ đặc hiệu

Kết quả kiểm tra hàm lượng sildenafil citrat trong các nền placebo được trình bày trong Bảng 3. Mỗi kết quả thu được là giá trị trung bình của 3 lần định lượng liên tiếp.

Bảng 3. Kết quả khảo sát độ đặc hiệu của các quy trình định lượng

Thứ tự	Hàm lượng % (Máy để bàn)	Hàm lượng % (Máy cầm tay)
Công thức 1	0,10	0,08
Công thức 2	0,05	0,07
Công thức 3	0,11	0,06
Công thức 4	0,06	0,04
Công thức 5	0,05	0,08

Từ bảng trên, giá trị lớn nhất thu được là 0,11% (kl/kl) tương ứng với khoảng 0,45% so với hàm lượng

sildenafil citrat có trong viên. Như vậy, các quy trình phân tích đã xây dựng đáp ứng được yêu cầu về độ đặc hiệu của các phương pháp định lượng thông thường (ảnh hưởng của nền placebo không quá 2,0%) [1].

3.3.3. Đánh giá độ đúng và độ lặp lại

Đối với mỗi nền mẫu, tiếp tục xây dựng thêm các viên có hàm lượng 15% và 35% (kl/kl). Sử dụng các quy trình đã xây dựng để kiểm tra hàm lượng các viên vừa chế tạo và các viên mô hình tương ứng ở mỗi công thức. Mỗi điểm nồng độ kiểm tra 05 viên đánh giá độ lặp lại và sai số so với lượng chuẩn đã sử dụng để chế tạo viên.

Bảng 4. Kết quả độ đúng và độ lặp lại của phương pháp

Viên mô hình	HL thực (%)	Máy để bàn			Máy cầm tay		
		HL (%)	Sai số (%)	RSD (%)	HL (%)	Sai số (%)	RSD (%)
Công thức 1	15,07	15,05	0,02	0,39	14,74	0,33	1,19
	25,46	25,48	0,04	0,18	25,32	0,12	1,01
	35,03	34,82	0,21	1,78	35,05	0,02	0,89
Công thức 2	15,03	15,34	0,31	1,34	15,10	0,07	2,07
	24,38	24,32	0,06	0,96	24,15	0,23	1,86
	35,01	34,90	0,11	0,64	34,89	0,12	1,75
Công thức 3	15,01	15,05	0,04	0,92	15,05	0,04	1,33
	25,15	25,07	0,08	0,25	25,26	0,11	1,64
	34,99	34,97	0,02	0,41	34,96	0,03	1,00
Công thức 4	15,08	15,33	0,25	0,22	15,09	0,01	1,54
	25,41	25,36	0,05	0,11	25,35	0,06	1,35
	35,00	34,95	0,05	0,26	35,22	0,22	0,63
Công thức 5	15,00	14,90	0,10	1,67	14,69	0,31	1,18
	24,86	25,01	0,15	0,18	24,92	0,06	0,95
	34,97	34,97	0,00	0,00	35,00	0,03	0,90

Kết quả đánh giá độ đúng và độ lặp lại ở **Bảng 4** cho thấy rằng:

+ Sai số tuyệt đối trung bình (hàm lượng % kl/kl) của tất cả các quy trình trên đối với máy để bàn là 0,10% và trên máy cầm tay là 0,12%. Sai số tuyệt đối lớn nhất trên máy để bàn là 0,31%, trên máy cầm tay là 0,33%. Sử dụng phép so sánh thống kê t-test cho hai dãy giá trị sai số trên. Kết quả cho thấy, với độ tin cậy là 95% thì sai số phân tích các mẫu thuốc trên giữa máy để bàn và máy cầm tay khác nhau không có ý nghĩa thống kê.

+ Sai số tuyệt đối ở các điểm hàm lượng là khá tương đồng, song do hàm lượng tuyệt đối của sildenafil citrat trong các điểm nồng độ là khác nhau nên sai số tương đối ở các điểm hàm lượng cũng khác nhau. Các điểm hàm lượng cao có sai số tương đối nhỏ và ngược lại.

Tuy nhiên, trong các quy trình xây dựng được thì sai số tương đối lớn nhất cũng chỉ khoảng 2%, các quy trình đã xây dựng đáp ứng yêu cầu về độ đúng của phương pháp định lượng thuốc thông thường [1].

+ Trung bình độ lệch chuẩn tương đối của các kết quả trên máy để bàn là 1,47% và trên máy cầm tay là 1,99%; độ lệch chuẩn tương đối lớn nhất của máy để bàn là 1,78% trong khi đó, của máy cầm tay là 2,07%. Như vậy, độ lặp lại trên máy để bàn tốt hơn máy cầm tay và tất cả các quy trình đều đáp ứng yêu cầu về độ lặp lại của các phương pháp định lượng thuốc thông thường [1].

3.4. Bàn luận

- Nhờ áp dụng các phương pháp toán hóa, phổ cận hồng ngoại đã trở thành phương pháp phân tích rất hữu

ích. Trước tiên, toán hóa giúp xử lý dữ liệu do sự không ổn định về quang trình của kỹ thuật đo phản xạ khuếch tán gây nên, biến các dữ liệu tán mát, lộn xộn thành các dữ liệu giàu thông tin. Qua đó, phổ cận hồng ngoại vừa có thể sử dụng để định tính, vừa có thể sử dụng để định lượng. Thêm vào đó, nhờ toán hóa, mối liên hệ giữa các dữ liệu phổ và các thành phần chất phân tích được thể hiện rõ ràng, trực quan hơn. Sau khi xử lý toán hóa, bằng mắt thường người ta vẫn nhận ra và đánh giá được mối liên hệ này, qua đó đánh giá được thành phần và tình trạng của mẫu phân tích. Và cuối cùng, mô hình định lượng hoàn chỉnh với độ chính xác cao đã được thiết lập nhờ các thuật toán toán hóa. Cùng với sự phát triển của công nghệ phần mềm, toán hóa đã được áp dụng triệt để từ khâu xây dựng phương pháp đến đánh giá kết quả. Do đó, kết quả mô hình phân tích và kết quả phân tích khách quan hơn.

- Phổ cận hồng ngoại là phương pháp phân tích có tính ưu việt vì độ chính xác của phương pháp không thua kém gì các phương pháp phân tích thông thường, đối với mẫu thuốc dạng viên nén và viên nang nói chung, đối với các mẫu viên nén chứa sildenafil citrat nói riêng, đây là phương pháp phân tích trực tiếp, rất ít phải chuẩn bị mẫu, đỡ tốn thời gian, quá trình phân tích không qua nhiều giai đoạn nên ít bị ảnh hưởng bởi các yếu tố khác, không phải kiểm soát nhiều khâu. Ngoài ra, khi phân tích không tốn dung môi hóa chất nên tiết kiệm chi phí phân tích, đỡ ảnh hưởng đến môi trường. Đặc

biệt là thiết bị cầm tay có độ chính xác cũng cao, có thể sử dụng để định lượng thuốc tại hiện trường hoặc ở các khâu trong quá trình sản xuất được.

- Các quy trình chúng tôi đã xây dựng chỉ khảo sát trên một số nền mẫu tự tạo, tuy nhiên đây là mô hình chung có thể sử dụng cho tất cả các hoạt chất và các nền mẫu khác. Các nghiên cứu việc ứng dụng phương pháp quang phổ cận hồng ngoại trong phân tích thuốc sẽ tiếp tục được chúng tôi công bố thêm trên các số tạp chí tiếp theo.

4. Kết luận

Bài báo đánh giá khả năng định lượng trực tiếp sildenafil citrat trong viên nén bằng cách xây dựng và đánh giá 5 quy trình định lượng sildenafil citrat trên 5 nền mẫu viên nén tự tạo tương ứng. Các quy trình phân tích được xây dựng trên cả thiết bị quang phổ NIR để bàn và cầm tay kết hợp với các thuật toán xử lý số liệu đa biến. Các quy trình đã xây dựng có độ đặc hiệu, độ tuyến tính, độ đúng và độ lặp lại cao. Như vậy, bài báo góp phần làm sáng tỏ thêm rằng phương pháp quang phổ cận hồng ngoại không những có thể đáp ứng được các yêu cầu của một phương pháp định lượng thuốc thông thường, mà còn có ưu thế hơn về khả năng phân tích nhanh, trực tiếp, ít chuẩn bị mẫu và không sử dụng dung môi, hóa chất. Phương pháp này vừa có thể được ứng dụng để kiểm tra, giám sát chất lượng thuốc trong quá trình sản xuất, cũng như ứng dụng để kiểm tra chất lượng thuốc trên thị trường.

