

NGHIÊN CỨU ĐỊNH TÍNH, ĐỊNH LƯỢNG ĐỒNG THỜI 12 GLUCOCORTICOID TRONG KEM BÔI DA MỸ PHẨM BẰNG PHƯƠNG PHÁP HPLC

THÁI NGUYỄN HÙNG THU
Trường Đại học Dược Hà Nội

LÊ THỊ HUỠNG HOA, HOÀNG THANH TÂM, ĐOÀN CAO SƠN
Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương

Từ khóa: HPLC, định lượng đồng thời, Glucocorticoid, kem bôi da mỹ phẩm.

1. Đặt vấn đề

Theo “Hiệp định hòa hợp ASEAN trong quản lý mỹ phẩm” và Thông tư số 06/2011/TT-BYT ngày 25 tháng 11 năm 2011 của Bộ Y tế về quản lý mỹ phẩm, glucocorticoid là một trong các nhóm chất bị cấm sử dụng trong Mỹ phẩm. Nhóm chất này có nhiều tác dụng phụ khi dùng tại chỗ như: teo da, xơ cứng bì, viêm da ửng đỏ, mụn trứng cá hoặc bội nhiễm nấm, vi khuẩn và virus, chậm liền sẹo, đục thủy tinh thể hoặc tăng nhãn áp [1],[2],[4]. Tuy nhiên, do glucocorticoid có tác dụng chống viêm rất tốt, giữ nước làm cho da láng mịn [1],[2],[4] nên dễ bị lợi dụng cho vào các sản phẩm bôi da để chống viêm, trị nám, mụn, làm trắng. Glucocorticoid bao gồm nhiều chất khác nhau, nếu kiểm tra riêng từng thành phần sẽ mất rất nhiều thời gian và công sức. Vì vậy chúng tôi xin được giới thiệu kết quả nghiên cứu xây dựng phương pháp định tính, định lượng đồng thời 12 glucocorticoid thông thường bị cấm sử dụng trong mỹ phẩm.

2. Thực nghiệm

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

2.1.1. Hóa chất, chất chuẩn

- Chất đối chiếu của Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương: Prednison (SKS: WS.0107235; HL = 98,6%; ẩm = 0,15%); Dexamethason (SKS: 0197025, HL = 99,61%; ẩm = 0,13%); Triamcinolon acetonid (Chất chuẩn Asean, Số lô: M 191077a; HL = 99,11%; ẩm = 1,84%); Flucinolol acetonid (SKS: 0199049; HL = 97,2%; ẩm = 0,6%); Prednison acetat (SKS: 0102149; HL = 99,64%; ẩm = 0,06%); Hydrocortison acetat (SKS: 0198038; HL = 99,5%; ẩm = 0,1%); Cortison acetat (SKS: 0103092; HL = 100,01%; ẩm = 0,05%); Dexamethason acetat (SKS: 0200014; HL = 99,6%); Betamethason dipropionat (HL = 101,2%, Chuẩn PTN); Betamethason valerat (SKS: 0103125; HL = 100,43%; ẩm = 0,14%); Clobetasol propionat (SKS: 0103170; HL = 99,4%, ẩm = 0,12%); Mometason furoat (HL = 100,0%, Chuẩn PTN).

- Các hóa chất, dung môi thuộc loại dùng cho HPLC và tinh khiết phân tích.

2.1.2. Thiết bị, dụng cụ

Các thiết bị được hiệu chuẩn đạt yêu cầu của phòng thí nghiệm theo ISO/IEC 17025.

- Máy sắc ký lỏng hiệu năng cao Shimadzu trang bị detector PDA.

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

- Dụng cụ: Các bình định mức, pipet chính xác, phễu lọc thủy tinh...

2.2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Đối tượng nghiên cứu

- *Mẫu dùng trong nghiên cứu để xây dựng phương pháp:* Kem dưỡng trắng da Impress IC của Kanebo Nhật Bản đã được kiểm tra không có glucocorticoid được sử dụng như là mẫu placebo.

