

ĐỊNH LƯỢNG ĐỒNG THỜI MESNA VÀ BENZYL ALCOL TRONG CHẾ PHẨM THUỐC TIÊM BẰNG PHƯƠNG PHÁP HPLC VỚI DETECTOR DAD

ĐÀO NGUYỆT SƯƠNG HUYỀN, NGUYỄN VĂN HÂN
Trường Đại học Dược Hà Nội

LÊ THỊ THIÊN HƯƠNG, TRẦN THÚY HẠNH
Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương

Từ khóa: Định lượng đồng thời, HPLC, Mesna, Benzyl alcol, thuốc tiêm

1. Đặt vấn đề

Mesna (natri 2-sulfanylethanesulfonat) tương tác hóa học với các chất chuyển hóa độc của các thuốc chống ung thư ifosformid hoặc cyclophosphamid có trong nước tiểu (bao gồm cả acrolein), ngăn ngừa hoặc giảm được tỷ lệ và mức độ độc đối với bàng quang (viên bàng quang chảy máu, huyết niệu) do các thuốc này gây ra. Ngoài ra, mesna còn tăng đào thải cystein, chất này có thể phản ứng hóa học với acrolein góp phần vào tác dụng bảo vệ đường niệu của mesna [2],[3]. Thực tế, mesna thường được chỉ định trong phòng ngừa độc tính trên đường niệu do dùng oxazaphosphorin (cyclophosphamid; ifosformid) dưới dạng thuốc tiêm truyền.

Nhóm nghiên cứu của Trường Đại học Dược Hà Nội vừa qua đã nghiên cứu và bào chế ra một sản phẩm thuốc tiêm mesna có sử dụng tá dược kháng khuẩn là benzyl alcol. Theo quy định hiện nay, chế phẩm này muốn đăng ký lưu hành thì tiêu chuẩn chất lượng bắt buộc phải kiểm soát hàm lượng của cả dược chất mesna và chất kháng khuẩn benzyl alcol. Tuy nhiên, trong các dược điển tham chiếu hiện hành [1],[4],[5],[6] chưa có bất kỳ chuyên luận thành phẩm nào của mesna, do đó việc kiểm nghiệm mesna trong các chế phẩm này cũng gặp nhiều khó khăn.

Dược điển Anh (BP) [4] và Dược điển Mỹ (USP) [6] chỉ có chuyên luận nguyên liệu mesna. Phương

pháp định lượng mesna trong các chuyên luận này là phương pháp chuẩn độ thể tích. Trên cơ sở tham khảo chỉ tiêu tạp chất liên quan của chuyên luận nguyên liệu mesna từ các Dược điển Anh, Mỹ [4],[6], chúng tôi đã tiến hành khảo sát để xây dựng một quy trình định lượng đồng thời mesna và benzyl alcol trong các dạng bào chế thuốc tiêm mesna đơn giản và thuận tiện. Để chứng minh tính phù hợp của quy trình phân tích đã xây dựng được, chúng tôi xin công bố kết quả nghiên cứu thẩm định phương pháp định lượng đồng thời mesna và benzyl alcol trong chế phẩm thuốc tiêm bằng phương pháp HPLC với detector DAD đảm bảo chính xác, tin cậy, tiến hành đơn giản và nhanh chóng.

2. Thực nghiệm và kết quả

2.1. Thiết bị, dụng cụ, hóa chất, chất chuẩn và nguyên liệu đối chiếu

2.1.1. Thiết bị, dụng cụ

Đã được hiệu chuẩn theo ISO/IEC 17025.

- Máy sắc ký lỏng hiệu năng cao Shimadzu LC- 20A với detector DAD;
- Cột Lichrospher (250 x 4,6 mm; 10 µm);
- Cân phân tích Mettler Toledo MS 105 độ chính xác 0,01 mg;
- Bộ lọc dùng cho sắc ký với màng lọc 0,45 µm;
- Các dụng cụ thủy tinh chính xác loại A.

2.1.2. Chất chuẩn

Tên chất chuẩn	Nguồn gốc	Số lô	Hàm lượng tính theo nguyên trạng
- Mesna	USP	F0H331	99,0%
- Benzyl alcol	USP	R01940	100,0%
- Chuẩn tạp chất C của mesna	Eur.Ph	Batch 1	100,0%
- Chuẩn tạp chất D của mesna	Eur.Ph	Batch 1	100,0%

2.1.3. Nguyên liệu đối chiếu:

Mesna (đã được kiểm tra đầy đủ và đạt yêu cầu chất lượng theo BP. 2016). Hàm lượng 98,8% tính theo nguyên trạng.

2.1.4. Hóa chất thuốc thử

- Tetra butylamoni hydro sulfat HPLC (Merck);
- Kali dihydrophosphat PA (Scharlau);
- Dikali hydrophosphat PA (Scharlau);

- Acid phosphoric PA (Scharlau);
- Methanol HPLC (Merck).

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

2.2.1. Đối tượng nghiên cứu

2.2.1.1. Mẫu thử

Thuốc tiêm mesna có công thức bào chế như sau: Mesna (100 mg); natri edetat (0,25 mg); benzyl alcol (10,4 mg); natri hydroxyd để điều chỉnh pH đến 6,5 - 8,0; nước cất pha tiêm vừa đủ 1,0 ml.

2.2.1.2. Mẫu placebo

- Mẫu placebo (không chứa benzyl alcol và mesna): Natri edetat (0,25 mg); natri hydroxyd để điều chỉnh pH đến 6,5 - 8,0; nước cất pha tiêm vừa đủ 1,0 ml.

- Mẫu Placebo của mesna (chứa benzyl alcol không chứa mesna): Natri edetat (0,25 mg); benzyl alcol (10,4 mg); natri hydroxyd để điều chỉnh pH đến 6,5 - 8,0; nước cất pha tiêm vừa đủ 1,0 ml.

- Mẫu Placebo của benzyl alcol (chứa mesna không chứa benzyl alcol): Mesna (100 mg); natri edetat (0,25 mg); natri hydroxyd để điều chỉnh pH đến 6,5 - 8,0; nước cất pha tiêm vừa đủ 1,0 ml.

2.2.2. Nội dung

- Xây dựng và thẩm định quy trình định lượng đồng thời mesna và benzyl alcol bằng phương pháp HPLC.

- Ứng dụng để định lượng mesna và chất sát khuẩn benzyl alcol trong thuốc tiêm do nhóm nghiên cứu của Trường Đại học Dược bào chế.

2.2.3. Phương pháp nghiên cứu

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

- Xây dựng quy trình xử lý mẫu dựa trên đặc tính của các chất phân tích và tính chất của dạng bào chế.

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

3. Kết quả và bàn luận

3.1. Xây dựng quy trình phân tích định lượng đồng thời mesna và benzyl alcol bằng HPLC

Sau khi khảo sát về thành phần, tỷ lệ pha động, cột sắc ký, bước sóng phát hiện, tốc độ dòng, nồng độ mẫu thử, thể tích tiêm, nhóm nghiên cứu đã tối ưu hóa được quy trình phân tích như sau:

3.1.1. Điều kiện HPLC

- Pha động: Hòa tan 2,94 g kali dihydro phosphat; 2,94 g dikali hydro phosphat và 2,6 g tetrabutylamoni hydro sulfat trong khoảng 600 ml nước. Điều chỉnh đến pH 2,3 bằng acid phosphoric, thêm 335 ml methanol và pha loãng thành 1000 ml với nước.

- Cột: Lichrospher C18 (250 x 4,6 mm; 10 µm)

- Detector: 215 nm
- Tốc độ dòng: 1,0 ml/phút
- Thể tích tiêm: 20 µl.

3.1.2. Phương pháp xử lý mẫu

- *Dung dịch kiểm tra tính thích hợp của hệ thống sắc ký:* Dung dịch có chứa 0,18 mg/ml chất chuẩn mesna và 0,004 mg/ml, chất chuẩn tạp chất C của mesna trong pha động. Lọc qua màng lọc 0,45 µm.

- *Dung dịch gốc chuẩn benzyl alcol:* Cân chính xác khoảng 26,0 mg benzyl alcol vào bình định mức dung tích 100 ml, hòa tan và pha loãng trong pha động vừa đủ thể tích.

- *Dung dịch chuẩn mesna và benzyl alcol:* Cân chính xác khoảng 25 mg chất chuẩn mesna vào bình định mức dung tích 50 ml, hút chính xác 10,0 ml dung dịch chuẩn gốc benzyl alcol vào bình định mức trên, hòa tan và pha loãng trong pha động vừa đủ thể tích. Lắc đều, lọc qua màng lọc 0,45 µm.

- *Dung dịch thử:* Hút chính xác 1,0 ml thuốc tiêm mesna pha loãng với pha động thành 200 ml. Lắc đều, lọc qua màng lọc 0,45 µm.

3.1.3. Cách tiến hành

Kiểm tra khả năng thích hợp của hệ thống sắc ký: Tiêm dung dịch kiểm tra tính thích hợp của hệ thống sắc ký, độ phân giải giữa pic mesna và tạp chất C của mesna không được nhỏ hơn 3,0. Tiêm 6 lần dung dịch chuẩn, độ lệch chuẩn tương đối của diện tích pic mesna và benzyl alcol không lớn hơn 2,0%. Tiêm dung dịch thử.

3.1.4. Tính kết quả

Tính hàm lượng mesna ($C_2H_5NaO_3S$) hoặc benzyl alcol (C_7H_8O) trong chế phẩm dựa vào lượng cân chất chuẩn, hàm lượng mesna ($C_2H_5NaO_3S$) hoặc benzyl alcol (C_7H_8O) của chất chuẩn, diện tích pic mesna hoặc benzyl alcol của dung dịch chuẩn và dung dịch thử, hệ số pha loãng của dung dịch chuẩn và dung dịch thử.

3.2. Thẩm định phương pháp

3.2.1. Tính đặc hiệu

- *Dung dịch mẫu placebo:* Hút chính xác 1,0 ml mẫu placebo pha loãng với pha động thành 200 ml. Lắc đều, lọc qua màng lọc 0,45 µm.

- *Dung dịch mẫu placebo của mesna:* Hút chính xác 1,0 ml mẫu placebo của mesna pha loãng với pha động thành 200 ml. Lắc đều, lọc qua màng lọc 0,45 µm.

- *Dung dịch mẫu placebo của benzyl alcol:* Hút chính xác 1,0 ml mẫu placebo của benzyl alcol pha loãng với pha động thành 200 ml. Lắc đều, lọc qua màng lọc 0,45 µm.

- *Dung dịch chuẩn gốc benzyl alcol:* Cân chính xác 26,05 mg benzyl alcol vào bình định mức dung tích

100 ml hòa tan và pha loãng với pha động vừa đủ thể tích.

- *Dung dịch chuẩn*: Cân chính xác 25,01 mg chất chuẩn mesna vào bình định mức dung tích 50 ml, hút chính xác 10,0 ml dung dịch chuẩn gốc benzyl alcol vào bình định mức trên, hòa tan và pha loãng trong pha động vừa đủ thể tích. Lắc đều, lọc qua màng lọc 0,45 μm .

- *Dung dịch thử*: Hút chính xác 1,0 ml thuốc tiêm pha loãng với pha động thành 200 ml. Lắc đều, lọc qua màng lọc 0,45 μm .

- *Dung dịch chuẩn tạp chất D của mesna*: Hòa tan 4,15 mg chất chuẩn tạp chất D của mesna trong pha động và pha loãng thành 25,0 ml bằng pha động.

Tiêm các dung dịch placebo, dung dịch chuẩn, dung dịch thử vào hệ thống sắc ký. Kết quả cho thấy:

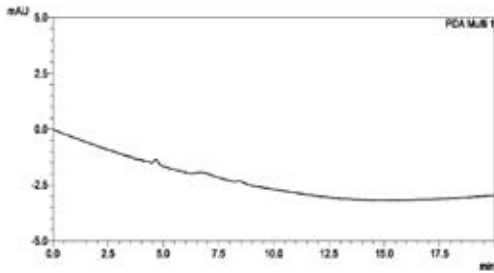
+ Pic Mesna và pic benzyl alcol cân đối, tách xa nhau, thời gian phân tích hợp lý (thời gian chạy sắc ký khoảng 20 phút).

+ Thời gian lưu của pic mesna và benzyl alcol trên sắc ký đồ của dung dịch chuẩn (*Hình 2*) và dung dịch thử (*Hình 5*) giống nhau lần lượt là 5,1 phút và 8,3 phút.

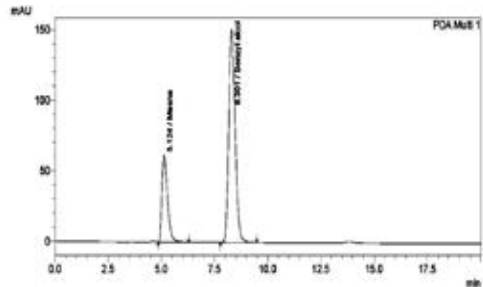
Độ tinh khiết của pic mesna và benzyl alcol trong sắc ký đồ của dung dịch chuẩn và thử lần lượt bằng 1,0000 và 0,9999 (đều khoảng 100%). Phổ UV của pic mesna và benzyl alcol trên sắc ký đồ của dung dịch thử và dung dịch chuẩn giống nhau.

+ Sắc ký đồ của dung dịch mẫu placebo (*Hình 1*) không xuất hiện pic ở trong khoảng thời gian lưu tương ứng với thời gian lưu của pic mesna và benzyl alcol. Sắc ký đồ dung dịch mẫu placebo của mesna (*Hình 3*) không xuất hiện pic ở trong khoảng thời gian lưu tương ứng với thời gian lưu của pic mesna. Sắc ký đồ dung dịch mẫu placebo của benzyl alcol (*Hình 4*) không xuất hiện pic ở trong khoảng thời gian lưu tương ứng với thời gian lưu của pic benzyl alcol nên nền mẫu không ảnh hưởng tới phép thử.

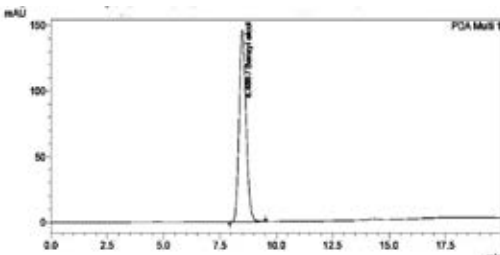
+ Pic tạp chất D của mesna có thời gian lưu ở khoảng 14,3 phút. Dung dịch mẫu thử có xuất hiện pic tạp chất D của mesna và tách hoàn toàn khỏi pic benzyl alcol. Độ phân giải giữa pic benzyl alcol và tạp chất D của mesna $> 2,0$.



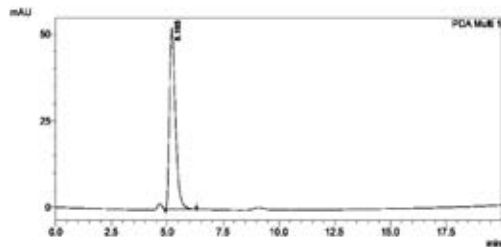
Hình 1. Sắc ký đồ của mẫu placebo



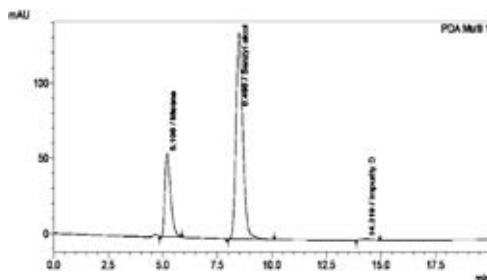
Hình 2. Sắc ký đồ định lượng mesna và benzyl alcol của dung dịch chuẩn



Hình 3. Sắc ký đồ của mẫu placebo của mesna



Hình 4. Sắc ký đồ của mẫu placebo của benzyl alcol



Hình 5. Sắc ký đồ định lượng mesna và benzyl alcol của dung dịch thử

3.2.2. Tính thích hợp của hệ thống sắc ký

- *Dung dịch chuẩn gốc tạp chất C của mesna:* Hòa tan 4,36 mg chất chuẩn tạp chất C của mesna trong pha động và thêm pha động vừa đủ 50,0 ml. Hút chính xác 2,0 ml dung dịch này và pha loãng thành 20,0 ml.

- *Dung dịch chuẩn gốc Mesna:* Hòa tan 18,01 mg chất chuẩn mesna trong pha động và thêm pha động vừa đủ 50,0 ml.

- *Dung dịch đánh giá tính thích hợp của hệ thống:*

Hỗn hợp hút chính xác của 10,0 ml dung dịch chuẩn gốc tạp chất C của mesna và 10,0 ml dung dịch chuẩn gốc mesna, lắc đều.

+ Tiêm dung dịch kiểm tra tính thích hợp của hệ thống sắc ký, độ phân giải giữa pic mesna và tạp chất C của mesna = 3,0.

+ Tiêm lặp lại 6 lần dung dịch chuẩn ở mục 3.2.1. Ghi lại các giá trị về thời gian lưu, diện tích pic, số đĩa lý thuyết và hệ số đối xứng của pic. Kết quả khảo sát tính thích hợp của hệ thống sắc ký thể hiện ở *Bảng 1*.