Tài liệu tham khảo

1. Bộ Y tế, *Thông tư số 44* ngày 25 tháng 11 năm 2014 của Bộ Y tế Quy định về việc đăng ký thuốc.
2. Nguyễn Thị Hoa, Đoàn Cao Sơn, Trần Thị Bích Vân (2015), "Nghiên cứu ứng dụng phổ cận hồng ngoại để định tính và bán định lượng Ibuprofen trong viên nén và viên nang", *Tạp chí Kiểm nghiệm thuốc*, số 1.2015, trang 24 – 28.
3. Nguyễn Thị Hoa và cộng sự (2015), "Nghiên cứu ứng dụng quang phổ cận hồng ngoại để định tính và bán định lượng Azithromycin trong viên nén và viên nang", *Tạp chí Y học TP. Hồ Chí Minh*, Phụ bản tập 19, Số 3 năm 2015, trang 22 - 31.
4. A.K. Smilde, R. Bro and P. Geladi, *Multi-way Analysis with Applications in the Chemical Sciences*, John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, 2004.
5. H.W. Siesler, Y. Ozaki, S. Kawata, and H. M. Heise (eds.) (2002), *Near-Infrared Spectroscopy*, Wiley-VCH, Weinheim.
6. I. R. Lewis and H. G. M. Edwards (eds.) (2001), *Handbook of Raman Spectroscopy*, Marcel Dekker, New York.

SUMMARY

This experiment was carried out by the assessment on five procedures for directly quantifying Sildenafil citrate in five matrices of respective tablet models. These procedures executed by diffuse reflectance technique by using both benchtop and handheld equipment. The linear models were created from five concentrations around the concentration of Sildenafil citrate in each matrix, and each concentration included five samples by using Savitzky-Golay derivatives algorithm and partial least squares (PLS) regression algorithm. NIR spectra were measured by using Thermo IS50 NIR with the resolution is 8 cm^{-1} in the range from 4000 cm^{-1} to 10000 cm^{-1} and Micro Phazir with the resolution is 12 cm^{-1} in the range 4167 cm^{-1} – 6250 cm^{-1} . Assessment results from each procedures showed that the influences of excipient matrix on the Sildenafil citrate were not more than 0.11% (weight/weight); the correlation coefficients (R) were above 0.9992; the relative standard deviations (RSD) were lower than 2.0% in repeatability; and the differences between the investigated concentrations and the added concentrations were not more than 0.33% (weight/weight). The results also indicated that the repeatability on benchtop equipment was better than the repeatability on handheld equipment. This study once again proved that NIR method satisfy accuracy requirement of common analytical method, but more efficient because it is the direct, non-destructive method.

THẨM ĐỊNH PHÉP THỬ GIỚI HẠN NỘI ĐỘC TỔ VI KHUẨN THEO PHƯƠNG PHÁP TẠO GEL TRONG CHẾ PHẨM THUỐC TIÊM

TRẦN THỊ THANH HUẾ, NGUYỄN THỊ HỒNG VINH,
NGUYỄN THỊ LIÊN, NGUYỄN ĐĂNG LÂM

Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương

1. Đặt vấn đề

Kiểm soát tính an toàn của thuốc, nhất là đối với các chế phẩm tiêm truyền đang được quan tâm đặc biệt trong công tác kiểm tra chất lượng thuốc. Các chỉ tiêu liên quan đến tính an toàn của chế phẩm thường được quy định trong các dược điển bao gồm: tạp chất liên quan, độ vô khuẩn, độc tính bất thường, chất gây sốt hay nội độc tố vi khuẩn. Trong đó, chỉ tiêu nội độc tố (NĐT) vi khuẩn đang dần dần thay thế chỉ tiêu chất gây sốt nhằm đánh giá khả năng gây sốt của các chế phẩm. Nguyên lý của phép thử nội độc tố vi khuẩn là sự tạo gel của thuốc thử LAL (*Limulus amoebocyte lysate*) với nội độc tố có trong mẫu thử. Có 3 phương pháp phổ biến để thử nội độc tố vi khuẩn là phương pháp tạo gel, phương pháp đo độ đục và phương pháp so màu [1],[3],[4]. Trong đó, xác định giới hạn nội độc tố vi khuẩn bằng phương pháp tạo gel là phương pháp đơn giản, dễ thực hiện, ít tốn kém do đầu tư máy móc ít nên được sử dụng rộng rãi nhất hiện nay. Đây còn là phương pháp trọng tài được quy định trong các dược điển khi có sự nghi ngờ về kết quả. Mặc dù thử nội độc tố là một trong những chỉ tiêu quan trọng liên quan đến tính an toàn của sản phẩm nhưng hiện nay trong các hồ sơ đăng ký thuốc, đặc biệt là các hồ sơ của thuốc trong nước, việc thẩm định chỉ tiêu này hầu như chưa được thực hiện. Thực trạng trên một phần là do tài liệu hướng dẫn về thẩm định nội độc tố còn chưa được phổ biến rộng. Do đó, trong nghiên cứu này chúng tôi tiến hành “*Thẩm định phép thử giới hạn nội độc tố vi khuẩn bằng phương pháp tạo gel trong chế phẩm thuốc tiêm*” nhằm góp phần hướng dẫn các cơ sở sản xuất có thể xây dựng và thẩm định chỉ tiêu nội độc tố vi khuẩn cho sản phẩm của mình.

2. Thực nghiệm

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

2.1.1. Thiết bị, dụng cụ

Đã được hiệu chuẩn theo ISO/IEC 17025.

- Buồng thổi khí sạch Sanyo MCV-B131F(T);
- Micropipette eppendorf reference;

- Tủ sấy Memmert;

- Máy ổn nhiệt eppendorf có khả năng duy trì nhiệt độ ở $37 \pm 1^\circ\text{C}$;

- Máy đo pH Metrohm;

- Các ống nghiệm, đầu pipet bằng chất dẻo: dùng loại không có NĐT và chỉ dùng một lần;

- Các dụng cụ thủy tinh: ống nghiệm nhỏ 1 ml, cốc có mỏ được loại bỏ chất gây sốt bằng cách sấy ở 250°C trong ít nhất 30 phút.

2.1.2. Thuốc thử - Chất chuẩn

- Nước BET (Bacterial endotoxins test, không chứa nội độc tố);

- Bộ thuốc thử *Limulus amoebocyte lysate* pyrogen™ plus US license No 1775. Hãng sản xuất: Lonza – Mỹ; Lô: 0000466031.

. *Limulus amoebocyte lysate* pyrogen™ 1,8 ml.

Lô: 0000422255, Độ nhạy: 0,125 EU/ml.

. Chuẩn *E. Coli* 055 B5 endotoxin Lô: 0000396591.

2.2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Đối tượng nghiên cứu

Vinphyton 10 mg (Vitamin K1 10 mg/ml)

Lô: 020616 NSX: 05/06/16 HD: 05/06/18

Nơi sản xuất: Công ty Cổ phần Dược phẩm Vĩnh Phúc.

2.2.2. Quy trình thử giới hạn nội độc tố vi khuẩn bằng phương pháp tạo gel

Nguyên lý: Dựa trên sự tạo gel của thuốc thử LAL với nội độc tố có trong mẫu thử. Phương pháp này kiểm tra xem lượng nội độc tố trong mẫu thử có lớn hơn giới hạn quy định hay không.

2.2.2.1. Chuẩn bị dung dịch thử

Pha loãng dung dịch mẫu thử với nước BET đến độ pha loãng thích hợp dựa vào giới hạn nội độc tố (EL) và độ nhạy (λ) của thuốc thử LAL theo công thức sau:

$$\text{Độ pha loãng tối đa (MVD)} = \frac{\text{Giới hạn nội độc tố (EL)} \times \text{nồng độ dung dịch thử}}{\lambda}$$

2.2.2.2. Thuốc thử LAL và chuẩn nội độc tố

Được pha loãng với nước BET theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

2.2.2.3. Tiến hành

Chuẩn bị các dung dịch A, B, C, D theo bảng sau:

Bảng 1. Bố trí thí nghiệm thử giới hạn nội độc tố bằng phương pháp tạo gel

Dung dịch	Nồng độ nội độc tố thêm vào	Số ống	Ghi chú
A	0/dung dịch thử	2	Mẫu thử ở độ pha loãng $\leq$ MVD
B	2 λ /dung dịch thử	2	NĐT pha trong dung dịch thử: kiểm soát âm tính giả
C	2 λ /nước BET	2	Chuẩn NĐT pha trong nước BET: đối chứng dương tính
D	Nước BET	2	Đối chứng âm tính, kiểm soát điều kiện tiến hành

Giai đoạn phản ứng: Cho vào mỗi ống nghiệm 0,1 ml các dung dịch A, B, C, D và 0,1 ml thuốc thử LAL. Lắc nhẹ ống nghiệm 2-3 giây sau đó ủ ở $37^{\circ}\text{C} \pm 0,1^{\circ}\text{C}$ trong thời gian 60 ± 2 phút. Đọc kết quả sau khi vừa đủ thời gian. Lấy nhẹ ống nghiệm ra khỏi buồng ủ, nghiêng đầu ống nghiệm từ từ đến 180° .