- *Mẫu kiểm tra:*

Cream nám one today (43L 381), Cream nám shui Jing bai (43L 382), Kem dưỡng trắng da làm mờ vết thâm Hazelin (43L 383), Kem nám Cô Tiên (Day whitening & spot removing set) (43L 384), Cream ngừa mụn 3 tác dụng One Today (43L 390), Cream dưỡng trắng da mặt One Today (43L 391), Kem mắt Whoo (43L 398), Nước hoa hồng In Yang Balancer (43L 397), Tinh chất dưỡng da Qi & Jin Essence (43L 396), Sữa dưỡng da In Yang Lotion (43L 395), Kem dưỡng da đêm Whoo (43L 399).

2.2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.2.1. Điều kiện sắc ký

- Cột: Phenomenex Luna C18, (250 x 4,6 mm), 5 µm;

- Pha động: Acetonitril - nước (47 : 53);

- Gradient tốc độ dòng: Từ 0 đến 12 phút tốc độ 1,0 ml/ phút; từ 13 phút đến 25 phút tốc độ 2,0 ml/ phút; từ 26 phút quay về tốc độ 1,0 ml/ phút;

- Bước sóng phát hiện: 240 nm;

- Thể tích tiêm: 5 µl;

- Thời gian phân tích: 60 phút.

2.2.2.2. Phương pháp xử lý mẫu

- *Mẫu chuẩn:*

+ *Các dung dịch chuẩn gốc:* Cân chính xác khoảng 25 mg từng chất chuẩn glucocorticoid, hòa tan riêng biệt bằng methanol và thêm methanol vừa đủ 25,0 ml.

+ *Dung dịch chuẩn hỗn hợp 12 thành phần*: Hút 1,0 ml mỗi dung dịch chuẩn gốc vào bình định mức 100 ml thêm pha động vừa đủ đến vạch lắc đều. Lọc qua màng lọc 0,45 µm.

- *Mẫu thử*: Cân khoảng 0,2 g chế phẩm vào cốc có mỏ 100 ml, thêm 50 ml hỗn hợp dicloromethan - methanol (9 : 1), khuấy kỹ và đặt trên cách thủy ẩm, làm nguội trong nước đá 1 giờ, sau đó lọc qua giấy lọc và bốc hơi cách thủy tới khô. Hòa lại cân trong 25,0 ml hỗn hợp Acetonitril – methanol – nước (20 : 30 : 30). Lọc qua màng lọc 0,45 µm.

- *Mẫu tự tạo*: Cân khoảng 0,2 g mẫu placebo vào cốc có mỏ 100 ml, thêm 4,0 ml chuẩn hỗn hợp 12 thành phần, trộn đều, thêm 50 ml hỗn hợp dicloromethan - methanol (9 : 1), khuấy kỹ và đặt trên cách thủy ẩm, làm nguội trong nước đá 1 giờ, sau đó lọc qua giấy lọc và bốc hơi cách thủy tới khô. Hòa lại cân trong 25,0 ml hỗn hợp acetonitril – methanol – nước (20 : 30 : 30). Lọc qua màng lọc 0,45 µm.

2.2.2.3. Thẩm định phương pháp

Thẩm định phương pháp phân tích với các chỉ tiêu: Tính đặc hiệu, độ tuyến tính, độ đúng, độ chính xác, giới hạn phát hiện, giới hạn định lượng [3],[5],[6].

2.2.2.4. Ứng dụng của phương pháp

- *Định tính*: dựa vào hai tiêu chí

+ Thời gian lưu: So sánh thời gian lưu của từng pic thu được từ dung dịch thử với các pic thu được từ dung dịch chuẩn hỗn hợp 12 thành phần.

+ Phổ UV-VIS: Chồng phổ UV-VIS của pic nghi ngờ trên sắc ký đồ thu được từ dung dịch thử và pic tương ứng thu được từ dung dịch chuẩn: 2 phổ phải tương ứng với nhau (đánh giá bằng hệ số chồng phổ match phải không nhỏ hơn 0,95).