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

Stt	Thời gian lưu của pic mesna (phút)	Diện tích pic mesna (mAU.s)	Thời gian lưu của pic benzyl alcol (phút)	Diện tích pic benzyl alcol (mAU.s)
1	5,124	717469	8,301	2638732
2	5,117	724619	8,332	2651025
3	5,113	731522	8,321	2638044
4	5,122	734038	8,335	2623673
5	5,131	731161	8,331	2584116
6	5,114	736327	8,376	2643057
Trung bình	5,120	729189	8,333	2629775
RSD (%)	0,13 < 1,0	0,95 < 2,0	0,30 < 1,0	0,91 < 2,0

Số đĩa lý thuyết tính trên mỗi pic mesna và benzyl alcol đều > 1000; Hệ số đối xứng pic: 1,0 - 1,3.

Nhận xét: Các số liệu thu được cho thấy hệ thống sắc ký trên đạt yêu cầu theo quy trình đã xây dựng và phù hợp cho việc phân tích định tính và định lượng mesna và benzyl alcol.

3.2.3. Độ tuyến tính

- *Chuẩn bị các dung dịch chuẩn:*

+ *Dung dịch chuẩn gốc benzyl alcol:* Cân chính xác 52,10 mg benzyl alcol vào bình định mức dung tích 100 ml, hòa tan và pha loãng trong pha động vừa đủ đến vạch.

+ *Dung dịch chuẩn gốc mesna và benzyl alcol:* Cân chính xác 50,08 mg chất chuẩn mesna vào bình định mức dung tích 50 ml, hút chính xác 10,0 ml dung dịch chuẩn gốc benzyl alcol vào bình định mức trên, hòa tan và pha loãng trong pha động vừa đủ thể tích, lắc đều.

Hút chính xác 4,0 ml; 8,0 ml; 10,0 ml; 12,0 ml; 16,0 ml dung dịch chuẩn gốc mesna và benzyl alcol (tương ứng 40%, 80%, 100%, 120% và 160% của nồng độ định lượng) vào các bình định mức riêng biệt dung tích 20 ml, thêm pha động vừa đủ đến vạch. Lắc đều, lọc qua màng lọc 0,45 µm và tiến hành tiêm vào hệ thống sắc ký. Kết quả được ghi lại trong *Bảng 2*.

Bảng 2. Kết quả khảo sát khoảng tuyến tính

STT	Nồng độ định lượng	Mesna		Benzylalcol	
		Nồng độ mesna (C ₂ H ₅ N ₄ O ₃ S ₂) (µg/ml)	Diện tích pic (mAU.s)	Nồng độ benzyl alcol (C ₇ H ₈ O) (µg/ml)	Diện tích pic (mAU.s)
1	40%	200,32	292024	20,86	1025291
2	80%	400,64	584055	41,72	2105875
3	100%	500,80	730066	52,15	2632316
4	120%	600,96	876071	62,58	3158913
5	160%	801,28	1168112	83,44	4211752
Phương trình hồi qui		y = 145,7 x - 100; r = 0,9999		y = 50874,5 x - 2627,9; r = 0,9999	

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

3.2.4. Độ đúng

- *Dung dịch chuẩn gốc benzyl alcol:* Cân chính xác khoảng 13,0 mg; 26,0 mg và 39,0 mg benzyl alcol (tương ứng với mẫu tự tạo chứa 50%, 100% hoặc 150% lượng benzyl alcol so với hàm lượng ghi trên nhãn) vào các bình định mức dung tích 25 ml riêng rẽ hòa tan và pha loãng trong pha động thành 25,0 ml.

- *Dung dịch chuẩn mesna và benzyl alcol:* Cân chính xác khoảng 50 mg; 100 mg và 150 mg nguyên liệu chuẩn mesna (tương ứng với mẫu tự tạo chứa 50%, 100% hoặc 150% lượng mesna) vào các bình định mức dung tích 200 ml riêng rẽ, hút chính xác 1,0 ml *dung dịch placebo* và 10,0 ml *dung dịch chuẩn gốc benzyl alcol* ở trên (tương ứng với mẫu tự tạo chứa 50%, 100% hoặc 150% lượng benzyl alcol so với hàm lượng ghi trên nhãn) vào bình định mức trên, hòa tan và pha loãng trong pha động thành 200 ml, lắc đều và lọc qua màng lọc 0,45 µm. Mỗi mức nồng độ làm 03 mẫu.

- Sử dụng dung dịch chuẩn ở phần 3.2.2 để tính tỷ lệ thu hồi của các mẫu.

Bảng 3. Kết quả khảo sát độ đúng của phương pháp (đối với mesna)

STT	Lượng thêm vào so với nhãn	Thể tích mẫu placebo (ml)	Lượng mesna thêm vào mẫu (mg)	Diện tích pic mesna (mAU.s)	Lượng mesna tìm lại (mg)	% Thu hồi	% Thu hồi trung bình
1	50%	1,0	49,42	362271	49,20	99,55	99,38% RSD = 0,36%
3	50%	1,0	49,52	362269	49,20	99,35	
4	100%	1,0	99,07	727616	98,83	99,76	99,73% RSD = 0,11%
5	100%	1,0	98,92	726984	98,74	99,82	
6	100%	1,0	99,01	726101	98,62	99,61	
7	150%	1,0	148,32	1085952	147,50	99,45	99,50% RSD = 0,06%
8	150%	1,0	148,36	1086781	147,61	99,49	
9	150%	1,0	148,52	1088639	147,86	99,56	
% Thu hồi trung bình = 99,54%; RSD = 0,19%							

Bảng 4. Kết quả khảo sát độ đúng của phương pháp (đối với benzyl alcol)

Stt	Lượng thêm vào so với nhãn	Thể tích mẫu placebo (ml)	Lượng benzyl alcol thêm vào mẫu (mg)	Diện tích pic benzyl alcol (mAU.s)	Lượng benzyl alcol tìm lại (mg)	% Thu hồi	% Thu hồi trung bình
1	50%	1,0	5,208	1312222	5,199	99,83	99,68% RSD = 0,23%
2	50%	1,0	5,216	1313582	5,205	99,79	
3	50%	1,0	5,240	1314526	5,209	99,41	
4	100%	1,0	10,408	2623485	10,395	99,88	99,81% RSD = 0,21%
5	100%	1,0	10,444	2624517	10,399	99,57	
6	100%	1,0	10,404	2625248	10,402	99,98	
7	150%	1,0	15,632	3935285	15,593	99,75	99,92% RSD = 0,23%
8	150%	1,0	15,620	3934966	15,592	99,82	
9	150%	1,0	15,604	3945197	15,632	100,18	
% Thu hồi trung bình = 99,80%; RSD = 0,22%							

Nhận xét: Kết quả trên cho thấy phương pháp có độ đúng tốt (lượng thu hồi mesna: 99,35% - 99,82%; benzyl alcol: 99,41% - 100,18%).

3.2.5. Độ chính xác

3.2.5.1. Độ lặp lại

Khảo sát trên chế phẩm thuốc tiêm do nhóm nghiên cứu Trường Đại học Dược Hà Nội với các điều kiện sắc ký và cách xử lý mẫu như ở mục 3.1, lặp lại thí nghiệm 6 lần. Kết quả được trình bày trong *Bảng 5*.

Kết quả ở *Bảng 5* cho thấy phương pháp có độ lặp lại tốt có thể áp dụng để định lượng các mẫu thành phẩm mesna có chứa hoặc không chứa benzyl alcol.

3.2.5.2. Độ chính xác trung gian

Kiểm nghiệm viên 1: Lấy kết quả ở mục 3.2.5.1 Độ lặp lại. Kiểm nghiệm viên 2 tiến hành thực nghiệm Độ lặp lại như Kiểm nghiệm viên 1, nhưng khác ngày, kết quả được trình bày trong *Bảng 5*.

Bảng 5. Kết quả khảo sát độ lặp lại và độ chính xác trung gian

STT	Kiểm nghiệm viên 1 (Độ lặp lại)				Kiểm nghiệm viên 2			
	Mesna		Benzyl alcol		Mesna		Benzyl alcol	
	$M_{\text{Chuẩn}} = 25,01 \text{ mg}$ $S_{\text{Chuẩn}} = 729189 \text{ mAU.s}$		$M_{\text{Chuẩn}} = 26,05 \text{ mg}$ $S_{\text{Chuẩn}} = 2629775 \text{ mAU.s}$		$M_{\text{Chuẩn}} = 25,05 \text{ mg}$ $S_{\text{Chuẩn}} = 731049 \text{ mAU.s}$		$M_{\text{Chuẩn}} = 26,12 \text{ mg}$ $S_{\text{Chuẩn}} = 2643951 \text{ mAU.s}$	
	Diện tích pic	% Hàm lượng	Diện tích pic	% Hàm lượng	Diện tích pic	% Hàm lượng	Diện tích pic	% Hàm lượng
1	775915	105,39	2790888	106,33	773672	105,08	2783238	105,75
2	772533	104,93	2799012	106,64	770939	104,71	2790002	106,01
3	777864	105,65	2739352	104,37	771265	104,75	2785326	105,83
4	772595	104,94	2798255	106,61	769325	104,49	2793219	106,13
5	763637	103,72	2764771	105,34	772361	104,90	2779092	105,60
6	766940	104,17	2781969	105,99	770326	104,63	2783201	105,75
TB	104,80%; n = 6; RSD = 0,70%		105,88%; n = 6; RSD = 0,83%		104,76%; n = 6; RSD = 0,20%		105,85%; n = 6; RSD = 0,18%	
Mesna				Benzyl alcol				
Hàm lượng Mesna trung bình = 104,78%; n = 12; RSD = 0,49% < 2,0%				Hàm lượng Benzyl alcol trung bình = 105,86%; n = 12; RSD = 0,53% < 2,0%				
Độ chính xác trung gian đạt yêu cầu								

(Ghi chú: $M_{\text{Chuẩn}}$ là lượng cân chuẩn; $S_{\text{chuẩn}}$ là diện tích pic trung bình của dung dịch chuẩn)

4. Kết luận

Phương pháp sắc ký lỏng pha đảo (DAD), sử dụng cột Lichrospher C18 (250 x 4,6 mm; 10 μm) đã được xây dựng để định lượng đồng thời mesna và benzyl alcol trong chế phẩm thuốc tiêm mesna có chứa benzyl alcol. Pha động được chuẩn bị bằng cách hòa tan 2,94 g kali dihydro phosphat; 2,94 g dikali hydro phosphat và 2,6 g tetrabutylamoni hydro sulfat trong khoảng 600 ml nước, điều chỉnh đến pH 2,3 bằng acid phosphoric, thêm 335 ml methanol và pha loãng thành 1000 ml với nước; tốc độ dòng 1,0 ml/phút; thể tích tiêm 20 μl ; detector DAD ở 215 nm. Phương pháp được thẩm định về tính đặc hiệu, độ thích hợp của hệ thống, độ tuyến tính, độ đúng, 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 mesna và benzyl alcol trong thuốc tiêm chứa mesna cũng như thuốc tiêm mesna có chứa benzyl alcol.

Tài liệu tham khảo

1. Bộ Y tế (2017), *Dược điển Việt Nam*, Lần xuất bản thứ năm, NXB Y học, Hà Nội.
2. Bộ Y tế (2015), *Dược thư Quốc gia Việt Nam*, Lần xuất bản thứ hai, NXB Khoa học và Kỹ thuật, Hà Nội.
3. Cutler M. J. (2010), "Pharmacokinetics and therapeutic uses of mesna", *Electronic thesis and dissertation repository*, University of Western Ontario.
4. *British Pharmacopoeia* 2016.
5. *The Japanese Pharmacopoeia JP XVII* (2016).

6. *United States Pharmacopoeia 39*, (2016).
7. Sandie Lindsay (1994), *High Performance Liquid Chromatography*, 2nd edition.
8. *Validation of analytical procedure text and Methodology* - ICH Q2 (R1).

SUMMARY

A reversed-phase high-performance liquid chromatography method was developed for simultaneous assay of Mesna and Benzyl alcohol in injections. The method was carried by using Lichrospher C18 (250 x 4.6 mm; 10 μ m) column and dissolve 2.94 g of Potassium dihydrogen phosphate, 2.94 g of Dipotassium hydrogen phosphate and 2.6 g of Tetrabutylammonium hydrogen sulfate in about 600 ml of water; adjust to pH 2.3 with Phosphoric acid, add 335 ml of methanol and dilute to 1000 ml with water as mobile phase. The flow rate of mobile phase is maintained at 1.0 ml per minute, injection volume: 20 μ l, analyte was detected by a DAD detector at 215 nm. The method was validated in specificity, linear range; accuracy, precision. Validation results proved that the developed method was suitable for simultaneous assay of Mesna and Benzyl alcohol in injections containing Mesna and Benzyl alcohol.

(Ngày nhận bài: 30/11/2016 ; Ngày phản biện: 18/5/2017 ; Ngày duyệt đăng: 26/12/2017)

ĐỊNH LƯỢNG ĐỒNG THỜI KALI SORBAT, METHYLPARABEN VÀ PROPYLPARABEN TRONG DUNG DỊCH UỐNG IFSAN BẰNG PHƯƠNG PHÁP SẮC KÝ LỎNG HIỆU NĂNG CAO

LÊ THỊ QUỲNH ANGA, TRẦN THỊ HỒNG ANH
Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương

Từ khóa: Định lượng đồng thời, kali sorbat, methylparaben, propylparaben, HPLC

1. Đặt vấn đề

Kali sorbat, methylparaben và propylparaben là những chất bảo quản thường có trong thành phần dung dịch thuốc uống, siro. Tuy nhiên trong các Dược điển Mỹ 40, Anh 2016 chỉ có phương pháp kiểm tra từng thành phần riêng rẽ [4],[5]. Trong tiêu chuẩn của các nhà sản xuất phải sử dụng hai hệ sắc ký để định lượng ba thành phần trên. Vì vậy để đáp ứng nhu cầu kiểm soát chất lượng và góp phần nâng cao khả năng kiểm tra chất lượng thuốc, trong phạm vi bài viết này chúng tôi xin giới thiệu phương pháp định lượng đồng thời kali sorbat, methylparaben và propylparaben trong dung dịch uống Ifsan bằng phương pháp HPLC.

2. Thực nghiệm

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

2.1.1. Thiết bị, dụng cụ

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

- Máy sắc ký lỏng hiệu năng cao Shimadzu LC 20A với detector diod array;
- Cột phân tích: Lichrocart C18 (250 x 4 mm; 5 μ m);
- Cân phân tích: Mettler Toledo AG245 độ chính xác 0,01 mg;

- Máy lắc siêu âm;
- Bộ lọc dùng cho sắc ký;
- Các dụng cụ thủy tinh: Bình định mức, pipet chính xác, ống đong...

2.1.2. Hóa chất, chất chuẩn

- Acid acetic (Merck, loại PA);
- Acetonitril loại dùng cho HPLC (Merck);
- Chất chuẩn methylparaben:
Nguồn gốc: Chuẩn Dược điển Việt Nam;
Lô SX: 0213108.02; Hàm lượng: 99,74% (nguyên trạng)
- Chất chuẩn propylparaben:
Nguồn gốc: Chuẩn Dược điển Việt Nam;
Lô SX: 0102138; Hàm lượng: 99,73% (khan); Độ ẩm: 0,04%
- Chất chuẩn Kali sorbat:
Nguồn gốc: Chuẩn Dược điển Mỹ;
Lô SX: R030B0; Hàm lượng: 99,8% (nguyên trạng)
- Nước cất dùng cho HPLC.

2.2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Đối tượng nghiên cứu

Dung dịch uống Ifsan, lô sản xuất NC01, ngày sản xuất 10/7/2017 có công thức bào chế:

STT	Thành phần	1 ống 10 ml		
		Bảng chữ	Bảng số	Đơn vị
1	Citicolin natri	Một nghìn không trăm bốn mươi lăm miligam	1045	mg
2	Propylen glycol	Bốn trăm năm mươi miligam	450	mg
3	Methylparaben	Hai phẩy tám miligam	2,8	mg
4	Propylparaben	Mười một miligam	11	mg
5	Aspartam	Năm miligam	5	mg
6	Kali sorbat	Mười miligam	10	mg
7	Ponceau 4R	Một phẩy tám miligam	1,8	mg
8	Ethanol tuyệt đối	Không phẩy không hai mililit	0,02	ml
9	Acid hydrocloric 1N (vđ pH = 6)	Không phẩy không không mười lăm mililit	0,0015	ml
10	Nước tinh khiết (vđ)	Mười mililit	10	ml

Mẫu placebo: Là lô mẫu giả được Ifsan được chuẩn bị như một lô mẫu thử nhưng không có thành phần kali sorbat, methylparaben và propylparaben.

2.2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.2.1. Điều kiện sắc ký [1],[4],[5]

- Cột Gemini C18 (4,6 x 250 mm; 5 μ m) hoặc cột tương đương.

- Detector UV: 254 nm

- Thể tích tiêm mẫu: 20 μ l

- Tốc độ dòng: 1,0 ml/phút

- Dung dịch A: Hỗn hợp nước - acid acetic băng (100:1)

- Pha động: Dung dịch A - Acetonitril (65:35)

2.2.2.2. Phương pháp chuẩn bị mẫu [1],[4],[5]

- *Dung dịch chuẩn kali sorbat gốc*: Cân chính xác khoảng 28 mg chất chuẩn kali sorbat vào bình định mức 100 ml, thêm khoảng 70 ml pha động, lắc siêu âm để hòa tan, thêm pha động vừa đủ đến vạch.

- *Dung dịch chuẩn methylparaben gốc*: Cân chính xác khoảng 55 mg chất chuẩn methylparaben vào bình định mức 50 ml, thêm khoảng 30 ml pha động, lắc siêu âm để hòa tan, thêm pha động vừa đủ đến vạch.