- Nếu dịch thử trong ống nghiệm tạo thành gel không bị chảy ra khi nhẹ nhàng dốc ngược ống nghiệm thì kết quả là dương tính.

- Nếu không tạo thành gel hoặc gel bị chảy loãng thì kết quả là âm tính.

Nhận định kết quả: Phép thử có giá trị nếu cả 2 ống của dung dịch B và C đều cho kết quả dương tính và dung dịch D âm tính.

- Mẫu thử đạt yêu cầu nếu kết quả âm tính ở cả hai ống nghiệm của dung dịch A.

- Mẫu thử không đạt yêu cầu nếu kết quả dương tính ở cả hai ống nghiệm của dung dịch A.

- Nếu hai ống của dung dịch A cho kết quả khác nhau, một ống dương tính và một ống âm tính thì làm lại phép thử. Mẫu thử đạt yêu cầu nếu ở lần thứ hai cả hai ống đều cho kết quả âm tính.

2.2.3. Đề cương thẩm định

2.2.3.1. Kiểm tra pH của mẫu thử

- Tính độ pha loãng tối đa (MVD) của mẫu thử theo mục 2.2.2.1.

- Pha loãng mẫu thử với nước BET để thu được dãy dung dịch thử tương ứng với độ pha loãng MVD/8, MVD/4, MVD/2, MVD.

- Tiến hành đo pH của dãy dung dịch trên.

- Yêu cầu pH mẫu thử trong khoảng 6 – 8.

2.2.3.2. Kiểm tra độ nhạy của thuốc thử LAL

Chuẩn bị dãy dung dịch chuẩn nội độc tố trong nước BET có nồng độ: 2 λ , λ , $\lambda/2$, $\lambda/4$ theo Bảng 2.

Bảng 2. Dãy dung dịch NDT dùng để kiểm tra độ nhạy của thuốc thử LAL

Nồng độ nội độc tố được thêm vào mỗi dung dịch	Dung môi	Hệ số pha loãng	Nồng độ nội độc tố sau khi pha loãng	Số ống nghiệm
2λ/nước BET	Nước BET	1	2λ	4
		2	λ	4
		4	λ/2	4
		8	λ/4	4
0/nước BET	-	-	-	4

Cho vào mỗi ống nghiệm 0,1 ml các dung dịch đã chuẩn bị ở bảng trên và 0,1 ml thuốc thử LAL. Lắc nhẹ ống nghiệm 2-3 giây sau đó ủ ở $37^{\circ}\text{C} \pm 0,1^{\circ}\text{C}$ trong thời gian 60 ± 2 phút. Đọc kết quả sau khi vừa đủ thời gian, đánh dấu ống nghiệm có kết quả dương tính vào bảng. Tính logarit nồng độ “điểm dừng” (nồng độ cuối cùng của dãy có kết quả dương tính) của từng dãy. Độ nhạy của thuốc thử LAL bằng đối logarit của giá trị logarit trung bình. Độ nhạy của thuốc thử ghi trên nhãn là đúng khi lớn hơn hoặc bằng λ/2 và nhỏ hơn hoặc bằng 2,0λ.

2.2.3.3. Xác định khoảng pha loãng phù hợp

- Tiến hành pha loãng dãy mẫu thử như ở mục 2.2.3.1.
- Pha loãng dung dịch chuẩn nội độc tố gốc với nước BET để thu được dung dịch chuẩn nội độc tố có nồng độ 4λ (dung dịch E), và 2λ (dung dịch F).
- Bố trí thí nghiệm theo Bảng 3 (tiến hành lặp lại 2 lần ở mỗi độ pha loãng).

Bảng 3. Thử nghiệm xác định khoảng pha loãng phù hợp của mẫu thử

	Độ pha loãng	Nước BET (μl)	Dung dịch E (μl)	Dung dịch F (μl)	Mẫu thử (μl)	LAL (μl)
Dung dịch chuẩn NDT/mẫu thử	MVD/8	-	50	-	50 (độ pha loãng MVD/16)	100
	MVD/4	-	50	-	50 (độ pha loãng MVD/8)	100
	MVD/2	-	50	-	50 (độ pha loãng MVD/4)	100
	MVD	-	50	-	50 (độ pha loãng MVD/2)	100
Dung dịch mẫu thử	MVD/8	50	-	-	50 (độ pha loãng MVD/16)	100
	MVD/4	50	-	-	50 (độ pha loãng MVD/8)	100
	MVD/2	50	-	-	50 (độ pha loãng MVD/4)	100
	MVD	50	-	-	50 (độ pha loãng MVD/2)	100
Nước BET		100	-	-	-	100
DD chuẩn NDT/ Nước BET		-	-	100	-	100

Tiến hành ủ ở $37^{\circ}\text{C} \pm 0,1^{\circ}\text{C}$ trong thời gian 60 ± 2 phút. Đọc kết quả sau khi vừa đủ thời gian.

Yêu cầu: Phép thử có hiệu lực khi dung dịch nước BET cho kết quả âm tính và dung dịch chuẩn nội độc tố trong nước BET cho kết quả dương tính.

Đánh giá:

- Độ pha loãng không gây ảnh hưởng đến phép thử khi ở độ pha loãng đó dung dịch thử cho kết quả âm tính còn dung dịch chuẩn nội độc tố trong mẫu thử cho kết quả dương tính.
- Độ pha loãng gây ảnh hưởng đến phép thử khi ở độ pha loãng đó dung dịch thử và dung dịch chuẩn nội độc tố

- trong mẫu thử đều cho kết quả âm tính.
- Từ đó tìm ra độ pha loãng tối thiểu không gây ảnh hưởng đến phép thử (ở đó nồng độ được chất và tá dược là cao nhất). Lựa chọn độ pha loãng này để đánh giá các yếu tố ảnh hưởng.
 - Khoảng pha loãng thích hợp: từ độ pha loãng tối thiểu đến độ pha loãng tối đa.

2.2.3.4. Kiểm tra các yếu tố ảnh hưởng

Chuẩn bị các dung dịch I, II, III, IV theo Bảng 4.

Bảng 4. *Dãy dung dịch dùng để kiểm tra các yếu tố ảnh hưởng*

Dung dịch	Nồng độ nội độc tố được thêm vào mỗi dung dịch	Dung môi	Hệ số pha loãng	Nồng độ nội độc tố sau khi pha loãng	Số ống nghiệm
I	0/dung dịch thử	-	Độ pha loãng đã lựa chọn ở mục 2.2.3.3	-	4
II	2λ/dung dịch thử	Dung dịch mẫu thử ở độ pha loãng đã lựa chọn ở mục 2.2.3.3	1	2λ	4
			2	λ	4
			4	λ/2	4
			8	λ/4	4
III	2λ/nước BET	Nước BET	1	2λ	4
			2	λ	4
			4	λ/2	4
			8	λ/4	4
IV	0/nước BET	-	-	-	4

Cho vào mỗi ống nghiệm 0,1 ml các dung dịch đã chuẩn bị ở bảng trên và 0,1 ml thuốc thử LAL. Lắc nhẹ ống nghiệm 2-3 giây sau đó ủ ở 37°C ± 0,1 °C trong thời gian 60 ± 2 phút. Đọc kết quả sau khi vừa đủ thời gian, đánh dấu ống nghiệm có kết quả dương tính vào bảng. Tính logarit nồng độ “điểm dừng” (nồng độ cuối cùng của dãy có kết quả dương tính) của từng dãy. Độ nhạy của thuốc thử LAL bằng đối logarit của giá trị logarit trung bình.

- Yêu cầu:*
- Phép thử có giá trị khi dung dịch I và IV cho phản ứng âm tính và dung dịch III có độ nhạy lớn hơn hoặc bằng λ/2 và nhỏ hơn hoặc bằng 2λ.
 - Nếu độ nhạy của LAL tính theo dung dịch II lớn hơn λ/2 và nhỏ hơn 2λ thì mẫu thử không chứa yếu tố ảnh hưởng.