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

3. Kết quả và bàn luận

3.1. Tính thích hợp của hệ thống sắc ký

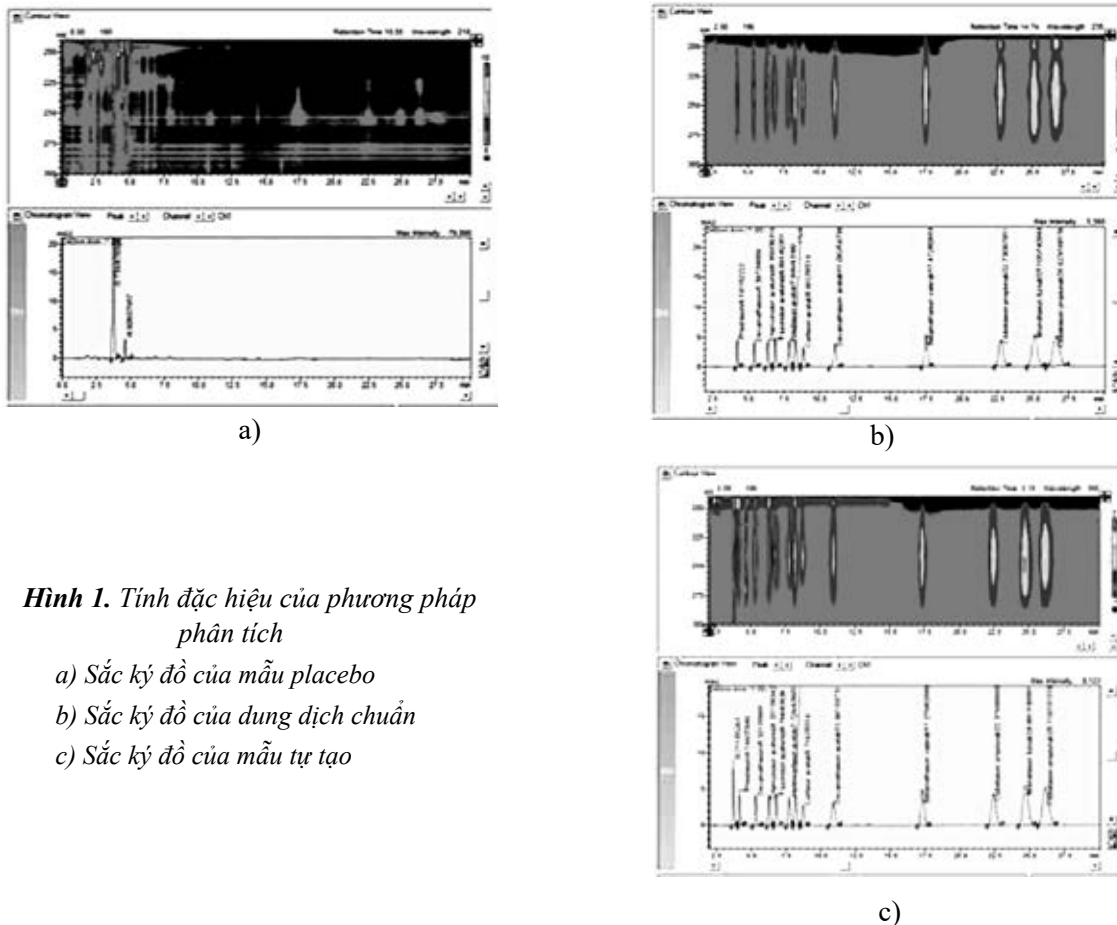
Tiến hành tiêm lặp lại 6 lần dung dịch chuẩn hỗn hợp 12 thành phần có nồng độ khoảng 10 µg/ml vào hệ thống sắc ký, kết quả trung bình của một số đại lượng thu được như ở Bảng 1.

Bảng 1. Kết quả kiểm tra tính thích hợp của hệ thống sắc ký

Tên pic	RSD thời gian lưu (%)	RSD diện tích pic (%)	Số đĩa lý thuyết TB	Hệ số kéo đuôi TB	Độ phân giải TB
Prednison	0,15	0,36	8041,21	1,42	-
Dexamethason	0,17	0,51	9997,27	1,23	5,96
Triamcinolon acetamid	0,19	0,37	11295,22	1,26	4,20
Flucinolol acetamid	0,23	0,45	12016,24	1,23	2,20
Prednison acetat	0,23	0,36	12957,29	1,23	3,64
Hydrocortison acetat	0,26	0,84	13462,55	1,20	1,64
Cortison acetat	0,27	0,75	13970,62	1,20	1,89
Dexamethason acetat	0,32	0,37	14215,16	1,04	6,63
Betamethason valerat	0,26	0,11	30962,00	1,17	16,74

Kết quả cho thấy hệ thống sắc ký đáp ứng yêu cầu phân tích cho cả 12 chất glucocorticoid. Cụ thể là: độ lặp lại tốt (RSD của thời gian lưu nhỏ hơn 0,4% và RSD của diện tích pic nhỏ hơn 1,4%); số đĩa lý thuyết lớn hơn 8000; hệ số kéo đuôi nhỏ hơn 1,4; độ phân giải lớn hơn 1,6.