- *Dung dịch chuẩn propylparaben gốc*: Cân chính xác khoảng 28 mg chất chuẩn propylparaben vào bình định mức 100 ml, thêm khoảng 70 ml pha động, lắc siêu âm để hòa tan, thêm pha động vừa đủ đến vạch.

- *Dung dịch chuẩn đơn*: Từ 3 dung dịch chuẩn gốc trên, pha loãng mỗi chuẩn 25 lần với pha động thu được 3 dung dịch chuẩn đơn kali sorbat, methylparaben và propylparaben.

- *Dung dịch chuẩn hỗn hợp*: Hút chính xác 2,0 ml dung dịch chuẩn kali sorbat gốc; 2,0 ml dung dịch chuẩn methylparaben gốc và 2,0 ml dung dịch chuẩn propylparaben gốc vào bình định mức 50 ml thêm pha động vừa đủ đến vạch, lắc đều.

- *Dung dịch thử*: Hút chính xác 2,0 ml chế phẩm vào bình định mức 50 ml thêm pha động vừa đủ, lắc đều.

Tiến hành: Tiêm lần lượt các dung dịch chuẩn đơn, chuẩn hỗn hợp và dung dịch thử. Xác định thứ tự rửa giải của các pic kali sorbat, methylparaben và propylparaben trên sắc ký đồ.

Kiểm tra độ thích hợp của hệ thống sắc ký:

Tiến hành sắc ký với dung dịch chuẩn hỗn hợp.

Yêu cầu: Số đĩa lý thuyết (N) của các pic kali sorbat, methylparaben, propylparaben phải lớn hơn 5000; hệ số đối xứng (T) của các pic kali sorbat, methylparaben, propylparaben không quá 2,0; độ lệch chuẩn tương đối (% RSD) của diện tích pic kali sorbat, methylparaben, propylparaben trong 6 lần tiêm lặp lại dung dịch chuẩn hỗn hợp không được lớn hơn 2,0%; Hệ số phân giải (R_S) giữa pic kali sorbat và pic methylparaben không được nhỏ hơn 2,0; Hệ số phân giải (R_S) giữa pic methylparaben và pic propylparaben không được nhỏ hơn 2,0.

Tính hàm lượng kali sorbat, methylparaben và propylparaben trong chế phẩm dựa vào diện tích pic của kali sorbat, methylparaben và propylparaben thu được và hàm lượng của chuẩn methylparaben, propylparaben và kali sorbat.

2.2.2.3. Thẩm định phương pháp [2],[3]

Thẩm định phương pháp phân tích với các chỉ tiêu: tính đặc hiệu, tính thích hợp của hệ thống sắc ký, khoảng nồng độ tuyến tính, khoảng xác định, độ đúng, độ chính xác.

2.2.2.4. Đánh giá kết quả

- *Định tính*: Dựa vào hai tiêu chí:

+ Thời gian lưu: So sánh thời gian lưu của pic thu được từ dung dịch thử và pic thu được từ dung dịch chuẩn kali sorbat, methylparaben và propylparaben.

+ Phổ UV-VIS: Trùng phổ UV-VIS của pic trên sắc ký đồ thu được từ dung dịch thử và dung dịch chuẩn: 2 phổ phải

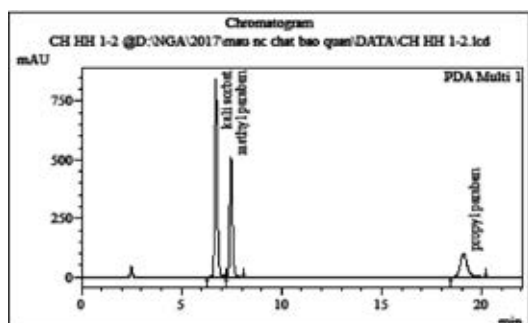
tương ứng với nhau (đánh giá bằng hệ số trùng phổ match).

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

3. Kết quả và bàn luận

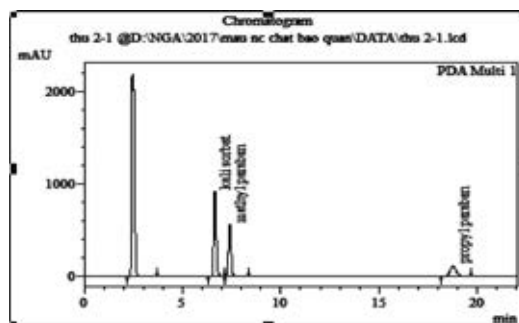
3.1. Lựa chọn điều kiện sắc ký

Sau khi thay đổi các điều kiện sắc ký khác nhau như



Hình 1. Sắc ký đồ của dung dịch chuẩn hỗn hợp

thay đổi cột, thay đổi pha động, tốc độ dòng,... chúng tôi đã lựa chọn được điều kiện sắc ký như đã nêu ở phần 2.2.2.1, sắc ký đồ thu được của dung dịch chuẩn hỗn hợp và dung dịch thử thể hiện ở Hình 1 và Hình 2. Trên sắc ký đồ chúng tôi thấy 3 pic lần lượt là kali sorbat, methylparaben và propylparaben tách rõ ràng, pic đối xứng và gọn. Như vậy việc lựa chọn các điều kiện sắc ký là phù hợp.

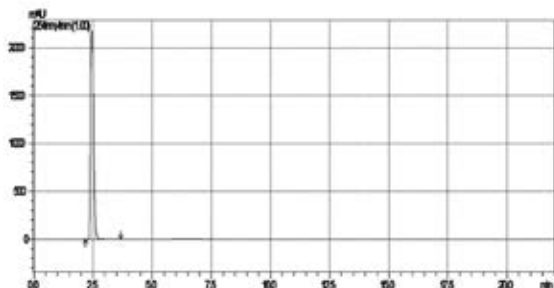


Hình 2. Sắc ký đồ của dung dịch thử

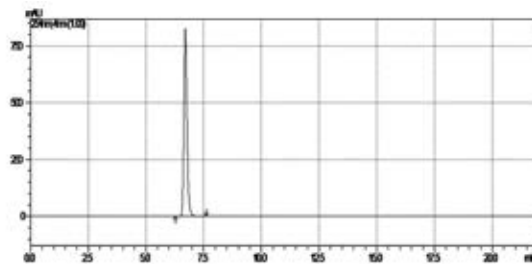
3.2. Đánh giá phương pháp

3.2.1. Khảo sát tính đặc hiệu

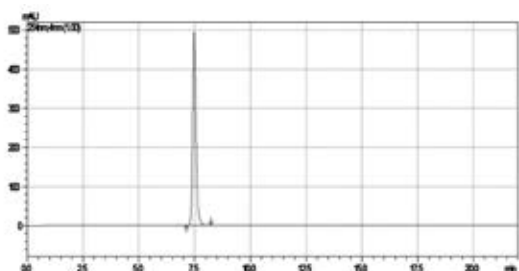
Tiêm lần lượt các mẫu: Dung môi pha mẫu, dung dịch placebo, dung dịch chuẩn kali sorbat, dung dịch chuẩn methylparaben và dung dịch chuẩn propylparaben vào hệ thống sắc ký. Trên sắc ký đồ thu được từ chương trình sắc ký, dung môi pha mẫu không có pic đáp ứng, dung dịch placebo không có pic nào có thời gian lưu tương ứng với các pic kali sorbat (khoảng 6,7 phút), methylparaben (khoảng 7,5 phút), propylparaben (khoảng 19,1 phút) (Hình 3, 4, 5, 6). Quét phổ tử ngoại khả kiến của dung dịch chuẩn và dung dịch thử với detector PDA cho thấy quang phổ hấp thụ tử ngoại khả kiến của hoạt chất trong dung dịch thử giống với quang phổ hấp thụ tử ngoại khả kiến của dung dịch chuẩn, hệ số trùng phổ của cả 3 hoạt chất đều xấp xỉ 1,000 (Hình 7, 8, 9).



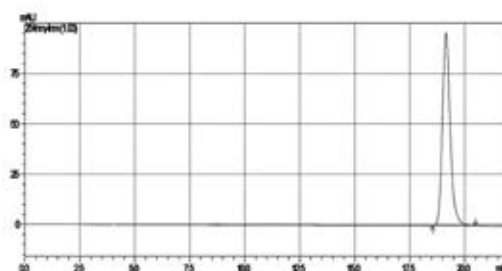
Hình 3. Sắc ký đồ của dung dịch placebo



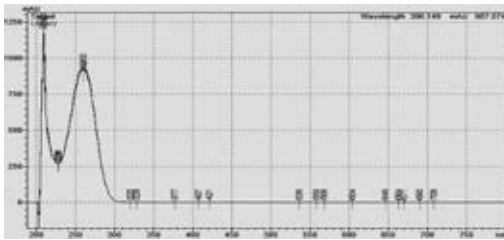
Hình 4. Sắc ký đồ của dung dịch chuẩn kali sorbat



Hình 5. Sắc ký đồ của dung dịch chuẩn methylparaben

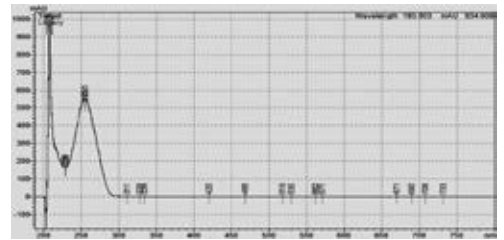


Hình 6. Sắc ký đồ của dung dịch chuẩn propylparaben



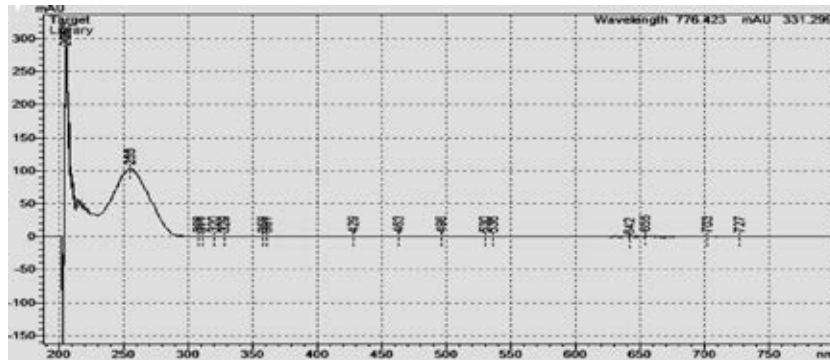
Ret. Time	Lambda Range	Lambda max	Lambda min	Operation	Similarity
6.712	190-800	209.43/259.62/663.6	228.10/320.00/420.7		0.999573

Hình 7. Hình ảnh trùng phổ UV-VIS của pic kali sorbat



Ret. Time	Lambda Range	Lambda max	Lambda min	Operation	Similarity
7.472	190-800	208.00/254.95/328.4	228.67/311.46/420.2		0.998543

Hình 8. Hình ảnh trùng phổ UV-VIS của pic methylparaben



Ret. Time	Lambda Range	Lambda max	Lambda min	Operation	Similarity
19.085	190-800	205.14/255.25/654.7	308.24/320.39/428.6		0.992864

Hình 9. Hình ảnh trùng phổ UV-VIS của pic propylparaben

3.2.2. Tính thích hợp của hệ thống sắc ký

Tính thích hợp của hệ thống sắc ký được xác định bằng cách tiến hành tiêm lặp lại 6 lần dung dịch chuẩn hỗn hợp có nồng độ kali sorbat khoảng 40 µg/ml, nồng độ methylparaben khoảng 44 µg/ml, nồng độ propylparaben khoảng 11,2 µg/ml. Ghi lại các giá trị về thời gian lưu, diện tích pic độ phân giải, hệ số đối xứng, số đĩa lý thuyết.

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

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

Stt	Thông số	Kali sorbat	Methylparaben	Propylparaben
1	Thời gian lưu trung bình (phút)	6,71	7,46	19,09
2	RSD của thời gian lưu (%)	0,07	0,07	0,06
3	Diện tích pic trung bình (mAU.s)	7670906	5092303	2327783
4	RSD của diện tích pic (%)	0,05	0,06	0,07
5	Số đĩa lý thuyết	11452,8	12132,6	14993,7
6	Hệ số đối xứng	1,3	1,2	1,2
7	Độ phân giải giữa các pic	2,9		
		26,0		

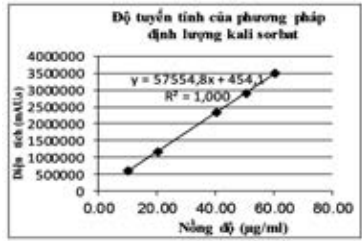
Nhận xét: Các số liệu thu được cho thấy phương pháp HPLC đã xây dựng phù hợp cho việc phân tích định tính, định lượng đồng thời kali sorbat, methylparaben và propylparaben trong dung dịch thuốc uống.

3.2.3. Khảo sát khoảng tuyến tính

Khảo sát trên 5 dung dịch chuẩn hỗn hợp có nồng độ kali sorbat từ 10 – 60 µg/ml, methylparaben từ 11 – 66 µg/ml và propylparaben từ 0,28 – 1,68 µg/ml (lần lượt tương ứng với 25%, 50%, 100%, 125% và 150% so với nồng độ định lượng). Kết quả được thể hiện trong Bảng 2, 3, 4.

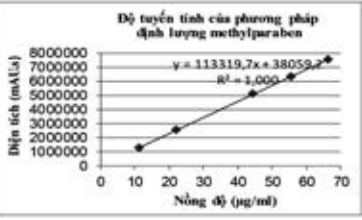
Bảng 2. Kết quả khảo sát tính tuyến tính của kali sorbat

STT	Nồng độ kali sorbat ($\mu\text{g/ml}$)	Diện tích pic (mAU.s)
1	10,10	581431
2	20,20	1162153
3	40,40	2330018
4	50,50	2903545
5	60,60	3488592
Phương trình hồi qui: $y = 57554,8x + 454,1$; $r = 1,000$		



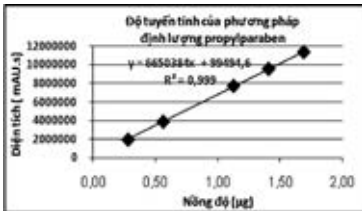
Bảng 3. Kết quả khảo sát tính tuyến tính của methylparaben

STT	Nồng độ methylparaben ($\mu\text{g/ml}$)	Diện tích pic (mAU.s)
1	11,06	1276329
2	22,12	2546088
3	44,24	5096621
4	55,3	6300931
5	66,36	7541953
Phương trình hồi qui: $y = 113379,7x + 38059,2$; $r = 1,000$		



Bảng 4. Kết quả khảo sát tính tuyến tính của propylparaben

STT	Nồng độ propylparaben ($\mu\text{g/ml}$)	Diện tích pic (mAU.s)
1	0,28	1936710
2	0,56	3857914
3	1,13	7675300
4	1,41	9488746
5	1,69	11296153
Phương trình hồi qui: $y = 6650384x + 99494,6$; $r = 1,000$		



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

3.2.4. Khảo sát độ đúng của phương pháp

Bảng 5. Kết quả khảo sát độ đúng của phương pháp

STT	% so với nồng độ định lượng	Kali sorbat			Methylparaben			Propylparaben		
		Lượng thêm vào (mg)	Lượng tìm lại (mg)	% Tìm lại	Lượng thêm vào (mg)	Lượng tìm lại (mg)	% Tìm lại	Lượng thêm vào (mg)	Lượng tìm lại (mg)	% Tìm lại
1	50%	1,022	1,0391	101,68	1,105	1,1134	100,75	0,282	0,2814	99,74
2	50%		1,0384	101,61		1,1128	100,69		0,2818	99,87
3	50%		1,0382	101,59		1,1160	100,98		0,2805	99,42
4	100%	2,016	2,0343	100,91	2,202	2,2172	100,68	0,568	0,5695	100,22
5	100%		2,0376	101,07		2,2233	100,95		0,5699	100,29
6	100%		2,0355	100,97		2,2161	100,63		0,5696	100,23
7	150%	2,982	2,9447	98,75	3,273	3,2505	99,30	0,837	0,8304	99,17
8	150%		2,9415	98,64		3,2402	98,98		0,8296	99,07
9	150%		2,9235	98,04		3,2246	98,51		0,8235	98,35
		Trung bình = 98,48%; n = 6; RSD = 0,39%			Trung bình = 100,16%; n = 6; RSD = 0,95%			Trung bình = 99,59%; n = 6; RSD = 0,66%		

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

Dung dịch chuẩn: Sử dụng dung dịch chuẩn ở mục 3.2.2.

Dung dịch mẫu tự tạo: Thêm một lượng tương ứng các dung dịch chuẩn gốc kali sorbat, methylparaben và propylparaben vào một lượng dung dịch placebo và pha loãng bằng pha động để thu được các dung dịch ở 3 mức nồng độ 50%; 100% & 150% so với nồng độ định lượng

Tiến hành sắc ký theo điều kiện đã ghi ở mục 2.2.2.1. Kết quả đánh giá độ đúng của phương pháp được thể hiện ở Bảng 5.

Kết quả đánh giá độ đúng ở Bảng 5 cho thấy phương pháp phân tích có độ đúng cao với tỷ lệ thu hồi từ 98,04% đến 101,68%, đảm bảo tốt cho việc định lượng đồng thời kali sorbat, methylparaben và propylparaben trong chế phẩm thuốc uống.