3. Kết quả và bàn luận

3.1. Kết quả kiểm tra pH của mẫu thử

Dựa vào giới hạn nội độc tố quy định của sản phẩm là không quá 14 EU/mg (lọ 10 mg), tính toán độ pha loãng tối đa (MVD) của sản phẩm là 1120 lần [2]. Tiến

hành pha loãng mẫu thử với nước BET để được các dung dịch có độ pha loãng MVD/16, MVD/8, MVD/4, MVD/2, MVD (tương ứng với các độ pha loãng 70, 140, 280, 560, 1120). Đo pH của dãy dung dịch trên thu được kết quả thể hiện ở Bảng 5.

Bảng 5. *Kết quả kiểm tra pH của dung dịch thử ở các độ pha loãng khác nhau*

Dung dịch	MVD	MVD/2	MVD/4	MVD/8
pH	7	6,8	6,5	6,2

Nhận xét: Từ kết quả kiểm tra pH cho thấy dãy dung dịch thử sau khi pha loãng có pH nằm trong giới hạn cho phép của phép thử là từ 6 đến 8.

3.2. Kiểm tra độ nhạy của thuốc thử LAL

Hoàn nguyên 1 lọ chuẩn nội độc tố với 5,0 ml nước BET → 5,0 ml dung dịch chuẩn nội độc tố S (10 EU/ml). Pha loãng dung dịch chuẩn nội độc tố S với nước BET để được các dung dịch có nồng độ chuẩn nội độc tố lần lượt là 2λ, λ, λ/2, λ/4.

Tiến hành phản ứng theo mục 2.2.3.2, kết quả được thể hiện ở Bảng 6.

Bảng 6. Kết quả kiểm tra độ nhạy của thuốc thử LAL

STT	Nước BET	A2 (mẫu thử)	Chuẩn nội độc tố trong nước BET				Logarit “điểm dừng”
			S1 (2λ)	S2 (λ)	S3 (λ/2)	S4 (λ/4)	
1	-	-	+	+	-	-	-0,9031
2	-	-	+	+	+	-	-1,2041
3	-	-	+	+	-	-	-0,9031
4	-	-	+	+	+	-	-1,2041
Trung bình							-1,0536
Đôi logarit							0,0884

Ghi chú: (-): âm tính, (+): dương tính

Nhận xét: Bảng 6 cho thấy độ nhạy của thuốc thử LAL là 0,0884 EU/ml nằm trong khoảng từ λ/2 đến 2λ (0,0625 EU/ml đến 0,25 EU/ml), đạt yêu cầu quy định.

3.3. Xác định khoảng pha loãng phù hợp

Pha loãng dung dịch chuẩn nội độc tố thành dung dịch có nồng độ 4λ (0,5 EU/ml) và 2λ (0,25 EU/ml). Tiến hành như trong đề cương mục 2.2.3.3, kết quả thể hiện ở Bảng 7.

Bảng 7. Kết quả thử nghiệm xác định khoảng pha loãng phù hợp của mẫu thử

	Độ pha loãng	Nước BET (μl)	Dung dịch S1 4λ (μl)	Dung dịch S2 2λ (μl)	Mẫu thử (μl)	LAL (μl)	Kết quả	
							Ống 1	Ống 2
Dung dịch chuẩn NDT/mẫu thử	MVD/8	-	50	-	50 (MVD/16)	100	+	+
	MVD/4	-	50	-	50 (MVD/8)	100	+	+
	MVD/2	-	50	-	50 (MVD/4)	100	+	+
	MVD	-	50	-	50 (MVD/2)	100	+	+
Dung dịch mẫu thử	MVD/8	50	-	-	50 (MVD/16)	100	-	-
	MVD/4	50	-	-	50 (MVD/8)	100	-	-
	MVD/2	50	-	-	50 (MVD/4)	100	-	-
	MVD	50	-	-	50 (MVD/2)	100	-	-
Nước BET		100	-	-	-	100	-	-
Dung dịch chuẩn NDT/nước BET		-	-	100	-	100	+	+

Nhận xét: Từ Bảng 7 cho thấy độ pha loãng tối thiểu là MVD/8. Khoảng pha loãng thích hợp là từ MVD/8 đến MVD. Lựa chọn độ pha loãng MVD/8 để đánh giá các yếu tố ảnh hưởng.

3.4. Kiểm tra yếu tố ảnh hưởng

Chuẩn bị dãy dung dịch chuẩn nội độc tố trong nước BET có nồng độ lần lượt là 2λ , λ , $\lambda/2$, $\lambda/4$ được chuẩn bị như ở mục 3.2.

Chuẩn bị mẫu thử ở độ pha loãng MVD/8. Pha loãng dung dịch chuẩn nội độc tố S (10 EU/ml) với dung dịch mẫu thử ở độ pha loãng MVD/8 để được các dung dịch có nồng độ chuẩn nội độc tố lần lượt là 2λ , λ , $\lambda/2$, $\lambda/4$.

Tiến hành phản ứng theo mục 2.2.3.4, kết quả được thể hiện ở Bảng 8.

Bảng 8. Kết quả kiểm tra yếu tố ảnh hưởng đến độ nhạy của thuốc thử LAL

TT	Nước BET	A2 (mẫu thử)	Chuẩn NDT trong nước BET				Logarit “điểm dừng”	Chuẩn NDT trong mẫu thử				Logarit “điểm dừng”
			S1 (2λ)	S2 (λ)	S3 ($\lambda/2$)	S4 ($\lambda/4$)		SA1 (2λ)	SA2 (λ)	SA3 ($\lambda/2$)	SA4 ($\lambda/4$)	
1	-	-	+	+	-	-	-0,9031	+	+	+	-	-1,2041
2	-	-	+	+	+	-	-1,2041	+	+	-	-	-0,9031
3	-	-	+	+	-	-	-0,9031	+	+	-	-	-0,9031
4	-	-	+	+	+	-	-1,2041	+	+	+	-	-1,2041
Trung bình							-1,0536					-1,0536
Đổi logarit							0,0884					0,0884

Nhận xét: Từ Bảng 8 cho thấy:

- Dung dịch thử và nước BET cho kết quả âm tính.
- Độ nhạy của thuốc thử LAL trong nước BET là 0,0884 EU/ml và độ nhạy của thuốc thử LAL trong mẫu thử là 0,0884 EU/ml đều nằm trong khoảng từ 2λ đến $\lambda/2$ (0,25 EU/ml đến 0,0625 EU/ml), như vậy mẫu thử không chứa yếu tố ảnh hưởng đến quá trình tạo gel.

4. Kết luận

Quy trình xác định giới hạn nội độc tố bằng phương pháp tạo gel trong chế phẩm thuốc tiêm Vinphyton 10 mg (Vitamin K1 10 mg/ml) do Công ty Cổ phần Dược phẩm Vĩnh Phúc sản xuất đã được xây dựng và thẩm định sự phù hợp (kiểm tra pH mẫu thử ở các độ pha loãng khác nhau, kiểm tra độ nhạy của thuốc thử, xác định khoảng pha loãng phù hợp và kiểm tra các yếu tố ảnh hưởng đến phép thử). Nghiên cứu này có thể được ứng dụng để xây dựng và thẩm định phương pháp xác định nội độc tố vi khuẩn trong các chế phẩm thuốc tiêm ở các cơ sở kiểm nghiệm cấp tỉnh, thành phố và các doanh nghiệp.

Tài liệu tham khảo

1. Bộ Y tế (2009), *Dược điển Việt Nam IV*, phụ lục 13.2 “Phép thử nội độc tố vi khuẩn”, Nhà xuất bản Y học, Hà Nội.
2. *Thông tư số 44/2014/TT-BYT* ngày 25/11/2014 của BYT quy định về việc đăng ký thuốc.
3. *Tiêu chuẩn cơ sở Thuốc tiêm Vinphyton 10 mg* (Vitamin K1 10 mg/ml) của Công ty Cổ phần Dược phẩm Vĩnh Phúc.
4. *British Pharmacopoeia* (2016), Test for Bacterial Endotoxin (LAL Test).
5. *The United States Pharmacopoeia* 38 (2015), Bacterial endotoxin test.

SUMMARY

The validation method of gel –clot bacterial endotoxin test of Vinphyton injection was developed. The pH of sample, test for confirmation of labeled lysate sensitivity, selection of appropriate dilutions, test for interfering factors were done. Validation result proved that the developed method was suitable for determination of the bacterial endotoxin limit in Vinphyton injection.