3.2. Tính đặc hiệu



Hình 1. Tính đặc hiệu của phương pháp phân tích

- a) Sắc ký đồ của mẫu placebo
- b) Sắc ký đồ của dung dịch chuẩn
- c) Sắc ký đồ của mẫu tự tạo

Tiến hành tiêm các dung dịch sau vào hệ thống sắc ký đã lựa chọn:

- *Dung dịch mẫu placebo:* Cân chính xác khoảng 0,2 g mẫu placebo (Mẫu Impress IC white emulsion II, kanebo) thêm 50 ml hỗn hợp dicloromethan - methanol (9 : 1) và xử lý tiếp như mẫu thử ở mục 2.2.2.2.
- *Dung dịch thử, dung dịch chuẩn:* Được chuẩn bị như ở mục 2.2.2.2.

Kết quả phân tích cho thấy: Trên sắc ký đồ mẫu placebo không xuất hiện pic ở thời gian lưu tương ứng với thời gian lưu của bất kỳ chất nào trong số 12 glucocorticoid nghiên cứu. Trên sắc ký đồ của dung dịch mẫu tự tạo cho 12 pic có thời gian lưu tương ứng với thời gian lưu của 12 pic chính thu được từ sắc ký đồ của dung dịch chuẩn hỗn hợp và được tách ra khỏi pic có trong nền mẫu nghiên cứu. Kết quả được thể hiện ở Hình 1.

3.3. Độ tuyến tính

Pha một dung dịch hỗn hợp 12 chất chuẩn glucocorticoid trong pha động để thu được dung dịch có nồng độ như trong Bảng 2, tiến hành sắc ký theo điều kiện như trên. Kết quả được thể hiện ở Bảng 3.

Bảng 2. Nồng độ các chất chuẩn dùng khảo sát độ tuyến tính

Tên chất	Nồng độ gốc (µg/ml)	C1	C2	C3	C4	C5
Prednison	2	0,2	0,32	0,4	0,48	0,6
Dexamethason	3	0,3	0,48	0,6	0,72	0,9
Triamcinolon acetonid	5	0,5	0,80	1,0	1,20	1,5
Flucinolon acetonid	5	0,5	0,80	1,0	1,20	1,5
Prednison acetat	5	0,5	0,80	1,0	1,20	1,5
Hydrocortison acetat	5	0,5	0,80	1,0	1,20	1,5
Cortison acetat	4	0,4	0,64	0,8	0,96	1,2

Dexamethason acetat	6	0,6	0,96	1,2	1,44	1,8
Betamethason valerat	18	1,8	2,88	3,6	4,32	5,4
Clobetasol propionat	22	2,2	3,52	4,4	5,28	6,6
Mometason furoat	16	1,6	2,56	3,2	3,84	4,8
Betamethason dipropionat	40	4,0	6,40	8,0	9,60	12,0

Bảng 3. Kết quả khảo sát độ tuyến tính

Tên hợp chất nghiên cứu	Diện tích pic (mAU.s)				
	C1	C2	C3	C4	C5
Prednison	16884	26044	32442	38962	48559
Dexamethason	17301	27568	34745	42434	53076
Triamcinolon acetonid	20359	30908	38714	46146	57597
Flucinolol acetonid	22387	34175	42558	51093	64281
Prednison acetat	22677	34881	43475	52230	65227
Hydrocortison acetat	25191	38947	48804	58730	73224
Cortison acetat	18204	28165	35328	42606	52781
Dexamethason acetat	28289	43741	54805	65972	82276
Betamethason valerat	44272	64531	81282	97197	121592
Clobetasol propionat	50726	78688	98386	118244	146956
Mometason furoat	73326	115287	140770	169318	211231
Betamethason dipropionat	84444	130868	165190	197586	245900