3.2.5. Khoảng xác định

Trong phần đánh giá độ đúng, độ tuyến tính suy ra khoảng xác định của kali sorbat là 20 - 60 µg/ml, methylparaben là 22 - 66 µg/ml, propylparaben là 5,6 - 16,8 µg/ml.

3.2.6. Khảo sát độ chính xác của phương pháp

3.2.6.1. 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 quy trình phân tích ở mục 2.2.2.1 và 2.2.2.2. Kết quả thể hiện ở Bảng 6.

Bảng 6. Kết quả khảo sát độ lặp lại của phương pháp.

Mẫu thử	Thể tích mẫu thử (ml)	Kali sorbat		Methylparaben		Propylparaben	
		Diện tích pic (mAU.s)	Hàm lượng (%)	Diện tích pic (mAU.s)	Hàm lượng (%)	Diện tích pic (mAU.s)	Hàm lượng (%)
1	2,0	7456642	100,04	1358350	100,58	4440160	99,75
2	2,0	7508318	100,44	1368089	101,31	4448726	99,95
3	2,0	7453694	99,70	1359982	100,70	4444133	99,84
4	2,0	7489702	100,19	1365603	101,12	4435787	99,65
5	2,0	7491581	100,21	1364772	101,06	4451663	100,01
6	2,0	7440050	99,52	1352692	100,17	4427194	99,46
		TB = 100,02%; n = 6; RSD = 0,34%		TB = 100,82%; n = 6; RSD = 0,42%		TB = 99,78%; n = 6; RSD = 0,20%	

Với điều kiện sắc ký đã chọn, phương pháp có độ lặp lại tốt ($RSD < 2,0\%$), có thể áp dụng để định lượng các mẫu thành phẩm.

3.2.6.2. Khảo sát 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 và hai KNV khác nhau trên cùng một thiết bị. Kết quả thể hiện ở Bảng 7.

Kết quả ở Bảng 7 cho thấy, với điều kiện sắc ký đã chọn, phương pháp có độ chính xác trung gian tốt, RSD với 12 mẫu thử của 2 kiểm nghiệm viên đều nhỏ hơn 2,0%; có thể áp dụng để định lượng các mẫu thành phẩm.

Bảng 7. Kết quả khảo sát độ chính xác trung gian của phương pháp.

Mẫu thử	Thể tích mẫu thử (ml)	Kali sorbat		Methylparaben		Propylparaben	
		Diện tích pic (mAU.s)	Hàm lượng (%)	Diện tích pic (mAU.s)	Hàm lượng (%)	Diện tích pic (mAU.s)	Hàm lượng (%)
1	2,0	7533227	100,66	1374534	101,97	4470995	100,09
2	2,0	7524914	100,55	1370792	101,69	4458809	99,82
3	2,0	7449572	99,55	1356396	100,62	4433523	99,25
4	2,0	7481422	99,97	1363008	101,11	4424934	99,06
5	2,0	7408190	98,99	1349833	100,13	4408851	98,70
6	2,0	7467584	99,79	1357756	100,72	4442786	99,46
		TB = 99,92%; n = 6; RSD = 0,63%		TB = 101,04%; n = 6; RSD = 0,68%		TB = 99,39%; n = 6; RSD = 0,51%	
		TB = 99,97%; n = 12; RSD = 0,48%		TB = 100,93%; n = 12; RSD = 0,55%		TB = 99,59%; n = 6; RSD = 0,42%	

4. Kết luận

Qua khảo sát thực nghiệm, chúng tôi đã xây dựng được một hệ sắc ký lỏng hiệu năng cao để định lượng đồng thời ba thành phần kali sorbat, methylparaben và propylparaben trong chế phẩm thuốc uống. Phương pháp xây dựng có sự tương quan tuyến tính chặt chẽ giữa diện tích pic đáp ứng và nồng độ hoạt chất, độ lặp lại, độ chính xác trung gian và độ đúng cao với các điều kiện trang thiết bị, hóa chất thuốc thử phù hợp với đa số các phòng thí nghiệm. Với các kết quả thu được, chúng tôi đề nghị có thể áp dụng phương pháp định lượng đã nghiên cứu cho chế phẩm thuốc uống có chứa 3 thành phần chất bảo quản kali sorbat, methylparaben và propylparaben.

Tài liệu tham khảo

1. Bộ Y tế (2017), *Dược điển Việt Nam*, Lần xuất bản thứ năm, NXB Y học, Hà Nội.
2. Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương (2010), *Đảm bảo chất lượng thuốc và một số phương pháp kiểm nghiệm thuốc* (Tài liệu đào tạo nâng cao về kiểm nghiệm thuốc).
3. ICH Harmonized Tripartite guidelines (2005), Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2, 1-13.
4. *The British Pharmacopoeia* (2016).
5. *The United State Pharmacopoeia 40* (2017).

SUMMARY

An HPLC method for simultaneous determination of potassium sorbate, methylparaben and propylparaben in Ifsan oral solution is introduced:

The chromatographic conditions are as follows:

- Mobile phase: Solution A (water - acid acetic glacial – 100:1) - Acetonitrile (65:35)

- Detector UV: 254 nm; Column: Gemini Rp18 (250 x 4.6 mm; 5 µm); Flow rate: 1.0 ml/min; Injection volume: 20 µl

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

(Ngày nhận bài: 30/11/2017 ; Ngày phản biện: 28/5/2018 ; Ngày duyệt đăng: 15/6/2018)

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

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

Từ khóa: Levetiracetam, tương đương sinh học, huyết tương, thẩm định phương pháp, HPLC

1. Đặt vấn đề

Levetiracetam (C₈H₁₄N₂O₂) dẫn xuất pyrrolidin, là một thuốc chống co giật, được sử dụng trong điều trị

động kinh [1]. Thuốc được hấp thu nhanh qua đường tiêu hóa với sinh khả dụng xấp xỉ 100%. Ở Việt Nam, Levetiracetam là thuốc chữa động kinh, được nhiều đơn

vị đưa vào sản xuất, với giá thành thấp và được sử dụng rộng rãi trong lâm sàng. Tuy vậy, các thuốc được sản xuất đều chưa được nghiên cứu đánh giá tương đương sinh học (TĐSH) cũng như khả năng thay thế so với thuốc biệt được gốc, do các trung tâm đánh giá TĐSH chưa xây dựng được phương pháp phân tích Levetiracetam trong huyết tương người. Vì vậy, chúng tôi tiến hành xây dựng và thẩm định phương pháp phân tích Levetiracetam trong huyết tương người bằng HPLC với detector PDA nhằm mục đích áp dụng trong các nghiên cứu TĐSH giúp nâng cao chất lượng thuốc Levetiracetam sản xuất và lưu hành tại thị trường Việt Nam.

2. Thực nghiệm

2.1. Thiết bị, hóa chất và thuốc thử

2.1.1. Thiết bị, dụng cụ

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

- Máy sắc ký lỏng cao áp Shimadzu với detector PDA, hệ tiêm mẫu tự động;

- Cột sắc ký RP18: 250 x 4,6 mm, 5 μm (Phenomenex);

- Cân phân tích Sartorius CP224S, độ chính xác 0,1 mg;

- Cân kỹ thuật Sartorius TEA 412;

- Tủ lạnh sâu $-35 \pm -5^{\circ}\text{C}$, máy ly tâm lạnh, micropipet;

- Ống chiết thủy tinh, bình định mức, pipet loại A.

2.1.2. Hóa chất, thuốc thử và chất chuẩn

- Acetonitril loại dùng cho HPLC;

- Cloroform, amoniac, kali dihydro phosphat loại PA (Merck);

- Huyết tương trắng của Viện Huyết học và Truyền máu Trung ương;

- Chất chuẩn Levetiracetam SKS: QT183030715; hàm lượng = 99,27% (nguyên trạng) của Viện Kiểm nghiệm Thuốc TP. HCM;

- Chuẩn nội (IS) Paracetamol SKS: 0208019; hàm lượng: 99,90%; độ ẩm: 0,06% của Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương.

2.2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Đối tượng nghiên cứu

Các mẫu huyết tương trắng không chứa Levetiracetam (LEVET) và các mẫu huyết tương tự tạo chứa LEVET bằng cách cho thêm chuẩn LEVET vào trong mẫu huyết tương trắng với nồng độ khác nhau để khảo sát.

2.2.2. Phương pháp nghiên cứu

Nghiên cứu chiết tách LEVET từ huyết tương bằng

phương pháp chiết lỏng - lỏng để chiết tách LEVET ra khỏi nền mẫu huyết tương sau đó xác định nồng độ LEVET trong mẫu bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao kết nối detector PDA. Khảo sát các điều kiện sắc ký với các loại cột khác nhau, thành phần và tỷ lệ pha động thích hợp để cho khả năng tách tốt nhất.

2.2.3. Thẩm định phương pháp phân tích

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

3. Kết quả và bàn luận

3.1. Xây dựng phương pháp phân tích

Tham khảo các tài liệu về đặc tính của dược chất và các tài liệu phương pháp phân tích đã được công bố [4], tiến hành khảo sát thực nghiệm, tối ưu hóa các điều kiện phân tích theo phương pháp đơn biến. Chúng tôi đã xây dựng được phương pháp định lượng LEVET trong các mẫu huyết tương người như sau:

3.1.1. Điều kiện sắc ký

- Cột: RP18, 250 x 4,6 mm, 5 μm.

- Nhiệt độ cột: 40°C

- Pha động: Acetonitril - Đệm phosphat pH 6,8 (tỷ lệ thích hợp)

- Tốc độ dòng: 1,5 ml/phút

- Detector PDA: 210 nm

- Thể tích tiêm: 50 μl

3.1.2. Phương pháp xử lý mẫu

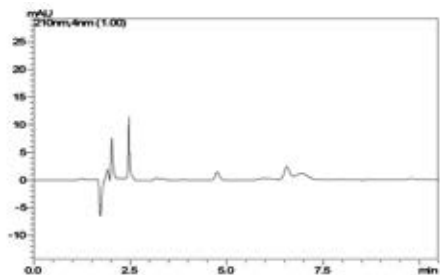
Hút 1,0 ml mẫu huyết tương, thêm 50 μl dung dịch chuẩn nội nồng độ 500 μg/ml, lắc xoáy trong 5 giây. Thêm 250 μl dung dịch amoniac 0,1M, lắc xoáy trong 15 giây. Thêm 5,0 ml cloroform, lắc cơ học ngang 5 phút. Ly tâm 3000 vòng/phút trong 5 phút. Hút 3,0 ml lớp dung môi phía dưới, cô bay hơi dung môi dưới dòng khí nitrogen ở 40°C thu được cặn. Hòa tan cặn trong 0,5 ml pha động. Tiêm vào hệ thống sắc ký.

3.2. Thẩm định phương pháp phân tích

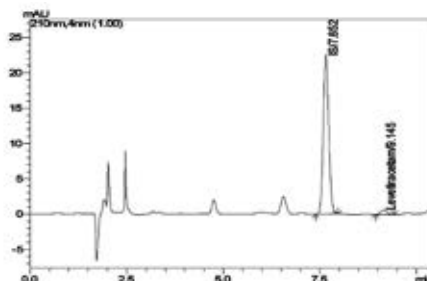
3.2.1. Độ đặc hiệu – chọn lọc của phương pháp

Phân tích mẫu huyết tương trắng, mẫu huyết tương tự tạo có pha LEVET (0,25 μg/ml) và IS. Kết quả được thể hiện ở Hình 1 và Hình 2.

Kết quả phân tích cho thấy, trên sắc ký đồ mẫu huyết tương trắng (Hình 1), tại các khoảng thời gian trùng với thời gian lưu của IS và LEVET trong sắc ký đồ của mẫu chuẩn (7,8 phút đối với IS và 9,1 phút đối với LEVET) không thấy xuất hiện các pic tạp. Do vậy, phương pháp phân tích có độ đặc hiệu/chọn lọc đối với LEVET theo các quy định của phương pháp phân tích thuốc trong dịch sinh học.



Hình 1. Sắc ký đồ mẫu huyết tương trắng



Hình 2. Sắc ký đồ mẫu huyết tương tự tạo chứa chất chuẩn LEVET (0,25 µg/ml) và IS

3.2.2. Đường chuẩn và khoảng tuyến tính

Phân tích các mẫu huyết tương chứa chuẩn LEVET có nồng độ 0,25 µg/ml đến 25 µg/ml theo qui trình đã xây dựng. Xác định sự tương quan giữa nồng độ LEVET trong huyết tương và tỉ lệ diện tích pic LEVET/IS thu được bằng phương pháp hồi qui tuyến tính với hệ số tỷ trọng $1/(\text{nồng độ})^2$. Kết quả xác định mối tương quan tuyến tính được trình bày trong Bảng 1.

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

Mẫu chuẩn	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8
Nồng độ (µg/ml)	0,251	0,502	1,005	2,512	5,023	10,046	17,581	25,115
Diện tích pic LEVET	7327	16086	29884	76604	155905	296461	520060	725649
Diện tích pic IS	222355	236135	232129	231471	231087	229776	237324	226692
Tỷ lệ diện tích pic LEVET/IS	0,033	0,068	0,129	0,331	0,675	1,290	2,191	3,201
Độ đúng (%)	98,4	103,4	98,4	101,7	103,8	99,3	96,4	98,6
Phương trình hồi qui	$y = 0,1292 x + 0,0010; r = 0,9995$							

Kết quả thẩm định cho thấy trong khoảng nồng độ đã khảo sát có sự tương quan tuyến tính giữa nồng độ LEVET với tỷ lệ diện tích pic LEVET/IS với hệ số tương quan xấp xỉ bằng 1. Nồng độ LEVET xác định từ đường chuẩn so với giá trị lý thuyết đều đạt độ đúng từ 96,4% đến 103,8% và nằm trong giới hạn cho phép theo quy định các hướng dẫn thẩm định phương pháp phân tích thuốc trong dịch sinh học.

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

Phân tích các mẫu huyết tương trắng và mẫu huyết tương chứa LEVET có nồng độ khoảng 0,25 µg/ml (mẫu LLOQ). Xác định nồng độ LEVET trong các mẫu LLOQ từ đường chuẩn tiến hành làm song song trong cùng điều kiện. Kết quả thẩm định giới hạn định lượng dưới của phương pháp được trình bày trong Bảng 2.

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

STT	Mẫu trắng	Mẫu chuẩn (0,25 µg/ml)				
	Diện tích pic	Diện tích pic LEVET	Diện tích pic IS	Tỷ lệ diện tích pic LEVET/IS	Nồng độ LEVET tìm thấy (µg/ml)	Độ đúng (%)
1	0	6873	221517	0,031	0,232	92,5
2	0	7058	221732	0,032	0,239	95,0
3	0	7871	210476	0,037	0,282	112,1
4	0	7994	217316	0,037	0,277	110,2
5	0	7510	214342	0,035	0,263	104,9
6	0	7613	214291	0,036	0,267	106,4
TB					0,260	103,5
CV (%)					7,8	7,8

Kết quả thẩm định cho thấy tỷ lệ giữa diện tích pic LEVET 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 LEVET xác định từ đường chuẩn so với nồng độ lý thuyết trong các mẫu LLOQ nằm trong khoảng từ 80 – 120%, giá trị CV (%) < 20% đáp ứng yêu cầu giới hạn định lượng dưới của phương pháp phân tích thuốc trong dịch sinh học.

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

Tiến hành thẩm định độ đúng, độ lặp lại trên 3 lô mẫu huyết tương chứa LEVET ở nồng độ thấp (LQC), nồng độ khoảng giữa đường chuẩn (MQC), và nồng độ cao (HQC) có nồng độ hoạt chất tương ứng là 0,75; 12,5; 20 µg/ml. Xác định hàm lượng LEVET có trong các mẫu bằng đường chuẩn phân tích trong cùng điều kiện. Độ đúng của phương pháp là tỷ lệ % giữa nồng độ xác định được so với nồng độ lý thuyết. Độ lặp lại của phương pháp được biểu thị bằng giá trị CV (%). Kết quả xác định độ đúng, độ lặp lại của phương pháp được trình bày ở Bảng 3.

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

Độ đúng, độ lặp lại	Mẫu LQC (0,75 µg/ml)		Mẫu MQC (12,5 µg/ml)		Mẫu HQC (20 µg/ml)	
	Độ đúng (%)	CV (%)	Độ đúng (%)	CV (%)	Độ đúng (%)	CV (%)
Trong ngày (n = 6)	99,9	1,9	104,7	4,3	99,5	2,5
Khác ngày (n = 3)	96,4	3,7	96,4	7,3	97,5	2,6

Kết quả thẩm định cho thấy ở các khoảng nồng độ thấp, trung bình và cao phương pháp có độ đúng trong ngày, khác ngày dao động trong khoảng từ 96,4% - 104,7%; độ lặp lại trong ngày và khác ngày với giá trị CV < 15%; đáp ứng yêu cầu chỉ tiêu độ đúng, độ lặp lại của phương pháp phân tích thuốc trong dịch sinh học theo hướng dẫn của US – FDA và EMA.

3.2.5. Xác định tỷ lệ thu hồi hoạt chất

Xác định tỷ lệ thu hồi LEVET và IS bằng cách so sánh diện tích pic LEVET và IS trong các lô mẫu có qua chiết tách và không qua chiết tách (mẫu pha trong nước). Kết quả xác định được tỷ lệ thu hồi chuẩn IS là 5,6% (CV < 5%). Tỷ lệ thu hồi của LEVET ở cả ba khoảng nồng độ thấp, trung bình và cao được trình bày ở Bảng 4.