SO SÁNH CÁC KỸ THUẬT ĐUỔI KHÍ MÔI TRƯỜNG THỬ ĐỘ HÒA TAN (Comparison of the Effectiveness of Various Deaeration Techniques)

Owen S Degenhardt, Bonnie Water, Anna Rebelo-Cameirao,
Annelene Meyer, Heiko Brunner, and Nicholas P.Tolti
(*Dissolution Technology, February 2004, pp. 6-11*)

Người lược dịch: LỤC THỊ VÂN, TRẦN THỊ HỒNG ANH
Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương

1. Giới thiệu

Chuyên luận chung USP Dissolution <711> đã nêu rõ, khí trong môi trường hòa tan có thể gây hiện tượng tạo bọt khí làm thay đổi kết quả thử nghiệm như: thay đổi pH đáng kể đối với các dung dịch không phải dung dịch đệm, ảnh hưởng đến kiểu dòng chảy do tạo bọt, ảnh hưởng đến bản chất của hoạt chất và thay đổi kết quả phân tích [3],[9].

USP khuyến cáo việc đuổi khí bằng cách kết hợp đun nóng và lọc chân không kèm theo khuấy mạnh môi trường hòa tan trong điều kiện chân không [9]. Cho tới nay, nhiều tác giả đã báo cáo về các cách đuổi khí khác nhau như lọc chân không, đun nóng, siêu âm, lọc qua màng và sục khí trơ [1],[2],[4],[5],[6]. Trong đó, phương pháp gọn nhẹ và tốn ít thời gian nhất là sục khí trơ [4], tuy nhiên lại có giá thành lớn [2] do hạn chế về thiết kế phần cứng [7].

Sau khi đuổi khí, môi trường được chuyển vào cốc hòa tan và tiếp tục khuấy trong quá trình thử nghiệm. Như vậy, sẽ xảy ra hiện tượng khí hòa tan trở lại trong quá trình này. Khi tái hòa tan, nồng độ oxy có thể tăng lên tới 275% [1]. Vì vậy, để xác định hiệu quả đuổi khí phải quan tâm đến vấn đề khí hòa tan trở lại và các yếu tố ảnh hưởng đến tốc độ tái hòa tan.

Chuyên luận chung USP <711> cũng thông báo chấp nhận các phương pháp đuổi khí đã được thẩm định khác. Tuy nhiên rất khó để xác định các phương pháp đuổi khí đã được thẩm định vì cho đến nay có ít dữ liệu về hiệu quả của các kỹ thuật đuổi khí. Nghiên cứu này được thực hiện để đánh giá hiệu quả khác nhau của các kỹ thuật đuổi khí hiện hành.

2. Thực nghiệm

2.1. Xác định nồng độ oxy hòa tan

Đo nồng độ oxy hòa tan bằng máy đo cầm tay

YSI Model 55. Để cho kết quả ổn định và chính xác, dung dịch phải được cho chảy qua điện cực. Để đo oxy hòa tan trong bình nón dung tích 1 lít, người ta sử dụng máy kèm thanh khuấy từ để tạo môi trường đồng nhất qua điện cực. Với các thể tích lớn hơn, khuấy đều đầu điện cực trong dung dịch đến khi thu được kết quả ổn định. Trong tất cả các trường hợp, điện cực được nhúng ở độ sâu giữa đáy bình và bề mặt môi trường.

2.2. Lọc chân không

Nước tinh khiết lọc qua Mili Q được đun đến 41°C và khuấy nhẹ, sau đó lọc chân không với màng lọc 0,45 µm và khuấy mạnh trong chân không. Bơm chân không hay máy hút nước tạo ra chân không và áp suất chân không được kiểm soát bằng một thiết bị đo áp suất in-line (Trerice model 9187-08). Oxy hòa tan được đo sau khi đun nóng, lọc, và sau khi để trong chân không ở 5, 10, 15, 20 phút. Các dữ liệu tương tự cũng được đo khi sử dụng hệ thống đun nóng và lọc chân không tự động (Erweka Disofill và Distek's Dosaprep).

2.3. Kỹ thuật sục khí trơ

Thiết bị sục khí bao gồm thùng chứa khí Heli công nghiệp và ống Tygon® kết nối với máy đo tốc độ dòng 150 mm (Omega, model#FL-3405G) và bộ đầu lọc dung môi tích hợp (Upchurch Scientific, 2 µm model A-222 hoặc 10 µm model A-302). Dung bình nón thủy tinh có dung tích thích hợp cho thể tích 1 lít, 6 lít và dung bình lớn hơn với các thể tích 24, 48 và 92 lít khi đuổi khí.

3. Kết quả và bàn luận

3.1. So sánh nồng độ oxy hòa tan khi sử dụng kỹ thuật lọc chân không và sục khí trơ

Có thể dự đoán, lượng oxy bị đuổi ra khỏi môi trường bằng cách lọc chân không sẽ bị ảnh hưởng bởi áp suất chân không sử dụng và thời gian khuấy. Với mục đích tối ưu hóa áp suất chân không với thời gian tiến hành

phù hợp, nhóm nghiên cứu đã tiến hành khảo sát mức độ đuổi khí tại các áp suất khác nhau (-90 kPa, -60 kPa, -30 kPa) (Hình 1). Trong điều kiện áp suất chân không cao hơn sẽ cho tốc độ đuổi khí nhanh hơn. 1 lít dung môi sau khi được đuổi khí trong bình nón có nồng độ oxy hòa tan đo được là 2,8 mg/l (giá trị này ổn định qua các lần thử nghiệm khác nhau với các kiểm nghiệm viên khác nhau). Ở điều kiện chân không và thời gian nhất định, nồng độ oxy hòa tan như vậy thu được sau 5 phút khuấy trong áp suất -60 kPa và nhiệt độ 41,7 °C. Thiết bị tự động Disofill cho kết quả nồng độ oxy hòa tan trung bình 3,4 mg/l ở 37 °C (khoảng một nửa nồng độ bão hòa).

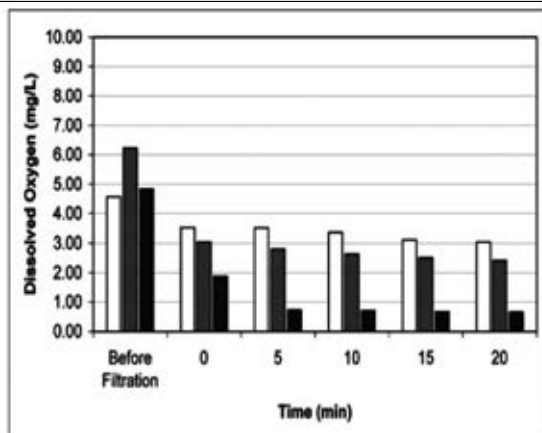


Figure 1: Levels of dissolved oxygen remaining at manual vacuum filtration at pressures of (□) -30 kPa, (■) -60 kPa, and (■) -90 kPa.

Hình 1. Nồng độ oxy hòa tan còn lại sau khi lọc thủ công ở các áp suất 30 kPa; 60 kPa và 90 kPa

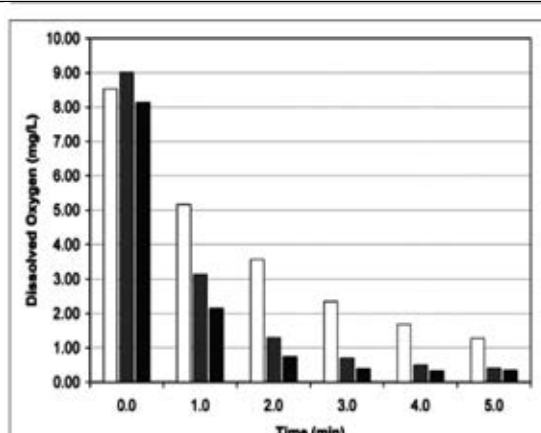


Figure 2: Levels of dissolved oxygen remaining after helium sparging at gas flow rates of (□) 20 mL/s, (■) 40 mL/s, and (■) 60 mL/s.

Hình 2. Nồng độ oxy hòa tan còn lại sau khi sục Heli với tốc độ 20 ml/s; 40 ml/s và 60 ml/s

Tương tự, đuổi khí môi trường hòa tan bằng cách sục heli cũng được nghiên cứu để xác định kỹ thuật này có khả năng thu được mức độ oxy hòa tan tương tự như phương pháp lọc chân không hay không. Mức độ đuổi khí được đo sau khi sục heli qua 1 lít nước với tốc độ 20, 40 và 60 ml/s (Hình 2). Tốc độ đuổi khí bằng sục heli phụ thuộc vào tốc độ dòng khí và thời gian sục. Sục Heli có thể thu được mức nồng độ oxy thấp hơn nhiều với thời gian ngắn hơn so với lọc chân không. Thậm chí với tốc độ dòng thấp nhất (20 ml/s) và thời gian chỉ 2,5 phút đã thu được nồng độ oxy tương tự như cách lọc chân không cho 1 lít nước.