Phương trình đường chuẩn và hệ số tương quan r với từng glucocorticoid xác định được như sau:

Prednison: $79401 x + 817,7$ ($r = 0,9999$)

Dexamethason: $59945 x - 941,9$ ($r = 0,9998$)

Triamcinolon acetonid: $37356 x + 1388,6$ ($r = 0,9998$)

Flucinolol acetonid: $41949 x + 949,5$ ($r = 0,9997$)

Prednison acetat: $42663 x + 1034,6$ ($r = 0,9999$)

Hydrocortison acetat: $48229 x + 749,7$ ($r = 0,9999$)

Cortison acetat: $43484 x + 629,4$ ($r = 0,9999$)

Dexamethason acetat: $45172 x + 810,2$ ($r = 0,9999$)

Betamethason valerat: $21644 x + 3855,5$ ($r = 0,9992$)

Clobetasol propionat: $21954 x + 2003,1$ ($r = 0,9999$)

Mometason furoat: $42973 x + 4471,4$ ($r = 0,9999$)

Betamethason dipropionat: $20274 x + 2605,2$ ($r = 0,9999$)

Kết quả cho thấy có sự tương quan tuyến tính chặt chẽ giữa diện tích pic và nồng độ của các glucocorticoid trong khoảng nồng độ khảo sát.

3.4. Độ chính xác của phương pháp

Cân 0,2 g mẫu placebo vào cốc có mỏ 100 ml, thêm 4,0 ml dung dịch chuẩn gốc có nồng độ như trong Bảng 2. Tiến hành theo mục 2.2.2.2 trên 6 mẫu tự tạo ở nồng độ 100% theo quy trình phân tích. Kết quả thu được thể hiện ở Bảng 4 và Bảng 5.

Bảng 4. Diện tích pic của các glucocorticoid thu được sau các lần thử nghiệm

Tên hợp chất nghiên cứu	Diện tích pic (mAU.s)					
	1	2	3	4	5	6
Prednison	34746	34900	35148	34908	34433	34660
Dexamethason	36632	36427	37320	36806	36488	36771
Triamcinolon acetonid	40469	40296	40551	40757	40707	40503
Flucinolol acetonid	44540	44807	44715	45184	45444	44823
Prednison acetat	44801	44343	44894	44856	44518	44608

Hydrocortison acetat	50114	49711	50510	50230	49865	50093
Cortison acetat	36111	36101	36632	36402	35887	36206
Dexamethason acetat	56392	56243	56403	56646	56239	56536
Betamethason valerat	83219	82856	83264	83911	82631	83405
Clobetasol propionat	101625	101024	101428	102056	101285	102207
Mometason furoat	150092	149105	150629	151198	148938	150619
Betamethason dipropionat	165420	164074	165811	166653	162992	164916

Bảng 5. Kết quả khảo sát độ chính xác của phương pháp

Tên hợp chất nghiên cứu	Hàm lượng (%)							
	1	2	3	4	5	6	TB	RSD
Prednison	102,0	102,5	103,2	102,5	101,1	101,7	102,2	0,7
Dexamethason	105,4	104,8	107,4	105,9	105,0	105,8	105,7	0,9
Triamcinolon acetonid	104,5	104,1	104,7	105,3	105,1	104,6	104,7	0,4
Flucinolol acetonid	104,7	105,3	105,1	106,2	106,8	105,3	105,5	0,7
Prednison acetat	103,1	102,0	103,3	103,2	102,4	102,6	102,7	0,5
Hydrocortison acetat	102,7	101,9	103,5	102,9	102,2	102,6	102,6	0,6
Cortison acetat	102,2	102,2	103,7	103,0	101,6	102,5	102,5	0,7
Dexamethason acetat	102,9	102,6	102,9	103,4	102,6	103,2	102,9	0,3
Betamethason valerat	102,4	101,9	102,4	103,2	101,7	102,6	102,4	0,5
Clobetasol propionat	103,3	102,7	103,1	103,7	102,9	103,9	103,3	0,4
Mometason furoat	106,6	105,9	107,0	107,4	105,8	107,0	106,6	0,6
Betamethason dipropionat	100,1	99,3	100,4	100,9	98,7	99,8	99,9	0,8

Kết quả cho thấy phương pháp có độ chính xác cao, giá trị RSD của hàm lượng các hợp chất nghiên cứu thu được nhỏ, nằm trong khoảng 0,3 - 0,9%.