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

STT	Diện tích pic của LEVET					
	LQC (≈ 0,75 µg/ml)		MQC (≈ 12,5 µg/ml)		HQC (≈ 20 µg/ml)	
	Mẫu HT	Mẫu trong nước	Mẫu HT	Mẫu trong nước	Mẫu HT	Mẫu trong nước
1	19273	27937	325934	463683	528470	763246
2	20020	27985	335104	462522	458520	763918
3	19771	28545	340850	464772	518652	763454
4	17922	28683	329801	464434	523040	762903
5	18665	29055	328657	462007	534157	766737
6	19360	28672	320428	459651	525389	760931
Trung bình	19169	28480	330129	462845	514705	763532
CV (%)	4,0	1,5	2,2	0,4	5,4	0,2
Tỷ lệ thu hồi*	53,4		56,6		53,5	

(*): Giá trị đã được hiệu chỉnh theo hệ số pha loãng

Kết quả nghiên cứu cho thấy phương pháp có tỷ lệ thu hồi hoạt chất > 50%, ổn định và lặp lại qua các lần phân tích (CV < 5%).

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

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

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

Độ ổn định	Mẫu	Nồng độ trung bình ban đầu ($\mu\text{g/ml}$; n = 6)	Nồng độ trung bình sau thời gian ổn định ($\mu\text{g/ml}$; n = 6)	% sai khác
3 chu kỳ đông – rã đông	LQC	0,736	0,698	- 5,1
	HQC	20,319	18,897	- 7,0
Độ ổn định dài ngày (- 35°C \pm - 5°C, 62 ngày)	LQC	0,736	0,725	- 1,5
	HQC	20,319	19,747	- 2,8
Độ ổn định thời gian ngắn (4 giờ, nhiệt độ phòng)	LQC	0,736	0,753	2,4
	HQC	20,319	20,143	0,9
Độ ổn định trong autosampler (32 giờ, nhiệt độ phòng)	LQC	0,736	0,766	4,1
	HQC	20,319	20,369	0,2

4. Kết luận

Nghiên cứu đã xây dựng được phương pháp định lượng Levetiracetam trong huyết tương người bằng phương pháp HPLC kết nối detector PDA. Kết quả thẩm định cho thấy phương pháp có giá trị giới hạn định lượng nhỏ (0,25 $\mu\text{g/ml}$); khoảng tuyến tính rộng (0,25 $\mu\text{g/ml}$ đến 25 $\mu\text{g/ml}$); độ đúng cao (96,4% - 104,7%); độ lặp lại với giá trị CV < 15% đáp ứng yêu cầu đối với phương pháp phân tích thuốc trong dịch sinh học của US – FDA, EMA. Phương pháp đã xây dựng có thể ứng dụng trong các nghiên cứu đánh giá sinh khả dụng và tương đương sinh học đối với chế phẩm chứa hoạt chất Levetiracetam.

Tài liệu tham khảo

1. Bộ Y tế (2015), *Dược thư Quốc gia Việt Nam*, Lần xuất bản thứ 2, Nhà xuất bản Y học - Hà Nội.
2. European Medicines Agency, Committee for Medicinal Products for human use (2012). *Guideline on bioanalytical method validation*.
3. U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (2013): *Guidance for industry - Bioanalytical method validation*.
4. GANESAN M., RAUTHAN S. K., YADAV S. S., PANDEY Y., TRIPATHI P. (2010), “Validated liquid chromatographic ultra violet method for the quantization of Levetiracetam in human plasma using liquid-liquid extraction”, *International Journal of pharmaceutical sciences and Research*, Issue 1, Vol. 1.

SUMMARY

A simple, specific and sensitive HPLC method has been developed for determination of Levetiracetam in human plasma. Paracetamol was used as an internal standard. The analyte and the internal standard were extracted from human plasma by the liquid-liquid extraction technique with chloroform. The chromatographic conditions were achieved on the C18 (250 x 4.6 mm; 5 μm) with PDA detector at wavelength 210 nm. The mobile phase included acetonitrile, phosphate buffer (pH 6.8) with suitable ratio at a flow rate of 1.5 ml per min. The method was validated over concentration range from 0.25 to 25 $\mu\text{g/ml}$. The intra and inter-day precision and accuracy were within between 96.4% and 104.7%. This method can be used for BA-BE studies of Levetiracetam preparations.

(Ngày nhận bài: 27/11/2017 ; Ngày phản biện: 20/6/2018 ; Ngày duyệt đăng: 24/9/2018)

NGHIÊN CỨU PHÂN LẬP GINSENO SID RG1 VÀ RB1 TỪ SAPONIN TOÀN PHẦN CỦA TAM THẮT ĐỂ LÀM CHẤT CHUẨN

NGUYỄN THỊ LAN PHƯƠNG, ĐỖ THỊ BÍCH THUẬN, NGUYỄN VIỆT THÚY,
TRẦN THỊ THU TRANG, NGHIÊM THỊ MAI
Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương

Từ khóa: Ginsenosid Rg1, ginsenosid Rb1, phân lập, chất chuẩn, saponin, Tam thất

1. Đặt vấn đề

Tam thất (*Radix Panaxis notoginseng*) và Nhân sâm (*Radix Ginseng*) là hai vị thuốc quý, nổi tiếng trong nền y học cổ truyền ở nước ta. Thành phần hóa học chính của Nhân sâm và Tam thất là các saponin trong đó có ginsenosid Rg1 (G-Rg1) và ginsenosid Rb1 (G-Rb1) là các chất chiếm hàm lượng lớn và đặc trưng [2],[3]. Các Dược điển USP, CP 2015 và ĐDVN V... cũng đưa vào chuyên luận Nhân sâm và Tam thất các chỉ tiêu định tính, định lượng các hoạt chất này.

Bên cạnh đó giá thành của các dược liệu Nhân sâm và Tam thất trên thị trường hiện nay rất cao, vì vậy nguy cơ bị giả mạo hoặc chiết hết hoạt chất. Xuất phát từ nhu cầu thực tiễn cần có chất chuẩn để kiểm tra giám sát các dược liệu Nhân sâm, Tam thất, chúng tôi đã tiến hành nghiên cứu phân lập ginsenosid Rg1 và ginsenosid Rb1 từ saponin toàn phần của Tam thất làm nguyên liệu thiết lập chất chuẩn.

2. Thực nghiệm

2.1. Thiết bị, hóa chất, chất chuẩn

2.1.1. Thiết bị, dụng cụ

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

- Máy HPLC SHIMADZU UFLC;
- Máy HPLC HITACHI;
- Cân kỹ thuật SARTORIUS BSA 224S;
- Cân phân tích METTLER TOLEDO;
- Tủ bảo quản lạnh TOSHIBA;
- Máy lắc siêu âm ELMASONIC S100;
- Cột sắc ký Inertsil RP 18 (250 x 4,6 mm, 5 μ m);
- Nồi cách thủy, bộ cất quay chân không BÜCHI V-850;

- Tủ hút, bộ lọc dung môi cỡ màng lọc 0,45 μ m, bộ dụng cụ sinh hàn, pipet chính xác...

2.1.2. Hóa chất

- Dicloromethan (PA; Merck);
- Cloroform (PA; Merck);
- Acid sulfuric (PA; Merck);
- N-Butanol (PA; Merck);

- Ethyl acetat (PA; Merck);
- Methanol (HPLC; Merck);
- Acetonitril (HPLC; Merck);
- Ethanol tuyệt đối (PA; Việt Nam).

2.1.3. Chất chuẩn

- Ginsenosid Rg1 của Trung Quốc; SKS: G-Rg1. Ref.012011; Hàm lượng = 96,43% tính theo nguyên trạng.

- Ginsenosid Rb1 của Trung Quốc; SKS: G-Rb1. Ref.012011; Hàm lượng = 99,17% tính theo nguyên trạng.

2.2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Đối tượng nghiên cứu

Nguyên liệu của đề tài là saponin toàn phần của Tam thất, được mua trên thị trường. Kiểm tra sự có mặt của G-Rg1 và G-Rb1; sơ bộ định lượng hàm lượng G-Rg1 và G-Rb1 theo Dược điển Trung Quốc 2010 bằng phương pháp HPLC.

- Tên La tinh: Panax Notoginsenosides
- Công ty sản xuất: World-Way Biotech InC (Trung Quốc).

Địa chỉ: Room 2901, 1st Building of Vaya Garden, 35 Melin street, Yuhua District, Changsha, 410019, China.

- Lô: 150402

2.2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.2.1. Phân lập

Mẫu thử được hòa tan trong methanol, sau đó được phân lập bằng phương pháp sắc ký cột với pha tĩnh hấp phụ (silicagel của Merck), khảo sát hệ dung môi chạy cột thích hợp. Kiểm tra các phân đoạn bằng sắc ký lớp mỏng, lựa chọn phân đoạn có G-Rg1 và G-Rb1, đem bốc hơi chân không lấy cặn khô. Kiểm tra G-Rg1, G-Rb1 phân lập được bằng sắc ký lớp mỏng, so sánh với chuẩn G-Rg1, G-Rb1 về giá trị R_f và màu sắc vết thu được. Xác định hàm lượng G-Rg1, G-Rb1 phân lập được bằng HPLC.

2.2.2.2. Phương pháp phân tích G-Rg1 và G-Rb1 được sử dụng trong quá trình phân lập

Điều kiện sắc ký lớp mỏng (SKLM) [1]	Điều kiện sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) [4]															
- Bản mỏng silicagel 60 GF 254 (Merck) - Hệ dung môi: Hệ 1: Dicloromethan – methanol – nước (40:10:1). Hệ 2: Cloroform – ethyl acetat – methanol – nước (15:40:22:10). -Phát hiện vết: dung dịch acid sulfuric 10% trong ethanol, sấy ở 105 ^o C trong 5 phút.	- Cột sắc ký RP-18, 5 μ m (25 cm x 4,6 mm). - Detector diode array với bước sóng phát hiện 203 nm. Pha động: Acetonitril – nước theo chương trình gradient: <table border="1" style="margin: 10px auto;"> <thead> <tr> <th>Thời gian (phút)</th> <th>Acetonitril (%)</th> <th>Nước (%)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0 → 12</td> <td>19</td> <td>81</td> </tr> <tr> <td>12 → 60</td> <td>19 → 36</td> <td>81 → 64</td> </tr> <tr> <td>60 → 70</td> <td>36 → 19</td> <td>64 → 81</td> </tr> <tr> <td>70 → 75</td> <td>19</td> <td>81</td> </tr> </tbody> </table> - Tốc độ dòng: 1,5 ml/phút - Thể tích tiêm: 20 μ l	Thời gian (phút)	Acetonitril (%)	Nước (%)	0 → 12	19	81	12 → 60	19 → 36	81 → 64	60 → 70	36 → 19	64 → 81	70 → 75	19	81
Thời gian (phút)	Acetonitril (%)	Nước (%)														
0 → 12	19	81														
12 → 60	19 → 36	81 → 64														
60 → 70	36 → 19	64 → 81														
70 → 75	19	81														

3. Kết quả và bàn luận

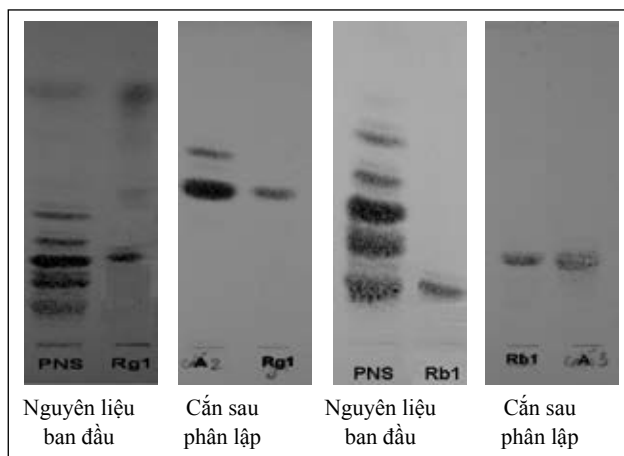
Để phân lập G-Rg1 và G-Rb1 từ nguyên liệu saponin toàn phần của Tam thất chúng tôi lựa chọn phương pháp tách phân đoạn trên sắc ký cột. Qua khảo sát, chúng tôi nhận thấy do mẫu nguyên liệu ban đầu có nhiều thành phần phức tạp, để phân lập được chất G-Rg1 và G-Rb1 với hiệu suất cao đồng thời tiết kiệm dung môi rửa giải và chất nhồi, chúng tôi tiến hành phân lập như sau: Hòa tan 100 g mẫu thử trong 30 ml methanol, thêm 25 g chất nhồi silicagel 60 (cỡ hạt 63 - 200 μ m), trộn đều. Chuyển hỗn hợp này lên cột thủy tinh trung tính có kích thước 60 cm x 6 cm, chứa 500 g chất nhồi silicagel 60 (cỡ hạt 63-200 μ m) đã được hoạt hóa lần lượt với hỗn hợp dung môi dicloromethan - methanol - nước tỷ lệ 200:10:1 và 150:10:1. Rửa giải bằng hỗn hợp dicloromethan - methanol - nước với tỷ lệ phân cực tăng dần (150:10:1, 100:10:1, 80:10:1, 60:10:1, 40:10:1, 20:10:1), tốc độ rửa giải khoảng 2 ml/phút. Hứng dịch rửa giải vào bình nón 250 ml, mỗi bình hứng 200 ml. tiến hành kiểm tra hoạt chất G-Rg1 và G-Rb1 bằng phương pháp SKLM với điều kiện sắc ký đã mô tả như trên, hệ dung môi 1.

Qua quá trình khảo sát nhận thấy: trong nguyên liệu saponin toàn phần của Tam thất có 3 hoạt chất chính thể hiện ở 3 vết khác nhau rõ ràng trên sắc ký đồ bản mỏng phân tích bằng hỗn hợp dung môi dicloromethan - methanol - nước vì vậy G-Rg1 sẽ là chất được tách ra trước, G-Rb1 là chất được lưu giữ mạnh nhất nên thứ tự rửa giải sẽ là cuối cùng. Từ đó xác định được phân đoạn có G-Rg1 là tỷ lệ dung môi 80:10:1 và phân đoạn có G-Rb1 là tỷ lệ dung môi 20:10:1. Gộp các bình được lựa chọn trong phân đoạn có chứa G-Rg1 và G-Rb1, cất thu hồi dung môi thu được cần.

Kiểm tra sơ bộ sự có mặt của các tạp trong cần thu được bằng phương pháp sắc ký lớp mỏng. Kết quả thu được như sau:

- Cần thu được trong phân đoạn có chứa G-Rg1: trên sắc ký đồ bản mỏng ngoài vết chính của G-Rg1 còn có một vết tạp mờ.

- Cần thu được trong phân đoạn có chứa G-Rb1: trên sắc ký đồ bản mỏng chỉ có một vết chính của G-Rb1 không thấy xuất hiện vết tạp.



Hình 1. Sắc ký đồ so sánh nguyên liệu ban đầu và cần sau khi phân lập

Định lượng sơ bộ hàm lượng G-Rg1 và G-Rb1 trong cần thu được bằng phương pháp HPLC, kết quả thu được hàm lượng G-Rg1 và G-Rb1 trong cần thu được sau khi phân lập là khá cao đều trên 79% đáp ứng yêu cầu làm nguyên liệu để tiếp tục tinh chế sản xuất chất chuẩn.

4. Kết luận

Đã xây dựng được quy trình phân lập đồng thời ginsenosid-Rg1 và ginsenosid-Rb1 bằng phương pháp tách phân đoạn trên cột sắc ký silicagel với hàm lượng thu được khá cao từ saponin toàn phần của Tam thất. Quy trình phân lập này khá đơn giản, dễ tiến hành, tiết kiệm được thời gian và dung môi hóa chất.

Tài liệu tham khảo

1. Bộ Y tế (2017), *Dược điển Việt Nam V*, tập 2, Nhà xuất bản Y học, Hà Nội.
2. Trường Đại học Dược Hà Nội (1998), *Bài giảng Dược liệu*, tập 1, trang 165.
3. Viện Dược liệu (2003), *Cây thuốc và động vật làm thuốc ở Việt Nam*, tập 2, Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật, trang 775.
4. *Pharmacopoeia of The People's Republic of China* (2015), volume I, page 491.

SUMMARY

The isolation of ginsenoside-Rg1 and ginsenoside-Rb1 from Panax notoginseng saponins are bought in the market. Ginsenoside-Rg1 and ginsenoside-Rb1 was isolated by chromatographic column method using silica gel (the particle size of the silica gel is in the range of 63 - 200 μm) as station phases with the suitable resolution solvent-systems. The obtained residues contain more than 79% of G-Rg1 or G-Rb1.

(Ngày nhận bài: 30/12/2017 ; Ngày phản biện: 16/3/2018 ; Ngày duyệt đăng: 04/7/2018)

NGHIÊN CỨU TINH CHẾ GINSENO SID RG1 TỪ CĂN THU ĐƯỢC SAU PHÂN LẬP SAPONIN TOÀN PHẦN CỦA TAM THẮT ĐỂ LÀM CHẤT CHUẨN

NGUYỄN THỊ LAN PHƯƠNG, NGUYỄN VIỆT THÚY,
NGHIÊM THỊ MAI, NGUYỄN TUYẾT NHUNG

Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương

Từ khóa: Ginsenosid Rg1, tinh chế, chất chuẩn, saponin, Tam thất

1. Đặt vấn đề

Ginsenosid Rg1 (G-Rg1) là một saponin có phần aglycon là 20(S) protopanaxatriol. G-Rg1 có nhiều trong các dược liệu quý như Tam thất (*Radix Panasis notoginseng*) và Nhân sâm (*Radix Ginseng*) với các công dụng chính: bồi bổ cơ thể, liệt dương, lãnh dục, kích thích tiêu hóa, chống stress, chống lão hóa...[2],[3].