3.2. Sục khí tro trong thùng môi trường hòa tan không chứa đầy

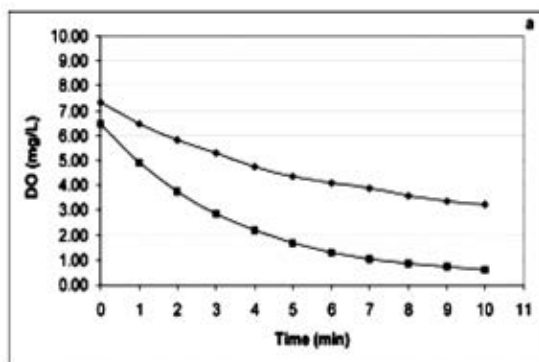


Figure 3a: Levels of dissolved oxygen remaining after helium sparging at gas flow rates 40 mL/s of 6L of water in (○) 48 L carboy and (■) 6L glass Erlenmeyer flask.

Hình 3a. Nồng độ oxy hòa tan còn lại sau khi sục Heli với tốc độ 40 ml/s vào 6 lít nước đựng trong thùng dung tích 48 lít và trong bình nón dung tích 6 lít.

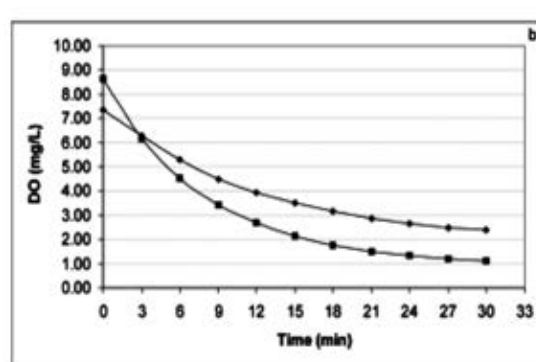


Figure 3b: Levels of dissolved oxygen remaining after helium sparging at gas flow rates 40 mL/s of 24L of water in (○) 48 L carboy and (■) 24 L carboy.

Hình 3b. Nồng độ oxy hòa tan còn lại sau khi sục Heli với tốc độ 40 ml/s vào 24 lít nước đựng trong thùng dung tích 48 lít và thùng dung tích 24 lít.

Để so sánh hiệu quả đuổi khí khi sục heli vào môi trường đựng trong bình chứa đầy với bình chứa một phần, người ta đổ 6 lít nước vào bình nón dung tích 6 lít và thùng dung tích 48 lít và đo nồng độ oxy hòa tan (Hình 3a).

Hiệu quả đuổi khí ở bình 6 lít tốt hơn thùng 48 lít. Thậm chí sau khi sục khí heli 10 phút, một thể tích nhỏ môi trường hòa tan trong bình chứa lớn không đạt được mức oxy 2,8 mg/l. Tương tự, đo nồng độ oxy của 24 lít nước chứa trong bình dung tích 24 lít và 48 lít (Hình 3b) cho thấy đuổi khí ở bình 48 lít ít hiệu quả với khoảng 24 phút để đạt được mức oxy như USP yêu cầu. Do đó, thời gian sục khí trở được khuyến cáo là tùy thuộc vào tổng thể tích bình chứa chứ không phụ thuộc vào thể tích môi trường đựng trong bình chứa.

3.3. Ảnh hưởng của cỡ lỗ lọc và thể tích môi trường đối với hiệu quả đuổi khí khi sục khí heli

Hệ thống sục khí trở bao gồm khí heli được đưa vào môi trường qua màng lọc bên trong. Cỡ lỗ lọc có thể ảnh hưởng đến tính chất dòng và tốc độ đuổi khí. Tác động của cỡ màng lọc đối với việc đuổi khí được nghiên cứu bằng cách sử dụng màng lọc kích thước lỗ 2 μm và 10 μm . Không có sự khác biệt rõ ràng về tốc độ đuổi khí (Hình 4a) cho thể tích 1 lít dung môi. Chỉ có khác biệt nhỏ khi thử với thể tích lớn (6 lít và 24 lít), và phần lớn phụ thuộc vào thời điểm bắt đầu đuổi khí (Hình 4b,c). Mức độ đuổi khí trong các thể tích môi trường khác nhau là tương đương, do đó cỡ màng lọc không có ảnh hưởng đáng kể đến hiệu suất.

Lọc chân không trở nên ít thực tế hơn khi tiến hành với thể tích môi trường hòa tan lớn. Các thiết bị thường cho phép chuẩn bị một thể tích nhỏ (1 đến 5 lít) để có thể đun và khuấy mạnh trong chân không. Với các thể tích môi trường từ 6 đến 92 lít, sục khí Heli thu được nồng độ oxy thấp hơn so với lọc chân không (khoảng 2,8 mg/l) (Hình 5). Kết quả cho thấy sục khí Heli trong 0,5 phút với tốc độ 40 ml/s cho 1 lít môi trường đạt được nồng độ oxy hòa tan 2,8 mg/l.

3.4. So sánh tốc độ tái hòa tan khí trước và trong quá trình thử độ hòa tan

Đo nồng độ oxy sau khi chuyển môi trường hòa tan vào cốc thử, sau khi để cân bằng đến 37°C và sau khi

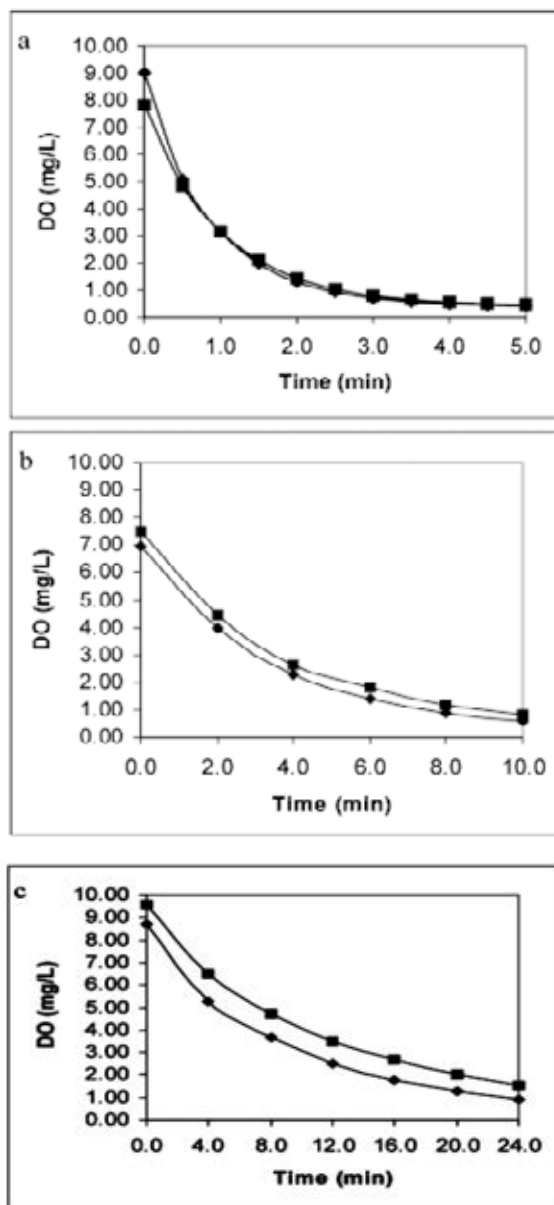


Figure 4: Deaeration by helium sparging with (■) 10 μm and (●) 2 μm pore-size filters and media volumes of a) 1L, b) 6L, and c) 24L.

Hình 4a, 4b, 4c. Nồng độ oxy hòa tan sau khi sục khí Heli qua màng lọc 10 μm và 2 μm vào môi trường hòa tan có thể tích a) 1 lít, b) 6 lít và c) 24 lít

thử độ hòa tan với tốc độ 50 rpm trong 45 phút (Hình 6) để đo tốc độ tái hòa tan. Sau 45 phút thử nghiệm độ hòa tan, nồng độ oxy ở các môi trường đã được lọc chân không thủ công, lọc tự động và sục khí heli là tương đương. Không có môi trường nào trong ba môi trường

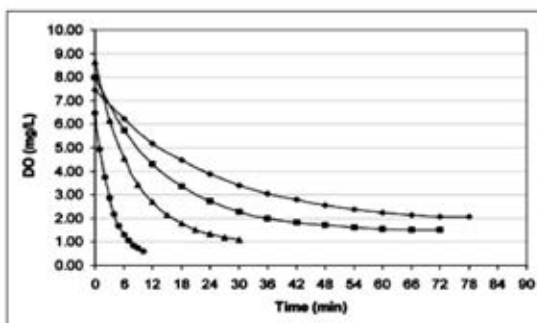


Figure 5: Deaeration by helium sparging at 40 mL/s with media volumes of (●) 6L, (▲) 24L, (■) 48L, and (◆) 92L.