3.5. Độ đúng

Chuẩn bị 9 mẫu tự tạo ở 3 mức nồng độ khoảng 50, 100 và 150% so với nồng độ các chất ở tại giới hạn định lượng, mỗi nồng độ làm 3 mẫu và xử lý mẫu phân tích theo mục 2.2.2.1 và mục 2.2.2.2. Lượng thêm với các glucocorticoid vào các mẫu ở các mức được trình bày trong Bảng 6. Tỷ lệ thu hồi của các glucocorticoid xác định được thể hiện ở Bảng 7.

Bảng 6. Lượng các glucocorticoid được thêm vào các mẫu thử độ đúng

Các hợp chất nghiên cứu	Lượng thêm vào (μg)		
	Mẫu 1-3	Mẫu 4-6	Mẫu 7-9
Prednison	4,2	8,4	12,6
Dexamethason	6	12	18
Triamcinolon acetonid	10	20	30
Flucinolol acetonid	10	20	30
Prednison acetat	10	20	30
Hydrocortison acetat	10	20	30
Cortison acetat	8	16	24
Dexamethason acetat	12	24	36
Betamethason valerat	36	72	108
Clobetasol propionat	44	88	132
Mometason furoat	32	64	96
Betamethason dipropionat	80	160	240

Bảng 7. Kết quả khảo sát độ đúng của phương pháp

Các hợp chất nghiên cứu	Tỷ lệ tìm lại (%)										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	min	max
Prednison	98,4	101,1	102,0	99,7	100,9	101,4	100,2	97,7	100,0	97,7	102,0
Dexamethason	100,7	99,6	99,4	103,3	105,0	104,1	104,0	101,3	103,4	99,4	104,0
Triamcinolon acetamid	98,9	101,5	102,2	101,6	104,1	102,9	102,7	99,9	102,3	98,9	102,7
Flucinolol acetamid	99,5	100,1	100,6	102,5	105,3	103,7	103,6	101,3	103,8	99,5	105,3
Prednison acetat	96,5	99,6	99,5	100,8	101,5	102,3	100,9	99,5	100,5	96,5	101,5
Hydrocortison acetat	97,8	100,1	99,7	100,8	102,1	102,4	100,7	99,6	100,8	97,8	102,4
Cortison acetat	96,3	99,4	98,9	100,5	102,0	101,9	100,6	99,4	100,9	96,3	102,0
Dexamethason acetat	97,0	98,8	99,5	101,7	101,7	102,6	102,2	99,6	101,7	97,0	102,6
Betamethason valerat	97,5	99,0	101,0	101,0	101,5	102,5	101,0	99,2	100,3	97,5	102,5
Clobetasol propionat	95,8	99,0	99,8	101,3	102,3	103,0	102,0	100,3	101,0	95,8	103,0
Mometason furoat	96,2	100,1	100,2	104,1	105,5	106,6	102,4	100,6	101,8	96,2	106,6
Betamethason dipropionat	95,2	97,0	97,9	97,8	99,2	100,3	99,1	97,3	98,1	95,2	100,3

3.6. Giới hạn phát hiện (LOD) và giới hạn định lượng (LOQ)

Pha loãng dần dung dịch mẫu tự tạo có nồng độ các glucocorticoid khoảng 10 µg/ml đến nồng độ thấp nhất sao cho khi tiêm vào hệ thống sắc ký tín hiệu thu được lớn hơn khoảng 3 lần so với nhiễu đường nền, từ đó sẽ tính được giá trị LOD và LOQ (LOQ = 3,3 LOD). Kết quả xác định LOD và LOQ của các hợp chất nghiên cứu được thể hiện ở Bảng 8.