Hiện nay G-Rg1 cũng là hoạt chất được đưa vào để định tính, định lượng trong hai chuyên luận dược liệu Nhân sâm và Tam thất của Dược điển Việt Nam V, Dược điển Trung Quốc 2015 [4], Dược điển Mỹ... Bên cạnh đó chất chuẩn G-Rg1 hiện nay đang có giá thành rất cao và nguồn cung cấp thường không ổn định. Xuất phát từ nhu cầu thực tiễn cần có chất chuẩn để kiểm tra giám sát các dược liệu Nhân sâm, Tam thất chúng tôi đã tiến hành nghiên cứu tinh chế ginsenosid Rg1 từ căn thu được sau phân lập saponin toàn phần của Tam thất để làm nguyên liệu thiết lập chất chuẩn.

2. Thực nghiệm

2.1. Thiết bị, hóa chất, chất chuẩn

2.1.1. Thiết bị, dụng cụ

Các thiết bị, dụng cụ của Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương (đã được hiệu chuẩn theo quy định của ISO/IEC 17025 và GLP) và Viện Hóa học – Viện Hàn

lâm Khoa học và công nghệ Việt Nam, gồm:

- Máy HPLC SHIMADZU UFLC;
- Máy HPLC HITACHI;
- Máy sắc ký lỏng khối phổ LC ESI orbitrap (THERMO LTQ Orbitrap XL);
- Máy cộng hưởng từ hạt nhân NMR-BRUKER-500MHz;
- Máy đo điểm chảy ELECTROTHERMAL IA 6304;
- Máy đo phổ hồng ngoại NILOLET LEXUSB 670FT-IR;
- Cân kỹ thuật SARTORIUS BSA 224S;
- Cân phân tích METTLER TOLEDO;
- Tủ sấy MEMMERT UL 40;
- Tủ bảo quản lạnh TOSHIBA;
- Máy lắc siêu âm ELMASONIC S100;
- Cột sắc ký Inertsil RP 18 (250 x 4,6 mm, 5 μm);
- Nồi cách thủy, bộ cất quay chân không BÜCHI V-850;
- Tủ hút, bộ lọc dung môi cỡ màng lọc 0,45 μm , bộ dụng cụ sinh hàn, pipet chính xác...

2.1.2. Hóa chất

- Dicloromethan (PA; Merck);
- Cloroform (PA; Merck);
- Acid sulfuric (PA; Merck);
- N-Butanol (PA; Merck);

- Ethyl acetat (PA; Merck);
- Methanol (HPLC; Merck);
- Acetonitril (HPLC; Merck);
- Ethanol tuyệt đối (PA; Việt Nam).

2.1.3. Chất chuẩn

- Ginsenosid Rg1 của Trung Quốc; SKS: G-Rg1. Ref.012011; Hàm lượng = 96,43% tính theo nguyên trạng).

2.2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Đối tượng nghiên cứu

Cần thu được sau khi phân lập từ saponin toàn phần của Tam thất:

- Tên La tinh: Panax Notoginsenosides
- Công ty sản xuất: World-Way Biotech InC (Trung Quốc).

Địa chỉ: Room 2901, 1st Building of Vaya Garden, 35 Melin street, Yuhua District, Changsha, 410019, China.

- Lô: 150402

2.2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.2.1. Tinh chế

Mẫu thử được hòa tan trong methanol, sau đó được tinh chế bằng phương pháp sắc ký cột pha đảo với pha tĩnh là hạt C18 của Merck, khảo sát hệ dung môi chạy cột thích hợp. Kiểm tra các phân đoạn bằng sắc ký lớp mỏng, lựa chọn phân đoạn có G-Rg1, đem bốc hơi chân không lấy cặn khô. Kiểm tra G-Rg1 tinh chế được bằng sắc ký lớp mỏng, so sánh với chuẩn G-Rg1 về giá trị R_f và màu sắc vết thu được. Xác định hàm lượng G-Rg1 tinh chế được bằng phương pháp HPLC.

2.2.2.2. Phương pháp phân tích G-Rg1 được sử dụng trong quá trình tinh chế

Điều kiện sắc ký lớp mỏng (SKLM)	Điều kiện sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) [4]															
<p>* Phương pháp pha thuận [1]</p> <ul style="list-style-type: none"> - Bản mỏng silicagel 60 GF 254 (Merck); - Hệ dung môi: Dicloromethan – methanol – nước (40:10:1); - Phát hiện vết: Dung dịch acid sulfuric 10% trong ethanol, sấy ở 105°C trong 5 phút. <p>* Phương pháp pha đảo</p> <ul style="list-style-type: none"> - Bản mỏng silicagel 60 RP-18 GF 254 (Merck); - Hệ dung môi: <ul style="list-style-type: none"> Aceton – nước (2:1) Aceton – nước (1:1) Aceton – nước (1:2) - Phát hiện vết: Dung dịch acid sulfuric 10% trong ethanol, sấy ở 105°C trong 5 phút. 	<ul style="list-style-type: none"> - Cột sắc ký RP-18 (25cm x 4,6 mm; 5µm). - Detector diode array với bước sóng phát hiện 203 nm. <p>Pha động: Acetonitril - nước theo chương trình gradient:</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Thời gian (phút)</th> <th>Acetonitril (%)</th> <th>Nước (%)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0 → 12</td> <td>19</td> <td>81</td> </tr> <tr> <td>12 → 60</td> <td>19 → 36</td> <td>81 → 64</td> </tr> <tr> <td>60 → 70</td> <td>36 → 19</td> <td>64 → 81</td> </tr> <tr> <td>70 → 75</td> <td>19</td> <td>81</td> </tr> </tbody> </table> <ul style="list-style-type: none"> - Tốc độ dòng: 1,5 ml/phút - Thể tích tiêm: 20 µl 	Thời gian (phút)	Acetonitril (%)	Nước (%)	0 → 12	19	81	12 → 60	19 → 36	81 → 64	60 → 70	36 → 19	64 → 81	70 → 75	19	81
Thời gian (phút)	Acetonitril (%)	Nước (%)														
0 → 12	19	81														
12 → 60	19 → 36	81 → 64														
60 → 70	36 → 19	64 → 81														
70 → 75	19	81														

2.2.2.3. Xác định cấu trúc, nhận dạng và đánh giá độ tinh khiết của G-Rg1 tinh chế được

- Xác định cấu trúc và nhận dạng: Kết hợp các phương pháp phân tích khối phổ và cộng hưởng từ hạt nhân, phân tích dữ liệu từ hai loại phổ này, so sánh với dữ liệu phổ trong các bài báo khoa học đã công bố để khẳng định cấu trúc chất đem đo phù hợp với cấu trúc của G-Rg1.

- Định tính, định lượng và đánh giá độ tinh khiết: So sánh phổ IR của chất chuẩn G-Rg1 và G-Rg1 tinh chế được để định tính và kiểm tra độ tinh khiết của chất tinh chế được. Sử dụng phương pháp sắc ký lỏng: So sánh thời gian lưu kết hợp chồng phổ UV-VIS của pic G-Rg1 tinh chế được và pic G-Rg1 chuẩn theo điều kiện sắc ký đã lựa chọn để định tính G-Rg1 tinh chế được; dựa vào diện tích pic của G-Rg1 trong sắc ký đồ của dung

dịch thử và dung dịch chuẩn để xác định hàm lượng của G-Rg1 tinh chế được.

3. Kết quả và bàn luận

3.1. Tinh chế

Qua nghiên cứu các tài liệu tham khảo, chúng tôi nhận thấy có thể sử dụng phương pháp sắc ký cột với pha tĩnh là hạt Rp-18 để tinh chế G-Rg1 thành chất tinh khiết với quy trình tinh chế như sau: Hòa tan cặn sau khi phân lập trong methanol, chuyển dung dịch này lên cột thủy tinh trung tính có kích thước 60 cm x 4 cm, chứa 100 g chất nhồi silicagel pha đảo Rp-18 (cỡ hạt 140 µm) đã được hoạt hóa với hỗn hợp dung môi aceton – nước với tỷ lệ lần lượt 7:3; 5:5; 2:8. Rửa giải bằng hỗn hợp dung môi aceton - nước với tỷ lệ dung môi aceton tăng dần từ 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70% để rửa giải, tốc độ rửa giải khoảng 0,5 ml/phút. Hứng dịch rửa giải vào

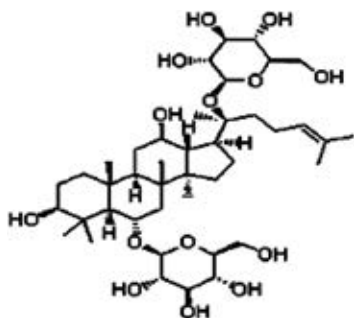
bình hứng 100 ml, mỗi bình hứng 40 ml dịch rửa giải. Phân đoạn xác định sự có mặt G-Rg1 là acetone 30%, gộp dung dịch các bình được lựa chọn có chứa G-Rg1, cất thu hồi dung môi thu được sản phẩm là G-Rg1 có dạng bột vô định hình, màu trắng, hàm lượng 91,8% (HPLC) [4].

3.2. Xác định cấu trúc, nhận dạng và cấu trúc của chất tinh chế được

Sản phẩm cuối cùng của quá trình tinh chế được phân tích bằng các thông số:

- Tính chất: Bột vô định hình màu trắng.
- Phổ hồng ngoại (IR) trùng với phổ của chất chuẩn G-Rg1 (hệ số march là 0,9938), đồng thời cho các đỉnh hấp thụ đặc trưng cho các nhóm (-OH) ở 3399, (-CH) ở 2930, (-CO) ở 1641 cm^{-1} và các đỉnh hấp thụ mạnh đặc trưng cho (-CH=CH-) vòng thơm ở 1452, 1385, 1309, 1075, 1040, 926, 891, 641 cm^{-1} .

- Phổ cộng hưởng từ hạt nhân: Phổ cộng hưởng từ hạt nhân của sản phẩm thu được sau tinh chế được so với chuẩn G-Rg1 giống nhau ở cả 2 phổ: phổ ^{13}C -NMR và phổ ^1H -NMR. Kết quả phân tích phổ NMR hoàn toàn chính xác và phù hợp với cấu trúc của phân tử G-Rg1 như sau:



Tài liệu tham khảo

1. Bộ Y tế (2017), *Dược điển Việt Nam V*, tập 2, Nhà xuất bản Y học, Hà Nội.
2. Trường Đại học Dược Hà Nội (1998), *Bài giảng Dược liệu*, tập 1, trang 165.
3. Viện Dược liệu (2003), *Cây thuốc và động vật làm thuốc ở Việt Nam*, tập 2, Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật, trang 775.
4. *Pharmacopoeia of The People's Republic of China* (2015), volume I, page 491.

SUMMARY

The purification of ginsenoside-Rg1 from the residue that obtained after isolating from Panax notoginseng saponins. Ginsenoside-Rg1 was purified by chromatographic column method using reverse phases silica gel (Rp-18) as station phases with the suitable resolution solvent-systems.

The ginsenoside Rg1 structure of final products is confirmed by IR, MS and NMR spectrography. The content of ginsenoside Rg1 obtained is 91.8% (determined by HPLC). This product can be used to control the quality of herbal materials and drugs which are contain the ginsenoside Rg1.

(Ngày nhận bài: 30/12/2017 ; Ngày phản biện: 16/3/2018 ; Ngày duyệt đăng: 04/7/2018)

ĐÁNH GIÁ ĐỘC TÍNH CẤP VÀ BÁN TRƯỜNG DIỄN CỦA VIÊN ĐẠI TRÀNG TÂM BÌNH TRÊN ĐỘNG VẬT THÍ NGHIỆM

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

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

1. Đặt vấn đề

Thực phẩm chức năng “Đại tràng Tâm Bình” do Công ty TNHH SX & TM Dược phẩm Tâm Bình sản xuất là sản phẩm phối hợp nhiều dược liệu thường được sử dụng để hỗ trợ điều trị đại tràng như: Bạch truật, Mộc hương bắc, Hoàng liên, Bạch linh, Đẳng sâm, ... Việc phối hợp các dược liệu để bào chế ra dạng thành phẩm tiện sử dụng là xu hướng đang được quan tâm trong sản xuất thuốc và thực phẩm chức năng hiện nay. Tuy nhiên việc phối hợp này phần lớn dựa trên kinh nghiệm dân gian còn ít hoặc thậm chí chưa có bằng chứng khoa học để đánh giá hiệu quả cũng như tính an toàn một cách đầy đủ. Trong nghiên cứu này chúng tôi tiến hành thử độc tính cấp và độc tính bán trường diễn của sản phẩm viên Đại tràng Tâm Bình nhằm đánh giá tính an toàn của sản phẩm trên mô hình tiền lâm sàng.

2. Thực nghiệm

2.1. Thiết bị, dụng cụ, hóa chất

- Máy xét nghiệm sinh hóa (Beckman Coulter AU 680, Mỹ);
- Máy xét nghiệm huyết học (Sysmex XS-1000I, Nhật Bản);
- Máy li tâm lạnh (Eppendorf 5804 R, Đức);
- Máy cắt vi thể Microm HM315, Đức;
- Kính hiển vi quang học gắn camera kết nối máy tính (Nikon, Nhật Bản);
- Kim cong cho uống;
- Xy lanh, găng cao su, cốc thủy tinh, chày cối sứ;
- Bộ kit định lượng các chỉ số huyết học và sinh hóa (của Stromatolyser và Beckman Coulter);
- Các hóa chất khác.

2.2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Động vật thí nghiệm

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

Thỏ trưởng thành khỏe mạnh, cả 2 giống (đực và cái), cân nặng 2,0 - 2,5 kg, đạt tiêu chuẩn thí nghiệm do Trung tâm G1- Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương cung cấp.

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

2.2.2. Đối tượng nghiên cứu

Thực phẩm chức năng viên “Đại tràng Tâm Bình” do Công ty TNHH SX & TM Dược phẩm Tâm Bình sản xuất, thành phần: Bạch truật, Mộc hương bắc, Hoàng liên, Cam thảo, Bạch linh, Đẳng sâm, Trần bì, Sa nhân, Mạch nha, Sơn tra, Hoài sơn, Nhục đậu khấu và các phụ liệu khác.

Lô sản xuất: 12012016; ngày sản xuất: 12/01/2016; hạn dùng: 12/01/2019.

2.2.3. Phương pháp nghiên cứu.

2.2.3.1. Thử độc tính cấp [1]

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

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

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

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

Theo dõi biểu hiện của chuột sau khi uống trong 24 giờ đầu và theo dõi hoạt động của chuột trong thời gian 7 ngày sau khi uống.

2.2.3.2. Thử độc tính bán trường diễn [4],[5]

Nghiên cứu độc tính bán trường diễn được tiến hành trên 3 nhóm thỏ gồm 1 nhóm chứng và 2 nhóm thử, mỗi nhóm 7 con.

Hai nhóm thử được cho uống mẫu thử với liều 0,378 viên/kg thỏ (5 ml hỗn dịch B/kg thỏ) và liều 1,133 viên/kg thỏ (5 ml hỗn dịch A/kg thỏ). Cho thỏ uống bằng cách bơm thuốc qua ống thông (sonde) được luồn từ miệng vào thẳng dạ dày thỏ. Thời gian uống liên tục 28 ngày.

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

- Hỗn dịch A: Nghiền 34 viên Đại tràng Tâm Bình với nước để thu được 150 ml hỗn dịch có nồng độ \approx 0,227 viên/ml.

- Hỗn dịch B: Lấy 40 ml hỗn dịch A thêm 80 ml nước để thu được hỗn dịch có nồng độ \approx 0,076 viên/ml.

Nhóm chứng: Dùng để tham chiếu, cho uống nước cất hàng ngày.

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

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

3. Kết quả và bàn luận

3.1. Độc tính cấp

Trước tiên chúng tôi tiến hành nghiên cứu sơ bộ để tìm mức liều không làm chết chuột thí nghiệm và mức liều làm chết 100% số chuột thí nghiệm. Qua thử nghiệm này, chúng tôi đã tìm được liều không gây chết chuột là 5,0 g mẫu thử/kg chuột, liều gây chết 100% số chuột thử nghiệm là 10,0 g mẫu thử/kg chuột

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

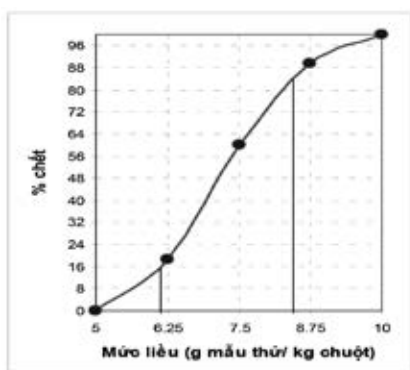
Bảng 1. Số liệu thử độc tính cấp viên Đại tràng Tâm Bình

Mức liều	Liều thử (g mẫu thử/kg chuột)	Số chuột chết/ số sống thực tế	Số chuột chết/ số sống kỳ vọng	% Chết
1	5,00	0/10	0/23	0
2	6,25	3/7	3/13	18,75
3	7,50	6/4	9/6	60,00
4	8,75	8/2	17/2	89,47
5	10,00	10/0	27/0	100

Sau khi uống thuốc, chuột có các biểu hiện ngộ độc tùy theo mức liều uống. Ở mức liều thấp (5,0 g/kg chuột) không nhận thấy có biểu hiện ngộ độc. Ở mức liều trong khoảng từ 6,25 g đến 10,0 g mẫu thử/ kg chuột, chuột có

biểu hiện tăng hoạt động, số chuột chết có biểu hiện co giật, chuột không chết có biểu hiện giảm hoạt động, mệt mỏi. Sau 24 giờ, số chuột không chết ở các mức liều trên ăn uống hoạt động bình thường trở lại.