Hình 5. Nồng độ oxy hòa tan khi sục khí Heli với tốc độ dòng 40 ml/s vào các môi trường có thể tích 6 lít; 24 lít; 48 lít và 92 lít.

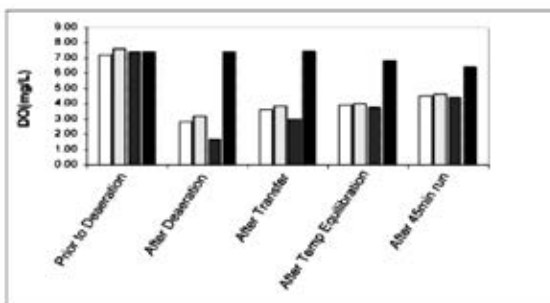


Figure 6: Levels of dissolved oxygen remaining after various stages of a dissolution run using (□) Manual vacuum filtration, (▒) Dissafill automated filtration, (■) Helium sparging, and (●) Non-deaerated media.

Hình 6. Nồng độ oxy hòa tan còn lại qua các giai đoạn thử độ hòa tan sau khi không được đuổi khí hoặc đuổi khí bằng phương pháp lọc chân không; lọc tự động, sục Heli

đã đuổi khí theo ba cách nói trên có nồng độ oxy tái hòa tan cao như nồng độ trước khi đuổi khí và không có môi trường sau đuổi khí nào có hiện tượng tạo bọt khí trong quá trình thử. Trong khi thử nghiệm độ hòa tan với môi trường không đuổi khí, bọt khí xuất hiện ở bề mặt cánh khuấy, trục cánh khuấy, trên viên nang và dụng cụ làm chìm viên nang. Đôi khi, bọt còn tạo ở dưới đáy cốc hòa tan. Trong thử nghiệm được thực hiện với môi trường hòa tan đã đuổi khí, gần như không quan sát thấy có bọt khí.

Mặc dù kỹ thuật sục khí heli có hiệu quả hơn so với các kỹ thuật thủ công hay tự động khác, nồng độ oxy khi kết thúc quá trình hòa tan không phụ thuộc vào kỹ thuật đuổi khí đã sử dụng.

Tái hòa tan khí do chuyển môi trường hòa tan vào cốc thử khác nhau rất nhiều bởi vì quá trình này bao gồm hai bước cho phương pháp đuổi khí thủ công: chuyển vào ống đong sau đó chuyển từ ống đong vào cốc thử độ hòa tan. Hơn nữa, tái hòa tan khí có thể bị ảnh hưởng bởi vài yếu tố như tốc độ rót, cách rót (vào thành cốc hay vào giữa cốc), độ cao khi rót và chênh lệch giữa áp suất riêng phần của oxy trong không khí và trong môi trường đã đuổi khí. Cần lưu ý rằng kỹ thuật lọc chân không tự động cho phép môi trường được cho thẳng vào cốc thử độ hòa tan. Tuy nhiên trong nghiên cứu này, môi trường

lọc bằng thiết bị tự động Dissafill cũng được rót vào ống đong trước khi chuyển vào cốc thử độ hòa tan để so sánh kỹ thuật này với các phương pháp đuổi khí khác yêu cầu có hai bước chuyển dung môi.

Ảnh hưởng của thao tác của thử nghiệm viên đối với nồng độ oxy của môi trường đuổi khí cũng được nghiên cứu. Người ta sục khí heli vào thùng chứa 24 lít nước để thu được nồng độ oxy 2,6 mg/l và đổ nhẹ nhàng vào ống đong. Tuy nhiên, nồng độ oxy tái hòa tan lên tới 4,0 mg/l. Sau đó đổ 1 lít môi trường đó dọc theo thành cốc hòa tan, nồng độ oxy đo lại là 4,2 mg/l. Cũng thực hiện như trên nhưng khuấy mạnh và rót nhanh môi trường vào ống đong, nồng độ oxy tái hòa tan lên tới 4,7 mg/l. Nếu rót môi trường vào giữa cốc hòa tan, khuấy mạnh, cho nồng độ oxy 5,2 mg/l. Như vậy, thao tác của kiểm nghiệm viên rất quan trọng, nên cẩn thận để tránh cho môi trường không bị khuấy động mạnh.

Sau khi đuổi khí bằng cách lọc chân không thủ công 5 lít môi trường, nồng độ oxy sau khi chuyển vào cốc hòa tan là 4,4 mg/l. Sử dụng hệ thống lọc Dosaprep cho nồng độ oxy 3,8 mg/l. Mức nồng độ oxy cuối cùng (4,4- 4,8 mg/l) sau khi cho thiết bị hòa tan hoạt động 30 phút là không phụ thuộc vào thao tác của kiểm nghiệm viên. Nồng độ oxy sau thử nghiệm là 4,6 mg/l, không phụ thuộc vào kỹ thuật đuổi khí, thiết bị, kiểm nghiệm viên.

3.5. Nghiên cứu tốc độ tái hòa tan khí với môi trường không sử dụng

Lần lượt đuổi khí 1 lít nước với các kỹ thuật lọc chân không thủ công, lọc chân không tự động và sục khí heli. Nồng độ oxy ngay sau khi lọc tương ứng là 2,9; 3,4; 0,8 mg/l. Sau 16 giờ, nồng độ oxy tăng thêm tương ứng là 2,3; 2,6; 2,0 mg/l. Rõ ràng với các môi trường để yên, đậy kín, mức oxy tăng với tỉ lệ tương tự và không phụ thuộc vào nồng độ oxy ban đầu (Hình 7a). Với dung môi đuổi khí bằng sục heli có thể tích 6 - 92 lít được đậy kín và để qua đêm, nồng độ oxy đều tăng, mặc dù không bằng giá trị ban đầu. Do đó, nên sử dụng môi trường hòa tan ngay trong ngày sau tiến hành đuổi khí.

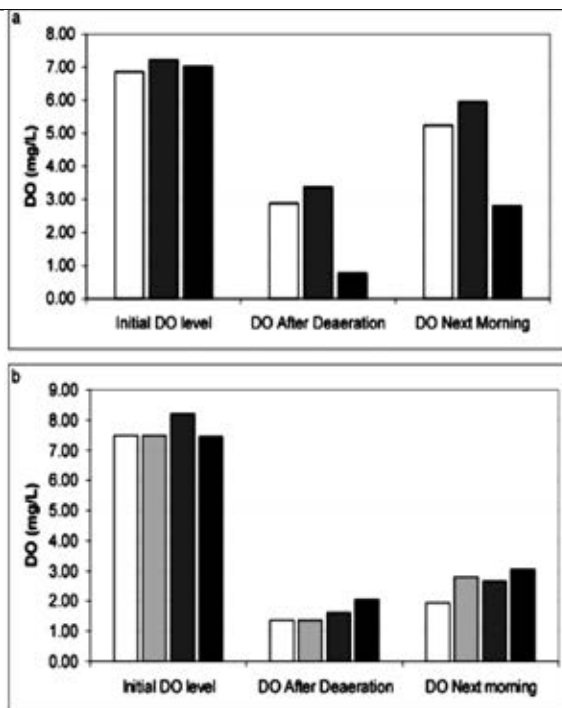


Figure 7a: Rates of re-aeration of 1L sealed, un-agitated media using (□) Manual vacuum filtration, (▨) Dissofill automated filtration, and (■) Helium sparging.

Figure 7b: Rates of re-aeration of un-agitated media at volumes of (□) 6L, (▨) 24L, (▤) 48L, and (■) 92L.

Hình 7a. Tốc độ tái hòa tan oxy của 1 lít dung dịch đậy kín sau khi lọc chân không thủ công; lọc chân không tự động và sục khí Heli

Hình 7b. Tốc độ tái hòa tan oxy của môi trường được để yên với các thể tích 6 lít; 48 lít và 92 lít

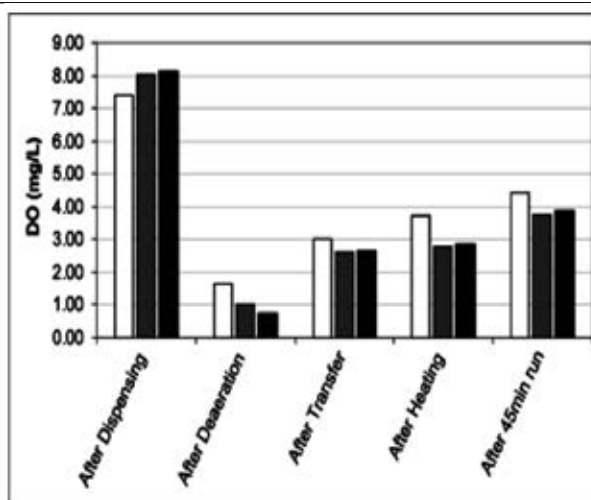


Figure 8: Levels of dissolved oxygen remaining after various stages of a dissolution run using (□) Water, (▨) 0.1N HCl, and (■) Phosphate buffer (pH 6.8).

Hình 8. Nồng độ oxy hòa tan ở các môi trường nước, HCl 0,1 N và đệm phosphat sau các giai đoạn của quá trình thử độ hòa tan

3.6. Ảnh hưởng của pH môi trường đến hiệu quả đuổi khí.

Nghiên cứu cho thấy đuổi khí 6 lít môi trường HCl 0,1 N và đệm phosphat pH 6,8 bằng cách sục heli có hiệu quả hơn so với 6 lít nước. Sau khi chuyển các dung dịch này vào cốc và tiến hành thử độ hòa tan, mức oxy trong cả ba môi trường đều tương tự. Nghiên cứu này khẳng định kết luận sục heli là kỹ thuật tốt để đuổi khí các môi trường có thêm chất phụ gia và pH khác nhau.

4. Kết luận

Phương pháp lọc chân không như mô tả trong chuyên luận chung USP Dissolution <711> thu được nồng độ oxy giảm còn 2,8 mg/l. Thiết bị lọc tự động Dissolfill cho hiệu quả tương tự nhưng tiện lợi hơn khi cần đuổi khí một lượng lớn dung dịch. Sục khí Heli là phương pháp cho hiệu quả tốt nhất với khuyến cáo thời gian sục 0,5 phút, tốc độ 40 ml/s cho bình dung tích 1 lít. Với môi trường có thể tích lớn từ 6 đến 92 lít, nên sử dụng phương pháp sục khí heli.

Dù đuổi khí bằng phương pháp nào cũng tránh được hiện tượng tạo bọt khí trong quá trình thử độ hòa tan. Nồng độ oxy ban đầu trong môi trường không ảnh hưởng đến nồng độ oxy tại thời điểm sau khi tiến hành thử độ hòa tan. Đuổi khí tới nồng độ oxy quá thấp làm tăng tốc độ tái hòa tan trong quá trình chuyển môi trường vào cốc thử và 30 - 45 phút quay cánh khuấy. Điều này được chứng minh ở môi trường HCl 0,1N, đệm phosphat pH 6,8 và nước. Những phòng thí nghiệm khác sử dụng thiết bị và điều kiện tương tự cho các kết quả báo cáo tương tự.

Tài liệu tham khảo

1. Diebold, S.M., Dressman, J.B., "Dissolved Oxygen as a Measure for De- and Reaeration of Aqueous Media for Dissolution Testing." *Dissolution Technologies*, 5 (3, August), 13-16, 1998
2. Griffith, M.F., Curley, T.E., Martin, GP, "Considerations in Choosing a Deaeration Technique for Dissolution Media." *Dissolution Technologies*, 4 (1, February), 16-17, 1997.
3. Hanson, WA, "Handbook of Dissolution Testing." Pharmaceutical Technology Publications, Springfield, Oregon, 1982.
4. Moore, T.W., "Dissolution Testing: A fast, Efficient Procedure for Degassing Dissolution Medium." *Dissolution Technologies*, 3 (2, May), 3-5, 1996.
5. Qureshi, S.A., McGilveray, I.J., "Impact of Different Deaeration Methods on the USP Dissolution Apparatus Suitability Test Criteria." *Pharmaceutical Forum*, 20, 8565-8566, 1994.
6. Rohrs, BR, Steiner, DJ, "Deaeration Techniques for Dissolution Media." *Dissolution Technologies*, 2 (2, Winter), 7-8, 1995.
7. Rolli, R., Fiechter, A., Hengst, R., "In-Situ Deaeration of Dissolution Media Through a Hollow Shaft System." *Dissolution Technologies*, 7 (2, May), 20-22, 2000.
8. Experiments performed at the Lilly Research Laboratories, Lilly Forschung GmbH, Essener Strasse 93, D-22419 Hamburg, Germany.
9. *The United States Pharmacopoeia* 37, 2014.

MỤC LỤC

● Nghiên cứu khoa học	<i>Trang</i>
- Định tính, định lượng đồng phân đối quang Levocetirizin của Cetirizin bằng phương pháp HPLC. <i>LÊ THỊ HƯỜNG HOA, ĐỖ THU TRANG, NGUYỄN ĐĂNG LÂM</i>	<i>1</i>
- Định lượng đồng thời α -ketovalin calci, α -ketoisoleucin calci, α -hydroxymethionin calci, α -ketoleucin calci và α -ketophenylalanin calci trong chế phẩm bằng phương pháp HPLC. <i>NGUYỄN THỊ HOA, MÃ VÂN KIỂU, TRẦN THỊ BÍCH VÂN, ĐOÀN CAO SƠN</i>	<i>5</i>
- Nghiên cứu định lượng Isosorbid 5 mononitrat trong huyết tương người bằng phương pháp LC-MS/MS. <i>TẠ MẠNH HÙNG, LÊ THỊ LA, HOÀNG VĂN ĐỨC, NGÔ ĐỨC LIÊM</i>	<i>11</i>
- Đánh giá khả năng định lượng Sildenafil citrat trong viên nén bằng phương pháp quang phổ cận hồng ngoại. <i>BÙI VĂN TRUNG, TRẦN THỊ BÍCH VÂN, BÙI QUỐC THÁI, TRẦN VIỆT HÙNG, ĐOÀN CAO SƠN</i>	<i>15</i>
- Thăm định phép thử giới hạn nội độc tố vi khuẩn theo phương pháp tạo gel trong chế phẩm thuốc tiêm. <i>TRẦN THỊ THANH HUẾ, NGUYỄN THỊ HỒNG VINH, NGUYỄN THỊ LIÊN, NGUYỄN ĐĂNG LÂM</i>	<i>20</i>
● Thông tin khoa học - Tin tức	
- So sánh các kỹ thuật đuổi khí môi trường thử độ hòa tan. <i>Người lược dịch: LỤC THỊ VÂN, TRẦN THỊ HỒNG ANH</i>	<i>26</i>

CONTENTS

	<i>Page</i>
● Scientific researches	
- Identification and determination of Levocetirizine, enantiomer of Cetirizine by HPLC method. <i>LÊ THỊ HƯỜNG HOA, ĐỖ THU TRANG, NGUYỄN ĐĂNG LÂM</i>	<i>1</i>
- Simultaneous determination of α -Ketovaline calcium, α -Ketoisoleucine calcium, α -Hydroxymethionin calcium, α -Ketoleucine calcium and α -Ketophenylalanine calcium in drug products (preparations) by HPLC method. <i>NGUYỄN THỊ HOA, MÃ VÂN KIỂU, TRẦN THỊ BÍCH VÂN, ĐOÀN CAO SƠN</i>	<i>5</i>
- Study on determination of Isosorbid 5 mononitrate in human plasma by LC-MS/MS method. <i>TẠ MẠNH HÙNG, LÊ THỊ LA, HOÀNG VĂN ĐỨC, NGÔ ĐỨC LIÊM</i>	<i>11</i>
- Assessment the quantifiability of Sildenafil citrate in the tablets by near-infrared spectroscopy method. <i>BÙI VĂN TRUNG, TRẦN THỊ BÍCH VÂN, BÙI QUỐC THÁI, TRẦN VIỆT HÙNG, ĐOÀN CAO SƠN</i>	<i>15</i>
- Validation of bacterial endotoxins limit test by Gel-clot method in injection preparations. <i>TRẦN THỊ THANH HUẾ, NGUYỄN THỊ HỒNG VINH, NGUYỄN THỊ LIÊN, NGUYỄN ĐĂNG LÂM</i>	<i>20</i>
● Technical information – News	
- Comparison of the dissolution medium deaeration techniques (for Dissolution test of drug). <i>Briefly translated by LỤC THỊ VÂN, TRẦN THỊ HỒNG ANH</i>	<i>26</i>