Đồ thị số liệu độc tính cấp thực nghiệm của viên Đại tràng Tâm Bình được trình bày ở *Hình 1*.



Hình 1. Đồ thị số liệu độc tính cấp

LD_{50} được tính theo phương pháp Behrens [2] theo công thức:

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

Trong đó:

A: Liều gây chết a % ĐVTN

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

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

d: khoảng cách giữa các liều (g)

Dựa trên bảng số liệu ta có:

$$a = 18,75\%$$

$$b = 60,00\%$$

$$A = 6,25 \text{ (g/kg chuột)}$$

$$d = 1,25 \text{ (g/kg chuột)}$$

Như vậy:

$$LD_{50} = 6,25 + (50 - 18,75) \times 1,25 / (60,0 - 18,75)$$

$$LD_{50} = 7,197 \text{ g mẫu thử/kg chuột.}$$

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

Trong đó: k : Hệ số Behrens = 0,66

n : Số chuột trong mỗi nhóm,

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

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

Theo đồ thị, ta có: $LD_{16} = 6,125$ g mẫu thử/kg chuột, $LD_{84} = 8,500$ g mẫu thử/kg chuột.

Giá trị $s = (8,500 - 6,125)/2 = 1,188$ g mẫu thử/kg chuột.

Sai số chuẩn: $(E_{S_{LD50}})^2 = ksd/n = 0,66 \times 1,188 \times 1,25/10$ nên $S_{LD50} = 0,313$ g mẫu thử/kg chuột

Vậy $LD_{50} = (7,197 \pm 0,313)$ g mẫu thử/kg chuột.

3.2. Độc tính bán trường diễn.

Trước tiên chúng tôi lựa chọn mức liều thử nghiệm cho nghiên cứu thử độc tính bán trường diễn của sản

phẩm viên Đại tràng Tâm Bình. Dựa trên liều sử dụng tối đa trên người của sản phẩm là 6 viên/người/ngày) và sử dụng hệ số chuyển đổi liều giữa thỏ và người là 3,1 [5] chúng tôi đã lựa chọn 2 mức liều thử nghiệm cho nghiên cứu là 0,378 viên/kg thỏ (tương ứng với mức liều dự kiến cho người là 6 viên/người 50 kg/ngày) và 1,133 viên/kg thỏ (cao gấp 3 lần liều dự kiến cho người).

3.2.1. Kết quả theo dõi cân nặng thỏ

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

Bảng 2. Số liệu cân nặng thỏ

Nhóm (n = 7)	Kết quả cân nặng (kg)					P
	Trước TN (m ₁)	Sau 1 tuần (m ₂)	Sau 2 tuần (m ₃)	Sau 3 tuần (m ₄)	Sau 4 tuần (m ₅)	
Chứng (C)	2,05 ± 0,05	2,14 ± 0,06	2,26 ± 0,07	2,38 ± 0,07	2,54 ± 0,09	P _{trước-sau} < 0,001
% so với trước thử nghiệm		104,1%	110,1%	115,7%	123,9%	
Thử 1 (T1)	2,08 ± 0,05	2,18 ± 0,05	2,30 ± 0,10	2,40 ± 0,10	2,55 ± 0,15	P _{trước-sau} < 0,001 P _{trước} (T1-C) = 0,282 P _{sau} (T1-C) = 0,861
% so với trước thử nghiệm		104,4%	110,5%	115,1%	122,6%	
Thử 2 (T2)	2,12 ± 0,10	2,22 ± 0,06	2,34 ± 0,09	2,49 ± 0,18	2,57 ± 0,19	P _{trước-sau} < 0,001 P _{trước} (T2-C) = 0,155 P _{sau} (T2-C) = 0,728
% so với trước thử nghiệm		104,8%	110,5%	117,3%	121,4%	

3.2.2. Kết quả theo dõi các chỉ số huyết học

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

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

Nhóm	Chỉ số	Hồng cầu (x 10 ¹² /lít)	Bạch cầu (x 10 ⁹ /lít)	Tiểu cầu (x 10 ⁹ /lít)	Hematocrit (%)	Hemoglobin (g/dl)
	Chứng (n = 7)	Trước TN	5,8 ± 0,6	9,3 ± 0,9	510,4 ± 122,0	38,9 ± 3,8
Giữa TN		6,0 ± 0,6	12,4 ± 1,0	486,1 ± 79,7	42,1 ± 2,8	10,7 ± 1,1
Sau TN		5,8 ± 0,6	9,9 ± 1,6	495,9 ± 89,4	37,4 ± 3,2	12,1 ± 0,9
Thử 1 (n = 7)	Trước TN	5,8 ± 1,2	8,7 ± 1,2	447,6 ± 61,4	37,4 ± 7,2	12,2 ± 1,5
	Giữa TN	5,8 ± 0,4	12,2 ± 0,4	451,9 ± 68,6	40,4 ± 2,2	9,7 ± 1,6
	Sau TN	6,1 ± 0,4	8,0 ± 1,8	426,4 ± 91,5	36,6 ± 3,4	12,3 ± 0,5
Thử 2 (n = 7)	Trước TN	5,9 ± 0,7	10,8 ± 3,1	501,0 ± 54,3	37,3 ± 3,4	11,8 ± 0,9
	Giữa TN	6,0 ± 0,6	12,3 ± 1,0	445,9 ± 99,8	40,5 ± 2,8	9,6 ± 2,2
	Sau TN	6,2 ± 0,8	11,6 ± 2,2	483,0 ± 83,7	38,8 ± 3,0	12,5 ± 0,8

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

<i>p</i>		<i>Chỉ số</i>	<i>Hồng cầu</i>	<i>Bạch cầu</i>	<i>Tiểu cầu</i>	<i>Hematocrit</i>	<i>Hemoglobin</i>
<i>Trước TN</i>	<i>P_{C-T1}</i>		0,898	0,331	0,247	0,634	0,869
	<i>P_{C-T2}</i>		0,877	0,243	0,855	0,412	0,664
<i>Giữa TN</i>	<i>P_{C-T1}</i>		0,491	0,763	0,405	0,221	0,179
	<i>P_{C-T2}</i>		0,978	0,878	0,420	0,310	0,259
<i>Sau TN</i>	<i>P_{C-T1}</i>		0,270	0,062	0,176	0,668	0,589
	<i>P_{C-T2}</i>		0,296	0,140	0,795	0,441	0,433

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

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

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

<i>Nhóm</i>		<i>Chỉ số</i>	<i>AST (U/lit)</i>	<i>ALT (U/lit)</i>	<i>Bilirubin toàn phần (μmol/lit)</i>	<i>Protein toàn phần (g/lit)</i>	<i>Cholesterol (mmol/l)</i>	<i>Creatinin (μmol/l)</i>	<i>Urea (mmol/l)</i>
Chứng (n = 7)	<i>Trước TN</i>		47,8±25,0	48,2±13,9	1,3±0,5	56,1±6,8	2,2±0,8	71,9±11,3	4,9±1,7
	<i>Giữa TN</i>		44,9±16,2	59,0±15,0	1,1±0,3	54,2±3,5	1,6±0,3	79,2±4,1	5,4±0,7
	<i>Sau TN</i>		32,1±9,6	58,4±25,3	1,0±0,4	49,6±2,6	1,4±0,6	93,0±12,6	4,9±1,0
Thử 1 (n = 7)	<i>Trước TN</i>		28,9±10,2	45,5±17,0	0,9±0,3	53,4±3,4	1,8±0,5	70,9±5,0	5,2±0,5
	<i>Giữa TN</i>		38,7±11,2	47,8±9,9	1,3±0,5	54,0±2,8	1,2±0,5	77,1±7,1	4,9±0,4
	<i>Sau TN</i>		34,8±12,3	61,1±5,6	1,3±0,4	50,0±2,9	1,1±0,3	81,3±17,0	5,4±1,2
Thử 2 (n = 7)	<i>Trước TN</i>		25,7±8,7	36,5±14,4	0,9±0,6	53,6±2,7	1,6±0,5	75,3±7,4	4,7±0,9
	<i>Giữa TN</i>		45,0±14,1	48,4±8,7	1,0±0,2	53,9±2,7	1,4±0,5	75,2±4,5	4,8±0,7
	<i>Sau TN</i>		30,7±7,9	46,4±23,4	1,1±0,4	50,2±3,7	1,4±0,3	86,4±8,9	4,3±0,9

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

<i>p</i>		<i>Chỉ số</i>	<i>AST</i>	<i>ALT</i>	<i>Bilirubin toàn phần</i>	<i>Protein toàn phần</i>	<i>Cholesterol</i>	<i>Creatinin</i>	<i>Urea</i>
<i>Trước TN</i>	<i>P_{C-T1}</i>		0,090	0,752	0,090	0,558	0,334	0,833	0,721
	<i>P_{C-T2}</i>		0,065	0,146	0,149	0,597	0,109	0,514	0,786
<i>Giữa TN</i>	<i>P_{C-T1}</i>		0,424	0,124	0,390	0,908	0,159	0,516	0,095
	<i>P_{C-T2}</i>		0,989	0,131	0,530	0,868	0,559	0,107	0,095
<i>Sau TN</i>	<i>P_{C-T1}</i>		0,664	0,787	0,153	0,758	0,291	0,168	0,452
	<i>P_{C-T2}</i>		0,767	0,376	0,611	0,732	0,987	0,550	0,250

3.2.4. Quan sát đại thể

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

3.2.5. Quan sát vi thể

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

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

Cấu trúc gan không bị đảo lộn, nhận rõ các tiểu thùy với tĩnh mạch trung tâm và các bè gan xếp xếp hướng tâm. Các tế bào gan hình tròn hay đa diện, có nhân nhỏ, đều nhau, không thấy hoại tử, không thấy xâm nhập viêm. Một số tế bào gan thoái hóa có khả năng hồi phục (bao gồm thoái hóa nước và thoái hóa hạt), một số tế bào lắng đọng glycogen trong bào tương. Các khoảng cửa không tăng sinh xơ, không tăng sinh ống mật, không thấy xâm nhập tế bào viêm.

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

3. Kết luận

Kết quả thử nghiệm độc tính cấp theo phương pháp Behrens đã chỉ ra viên Đại tràng Tâm Bình có $LD_{50} = (7,197 \pm 0,313)$ g mẫu thử/ kg chuột. Theo phân loại độc tính của GHS [3], mẫu thử viên Đại tràng Tâm Bình có độc tính thấp dưới ngưỡng phân loại.

Khi cho thỏ uống mẫu thử với 2 mức liều là 0,378 viên/kg thỏ/ngày (tương ứng với mức liều tối đa dùng cho người là 6 viên/người/ngày) và mức liều 1,133 viên/kg thỏ/ngày (cao gấp 3 lần so với liều tối đa dùng cho người), trong 28 ngày không thấy có ảnh hưởng có ý nghĩa thống kê đến thể trạng, chức năng tạo máu và mô bệnh học gan thận trong suốt quá trình uống.

Không nhận thấy sự bất thường và khác nhau về hình dạng bên ngoài, màu sắc của các tổ chức tim, gan, thận, phổi và hệ tiêu hóa khi quan sát đại thể cũng như cấu trúc của gan, thận khi quan sát vi thể của thỏ giữa nhóm chứng và 2 nhóm thử.

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

Tài liệu tham khảo

1. Đỗ Trung Đàm (2014), *Phương pháp xác định độc tính cấp của thuốc*, NXB. Y học, Hà Nội.
2. Behrens B. and Kaber G. (1983), *Mathematics for Naturalists and Agriculturalists*, PWN, Warszawa, p.218.
3. GHS 7th Edition (2017), *Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS)*, United Nations, p. 115.
4. OECD guidelines for testing of chemical (2008), *Repeated dose 28 - days Oral Toxicity study in Rodents*, OECD 407.
5. Sharma V. and McNeill J. H. (2009), *To scale or not to scale: The principles of dose extrapolation*, British Journal of Pharmacology, 157, 907–921.

SUMMARY

“Đại tràng Tam Bình” capsules manufactured by Tam Bình Pharmaceutical Trading Production Company Limited, was evaluated for acute and repeated dose toxicity in mice and rabbits, respectively. The acute toxicity results indicated that LD_{50} of “Đại tràng Tam Bình” in mice according to the method of Behrens is (7.197 ± 0.313) g/kg body weight for single dose oral administration (equivalent to 58.5 capsules/50 kg body weight human/day). In the repeated- dose toxicity study, rabbits were administrated “Đại tràng Tam Bình” with the doses of 0.378 capsules and 1.133 capsule /kg once daily for 28 days (equivalent to the dose using on human and the dose of 3 times more than one using on human). Blood sample were taken on day 0, day 14 and day 28 of experiment for hematological, biochemical exams. Liver and kidney samples were taken on day 28 for histopathological determinations. The repeated dose toxicity results revealed that there were no significant differences in hematological and serum biochemical values between control and treatment groups. Furthermore, no histopathological changes in the liver and kidney of rabbits treated with “Đại tràng Tam Bình” were observed.

(Ngày nhận bài: 29/11/2017 ; Ngày phản biện: 14/3/2018 ; Ngày duyệt đăng: 15/6/2018)

ĐÁNH GIÁ CHẤT LƯỢNG VÀ NGHIÊN CỨU ĐỘ ỔN ĐỊNH CỦA NGUYÊN LIỆU GLIPIZID TỔNG HỢP TẠI VIỆT NAM

BÙI THỊ THỜI

PHẠM THỊ KIỀU DUNG, HÀ THỊ THU THỦY,
TRẦN THỊ BÍCH VÂN

Viện Hóa học Công nghiệp Việt Nam

Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương

Từ khóa: Glipizid, đái tháo đường, độ ổn định, lão hóa cấp tốc

1. Đặt vấn đề

Bệnh đái tháo đường được cho là một trong 10 nguyên nhân hàng đầu gây tử vong ở hầu hết các quốc gia trên thế giới. Trong các thuốc được kê đơn điều trị bệnh đái tháo đường ở Việt Nam, glipizid thuộc nhóm thuốc sulphonylurea thế hệ 2, có hoạt tính hạ đường huyết rất tốt và được kê đơn rất nhiều trong điều trị bệnh đái tháo đường typ 2. Hiện chưa có công bố nào nghiên cứu sản xuất hoạt chất này ở Việt Nam.

Viện Hóa học Công nghiệp Việt Nam đã nghiên cứu tổng hợp glipizid làm thuốc điều trị bệnh đái tháo đường typ 2. Để nguyên liệu này được đưa vào sản xuất nhằm tạo ra các dạng bào chế thích hợp, có kết quả điều trị và an toàn thì chất lượng và độ ổn định của nguyên liệu là vấn đề được quan tâm hàng đầu. Vì vậy chúng tôi đã tiến hành kiểm tra chất lượng và thử độ ổn định của nguyên liệu glipizid do Viện Hóa học Công nghiệp Việt Nam tổng hợp theo Dược điển Mỹ 40.

Trong phạm vi bài viết này, chúng tôi giới thiệu kết quả kiểm tra chất lượng và kết quả thử độ ổn định của nguyên liệu glipizid do Viện Hóa học Công nghiệp Việt Nam tổng hợp.

2. Thực nghiệm

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

2.1.1. Thiết bị, dụng cụ

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

- Máy sắc ký lỏng hiệu năng cao Agilent 1200;
- Cân phân tích Mettler Toledo MS105 độ chính xác 0,01 mg;
- Bộ màng lọc, đầu lọc đường kính lỗ lọc 0,45 μm ;
- Bình định mức, pipet, cốc, chén sứ, dụng cụ thủy tinh đạt tiêu chuẩn dùng cho phòng thí nghiệm phân tích;
- Tủ sấy;
- Tủ vi khí hậu.

2.1.2. Hóa chất, chất chuẩn

- Chất chuẩn:
 - + Glipizid (VKNTTW, số lô: 0107207, hàm lượng: 99,17% (khan), độ ẩm: 0,10%);
 - + Chuẩn tạp A: Chuẩn phòng thí nghiệm; Hàm lượng 100,0%;
- Acetonitril, methanol loại dùng cho HPLC;
- Kali bromid tinh khiết cho hồng ngoại;
- N-butylamin, acid phosphoric, acid sulphuric loại PA.

2.2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Đối tượng nghiên cứu

Nguyên liệu glipizid được tổng hợp tại Viện Hóa học Công nghiệp Việt Nam.

Số lô: 01, 02

2.2.2. Phương pháp nghiên cứu.

2.2.2.1. Kiểm tra chất lượng [4]

Mẫu thử được đánh giá theo USP 40, chuyên luận glipizid với các chỉ tiêu:

- *Tính chất:* Bột thuốc màu trắng.
- *Định tính:*
 - + Phổ hồng ngoại của chế phẩm phải phù hợp với phổ hồng ngoại của glipizid chuẩn.
 - + Phổ tử ngoại của dung dịch chế phẩm phải phù hợp với phổ tử ngoại của dung dịch glipizid chuẩn.
 - + Dung dịch thử (phần định lượng) phải cho pic chính có thời gian lưu tương ứng với thời gian lưu của pic chính trên sắc ký đồ của dung dịch glipizid chuẩn.
- *Cẩn còn lại sau nung:* Không quá 0,4%.
- *Mất khối lượng do làm khô:* Không quá 1,0%. Sấy dưới áp suất giảm ở 100°C trong 3 giờ, dùng 1,000 g chế phẩm.
- *Tạp chất liên quan (test 1):* Phương pháp HPLC Từng tạp đơn: Không quá 0,5%
- *Định lượng:* Phương pháp HPLC Chế phẩm phải chứa từ 98,0% đến 102,0% ($\text{C}_{21}\text{H}_{27}\text{N}_5\text{O}_4\text{S}$) tính theo chế phẩm đã làm khô.

2.2.2.2. Thử độ ổn định [1],[2],[3]

- Điều kiện bảo quản: Điều kiện lão hóa cấp tốc (nhiệt độ $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ và độ ẩm tương đối $75\% \pm 5\%$) trong tủ vi khí hậu.

- Định kỳ đánh giá chất lượng: Lấy mẫu đánh giá tại các thời điểm 0, 3, 6 tháng.

- Các chỉ tiêu đánh giá: Tính chất, định tính (phương pháp HPLC), mất khối lượng do làm khô, tạp chất liên quan, định lượng (thực hiện với số lô 01).

- Tuổi thọ dự đoán của mẫu nghiên cứu ở 20°C được tính theo công thức sau:

$$C = K.C_{tn} + C_o$$

Trong đó:

C = Tuổi thọ của thuốc (tháng).

C_{tn} = Tuổi thọ thực nghiệm của mẫu khi bảo quản ở nhiệt độ t (tháng).

C_o = Khoảng thời gian từ ngày xuất xưởng đến ngày bắt đầu bảo quản thực nghiệm (tháng).

$K = 4$ (với nhiệt độ bảo quản thực nghiệm là 40°C và nhiệt độ bảo quản thường là 20°C).

3. Kết quả và bàn luận

3.1. Kiểm tra chất lượng

Bảng 1. Kết quả kiểm tra chất lượng nguyên liệu glipizid

Yêu cầu	Kết quả	
	Lô 01	Lô 02
Tính chất: Bột thuốc màu trắng	Đạt (Bột thuốc màu trắng)	Đạt (Bột thuốc màu trắng)
Định tính: - Phổ hồng ngoại của chế phẩm phải phù hợp với phổ hồng ngoại của glipizid chuẩn. - Phổ tử ngoại của dung dịch chế phẩm phải phù hợp với phổ tử ngoại của dung dịch glipizid chuẩn. - Dung dịch thử (phần định lượng) phải cho pic chính có thời gian lưu tương ứng với thời gian lưu của pic chính trên sắc ký đồ của dung dịch chuẩn.	Đúng Đúng Đúng	Đúng Đúng Đúng
Cặn còn lại sau nung: Không quá 0,4%	Đạt (0,0%)	Đạt (0,0%)
Mất khối lượng do làm khô: Không quá 1,0%	Đạt (0,01%)	Đạt (0,01%)
Tạp chất liên quan: Từng tạp đơn: Không quá 0,5%	Đạt (Tạp lớn nhất 0,21%)	Đạt (Tạp lớn nhất 0,25%)
Định lượng: Từ 98,0% đến 102,0% tính theo chế phẩm đã làm khô.	Đạt 98,45%	Đạt 98,54%

Kết quả trên cho thấy lô nguyên liệu glipizid do Viện Hóa học Công nghiệp Việt Nam tổng hợp đạt yêu cầu chất lượng các chỉ tiêu đã thử theo USP 40.

3.2. Thử độ ổn định

Kết quả theo dõi độ ổn định cho thấy, sau 06 tháng theo dõi ở điều kiện lão hóa cấp tốc, các chỉ tiêu: Tính chất, mất khối lượng do làm khô, tạp chất liên quan và định lượng của lô sản phẩm tổng hợp được gần như không thay đổi so với ban đầu và vẫn đạt theo yêu cầu của USP 40.

Dựa theo công thức tính tuổi thọ dự đoán của mẫu nghiên cứu, với $C_o = 0$, và trên cơ sở tuổi thọ của glipizid của nước ngoài, chúng tôi tính được tuổi thọ (hạn dùng) dự đoán của sản phẩm là 24 tháng ở điều kiện thường (nhiệt độ 20°C và độ ẩm tương đối 75%).

Bảng 2. Kết quả theo dõi độ ổn định của nguyên liệu glipizid tổng hợp được (lô 01)

Yêu cầu	Thời gian bảo quản (tháng)		
	0	3	6
Tính chất: Bột thuốc màu trắng	Đạt (Bột thuốc màu trắng)	Đạt (Bột thuốc màu trắng)	Đạt (Bột thuốc màu trắng)
Định tính: Dương tính	Đúng	Đúng	Đúng
Mất khối lượng do làm khô: Không quá 1,0%	Đạt (0,01%)	Đạt (0,01%)	Đạt (0,01%)
Tạp chất liên quan: Từng tạp đơn: Không quá 0,5%	Đạt (0,18%; 0,03%; 0,21%)	Đạt (0,17%; 0,03%; 0,22%)	Đạt (0,17%; 0,04%; 0,22%)
Định lượng: 98,0% đến 102,0% (C ₂₁ H ₂₇ N ₅ O ₄ S) tính theo chế phẩm đã làm khô.	Đạt (98,45%)	Đạt (98,53%)	Đạt (98,37%)

4. Kết luận

Kết quả đánh giá chất lượng và nghiên cứu độ ổn định trong điều kiện lão hóa cấp tốc (nhiệt độ 40°C ± 2°C và độ ẩm tương đối 75% ± 5%) của nguyên liệu glipizid được tổng hợp tại Viện Hóa học Công nghiệp Việt Nam cho thấy chất lượng của lô nguyên liệu đạt yêu cầu theo USP 40, sản phẩm ổn định sau 6 tháng bảo quản và theo dõi ở điều kiện lão hóa cấp tốc. Tuổi thọ (hạn dùng) dự kiến của nguyên liệu glipizid là 24 tháng ở điều kiện bảo quản thường (nhiệt độ 20°C và độ ẩm tương đối 75%).

Tài liệu tham khảo

1. Bộ hồ sơ kỹ thuật chung ASEAN (ACTD) và các hướng dẫn kỹ thuật trong hồ sơ đăng ký thuốc (2014).
2. Trịnh Văn Lầu (2002), *Phương pháp nghiên cứu độ ổn định của thuốc*.
3. Dhara K. Rajjada, Saranjit Singh, and Arvind K. Bansal (Mar 2010), "Influence of Microenvironment pH, Humidity, and Temperature on the Stability of Polymorphic and Amorphous Forms of Clopidogrel Bisulfate", *AAPS PharmSciTech*, 11(1), pp.197–203.
4. USP 40 (2017).
5. <http://www.thuocbietduoc.com.vn/thuoc/thuoc-goc209.aspx>.

SUMMARY

The quality of glipizide synthesized at Vietnam Institute of Industrial Chemistry was evaluated based on USP 40. The stability of glipizide also was studied in accelerated conditions (Temp. 40°C ± 2°C; RH 75% ± 5%). The results obtained showed that the sample met the requirements of USP 40 and was stable at least 06 months in accelerated conditions.

(Ngày nhận bài: 31/7/2018 ; Ngày phản biện: 18/8/2018 ; Ngày duyệt đăng: 24/9/2018)

THÔNG TIN KHOA HỌC - TIN TỨC

THÔNG TIN DƯỢC ĐIỂN VIỆT NAM V

Thông báo về việc thay đổi cách chuẩn bị dung dịch thử trong phép thử định tính B, chuyên luận Ngưu tất (Rễ) - *Radix Achyranthis bidentatae*

Trong quá trình áp dụng Dược điển Việt Nam để kiểm tra chất lượng dược liệu Ngưu tất, Khoa Kiểm nghiệm Đông dược - Dược liệu, Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương đã phát hiện thấy có những mẫu đáp ứng, có những mẫu không đáp ứng phép thử Định tính B. Phép thử Định tính B áp dụng phương pháp sắc ký lớp

mỏng, phát hiện acid oleanolic chiết được trong dược liệu Ngưu tất, so sánh với dung dịch chuẩn acid oleanolic. Tuy nhiên, khi thay đổi phương pháp chuẩn bị mẫu theo Tiêu chuẩn dược liệu của Hongkong (HKCMMS) thì các mẫu đều đáp ứng, tức là trên sắc ký đồ của dung dịch thử đều xuất hiện vết của acid oleanolic.

Sau khi nhận được báo cáo về vấn đề này, Ban Dược liệu – Đông dược đã xem xét và nhận định, quy trình chuẩn bị mẫu của Dược điển Việt Nam chưa được tối ưu, điều kiện chiết chưa chiết được các chất dạng liên hợp với acid oleanolic từ các mẫu Ngưu tất khác nhau. Vì vậy, để tránh khó khăn khi kết luận về kết quả thử nghiệm trong thời gian chờ đợi khảo sát thêm để sửa đổi phép thử cho phù hợp, Hội đồng Dược điển Việt Nam xin thông báo thay đổi cách chuẩn bị dung dịch thử đối với phép thử Định tính B của chuyên luận Ngưu tất trong Dược điển Việt Nam V như sau:

“Dung dịch thử: Cân 1 g bột dược liệu, thêm 30 ml ethanol 75 % (TT) và 3 ml acid hydrochloric (TT),

đun hồi lưu trong 1,5 h. Để nguội, lọc, cô dịch lọc tới cạn dưới áp suất giảm. Dùng 20 ml nước để hòa tan cặn và chuyển sang bình gạn, chiết bằng 100 ml dicloromethan (TT). Gạn lấy dịch chiết dicloromethan, cô cạn dưới áp suất giảm. Hòa tan cặn trong 1 ml methanol (TT) thu được dung dịch chấm sắc ký”.

Hội đồng Dược điển Việt Nam rất mong có được các kết quả phản hồi, góp ý để hoàn thiện chuyên luận này, các thông tin xin gửi về Trung tâm Dược điển - Dược thư Việt Nam, Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương, 48 Hai Bà Trưng – Hà Nội, điện thoại: 02438256905. Xin trân trọng cảm ơn.

Đính chính Dược điển Việt Nam V

Trang	Cột	Dòng	Đã in	Sửa lại
xvi		15 ↑	Bản bổ sung Dược điển Việt Nam V	Bản bổ sung Dược điển Việt Nam IV
xvi		10 ↑	quản ký	quản lý
156	2	9 ↑	Không ít hơn 75 %	Không ít hơn 75 % (Q)
264	2	12, 13 ↑	ở hai bước sóng cực đại	ở bước sóng cực đại
		9 ↑	hiệu số độ hấp thụ ở 2 bước sóng cực đại	hiệu số độ hấp thụ ở hai bước sóng
281	1	16, 17 ↓	<i>Mất chữ do in</i>	<i>dung dịch natri pentansulfonat monohydrat 0,096 % (TT) đã được điều chỉnh đến pH 2,5 bằng acid phosphoric (TT).</i>
430	1	9 ↓	Thêm 200 ml acetonitril (TT) và trộn đều.	Thêm 300 ml acetonitril (TT) và trộn đều.
431	1	14 ↑	Thêm 200 ml acetonitril (TT) và trộn đều.	Thêm 300 ml acetonitril (TT) và trộn đều.
531	1	19 ↓	45 h	45 min
819	2	23 ↑	Quinin bisulfat.	Quinin hydroclorid.
820	2	6 ↓	bisulfat”.	hydroclorid”.
823	2	5 ↑	bisulfat”.	hydroclorid”.
1144	1	4 ↓	mắt rây 3,15 mm	mắt rây 0,355 mm
1220	1	17, 18 ↓	đường kính 2 cm đến 0,5 cm	đường kính 0,2 cm đến 0,5 cm
1242	1	24 ↑	Thêm 25 ml nước bão hòa n-butanol	Thêm 25 ml n-butanol bão hòa nước
1301	2	6, 7, 8 ↓	Không ít hơn 20,0 % tính theo dược liệu khô kiệt. Tiến hành theo phương pháp chiết nóng (Phụ lục 12.10). Dùng ethanol (TT) làm dung môi.	Không dưới 20,0 % chất chiết được trong nước và không dưới 10 % chất chiết được trong ethanol (TT) tính theo dược liệu khô kiệt. Tiến hành theo phương pháp chiết nóng (Phụ lục 12.10).
1322	2	12 ↑	<i>Herba Loranthe Gracifolii</i>	<i>Herba Loranthe paracitici</i>
PL-300	1	9 ↑	Phép thử này không áp dụng được đối với chế phẩm thuốc có thành phần chính là vi sinh vật sống	Bỏ câu này

MỤC LỤC

Trang

● Nghiên cứu khoa học	
- Định lượng đồng thời Mesna và Benzyl alcol trong chế phẩm thuốc tiêm bằng phương pháp HPLC với detector DAD. <i>LÊ THỊ THIÊN HUƠNG, TRẦN THÚY HẠNH, ĐÀO NGUYỆT SƯƠNG HUYỀN, NGUYỄN VĂN HÂN</i>	1
- Định lượng đồng thời Kali sorbat, Methylparaben và Propylparaben trong dung dịch uống Ifsan bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao. <i>LÊ THỊ QUỲNH NGA, TRẦN THỊ HỒNG ANH</i>	7
- Xây dựng và thẩm định phương pháp phân tích Levetiracetam trong huyết tương người bằng sắc ký lỏng hiệu năng cao. <i>CAO NGỌC CƯỜNG, TRẦN HOÀNG, TẠ MẠNH HÙNG</i>	13
- Nghiên cứu phân lập Ginsenosid Rg1 và Ginsenosid Rb1 từ saponin toàn phần của Tam thất để làm chất chuẩn. <i>NGUYỄN THỊ LAN PHƯƠNG, ĐỖ THỊ BÍCH THUẬN, NGUYỄN VIỆT THÚY, TRẦN THỊ THU TRANG, NGHIÊM THỊ MAI</i>	18
- Nghiên cứu tinh chế Ginsenosid Rg1 từ cấn thu được sau phân lập saponin toàn phần của Tam thất để làm chất chuẩn. <i>NGUYỄN THỊ LAN PHƯƠNG, NGUYỄN VIỆT THÚY, NGHIÊM THỊ MAI, NGUYỄN TUYẾT NHUNG</i>	20
- Đánh giá độc tính cấp và bán trường diễn của viên Đại tràng Tâm Bình trên động vật thí nghiệm. <i>NGUYỄN THỊ HẰNG, NGUYỄN THỊ LIÊN, ĐOÀN CAO SƠN</i>	23
- Đánh giá chất lượng và nghiên cứu độ ổn định của nguyên liệu Glipizid tổng hợp tại Việt Nam. <i>PHẠM THỊ KIỀU DUNG, HÀ THỊ THU THỦY, TRẦN THỊ BÍCH VÂN, BÙI THỊ THỜI</i>	28
● Thông tin khoa học - Tin tức	
- Thông tin Dược điển Việt Nam V. <i>TRUNG TÂM DƯỢC ĐIỂN - DƯỢC THU VIỆT NAM</i>	30

CONTENTS

Page

● Scientific researches	
- Simultaneous determination of Mesna and Benzyl alcohol in injection preparations by HPLC method with DAD detector. <i>LÊ THỊ THIÊN HUƠNG, TRẦN THÚY HẠNH, ĐÀO NGUYỆT SƯƠNG HUYỀN, NGUYỄN VĂN HÂN</i>	1
- Simultaneous assay of Potassium sorbate, Methylparaben and Propylparaben in Ifsan oral solution by High Performance Liquid Chromatography. <i>LÊ THỊ QUỲNH NGA, TRẦN THỊ HỒNG ANH</i>	7
- Development and validation of HPLC method for the analysis of Levetiracetam in human plasma. <i>CAO NGỌC CƯỜNG, TRẦN HOÀNG, TẠ MẠNH HÙNG</i>	13
- Study on isolation of Ginsenoside Rg1 and Ginsenoside Rb1 from total saponins of the <i>Panax notogingseng</i> as a standard substance. <i>NGUYỄN THỊ LAN PHƯƠNG, ĐỖ THỊ BÍCH THUẬN, NGUYỄN VIỆT THÚY, TRẦN THỊ THU TRANG, NGHIÊM THỊ MAI</i>	18
- Study on purification of Ginsenoside Rg1 from the residue after isolation of total saponins of the <i>Panax notogingseng</i> to as a standard substance. <i>NGUYỄN THỊ LAN PHƯƠNG, NGUYỄN VIỆT THÚY, NGHIÊM THỊ MAI, NGUYỄN TUYẾT NHUNG</i>	20
- Evaluation of acute and repeated dose toxicity of “Viên Đại tràng Tâm Bình” on experimental animals. <i>NGUYỄN THỊ HẰNG, NGUYỄN THỊ LIÊN, ĐOÀN CAO SƠN</i>	23
- Evaluation of the quality and stability study of the Glipizide material is synthesized in Vietnam. <i>PHẠM THỊ KIỀU DUNG, HÀ THỊ THU THỦY, TRẦN THỊ BÍCH VÂN, BÙI THỊ THỜI</i>	28
● Technical information - News	
- Information Vietnamese Pharmacopoeia V. <i>VIETNAMESE PHARMACOPOEIA AND FORMULARY CENTER</i>	30