Bảng 8. Giới hạn phát hiện và giới hạn định lượng của các glucocorticoid

Hợp chất nghiên cứu	LOD (µg/ml)	LOQ (µg/ml)	Hợp chất nghiên cứu	LOD (µg/ml)	LOQ (µg/ml)
Prednison	0,10	0,30	Cortison acetat	0,20	0,60
Dexamethason	0,15	0,45	Dexamethason acetat	0,30	0,90
Triamcinolon acetamid	0,25	0,75	Betamethason valerat	0,90	2,70
Flucinolol acetamid	0,25	0,75	Clobetasol propionat	1,10	3,30
Prednison acetat	0,25	0,75	Mometason furoat	0,80	2,40
Hydrocortison acetat	0,25	0,75	Betamethason dipropionat	2,00	6,00

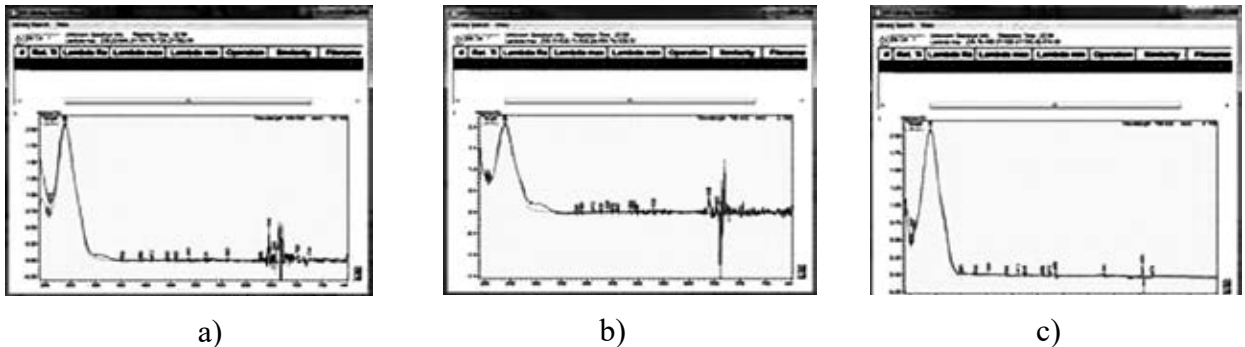
3.7. Áp dụng phương pháp phân tích trên một số mẫu mỹ phẩm

Áp dụng phương pháp phân tích để kiểm tra trên 11 mẫu mỹ phẩm bôi trên da, kết quả thể hiện ở Bảng 9.

Bảng 9. Kết quả kiểm tra các mẫu mỹ phẩm

STT	Tên mẫu	Số ĐKKN	Kết quả	Glucocorticoid phát hiện được	Hàm lượng trong mẫu µg/g)
1	Cream nám One today	43L 381	+	Clobetasol propionat	14,54
2	Cream nám shui Jing bai 43L382		-		
3	Kem dưỡng trắng da làm mờ vết thâm Hazelin	43L 383	-		
4	Kem nám Cô Tiên (Day whitening & spot removing set)	43L 384	-		
5	Cream ngừa mụn 3 tác dụng One Today	43L 390	+	Clobetasol propionat	9,13
6	Cream dưỡng trắng da mặt One Today	43L 391	+	Clobetasol propionat	13,03

7	<i>Kem mắt Whoo</i>	43L 398	-		
8	<i>Nước hoa hồng In Yang Balancer</i>	43L 397	-		
9	<i>Tinh chất dưỡng da Qi & Jin Essence</i>	43L 396	-		
10	<i>Sữa dưỡng da In Yang Lotion</i>	43L 395	-		
11	<i>Kem dưỡng da đêm Whoo</i>	43L 399	-		



Hình 2. Kết quả chồng phổ của pic nghi ngờ với phổ của clobetasol propionat
a) Mẫu Cream dưỡng trắng da mặt One Today; b) Mẫu Cream ngừa mụn 3 tác dụng One Today
c) Mẫu Cream nám One today

Kết quả cho thấy với các mẫu số 1, 5 và 6 cho pic có thời gian lưu tương ứng với pic clobetasol propionat của dung dịch chuẩn, chồng phổ với phổ chuẩn clobetasol propionat cho hệ số chồng phổ xấp xỉ bằng 1 (lần lượt là 0,9933; 0,9954 và 0,9968). Kết quả chồng phổ thể hiện ở Hình 2.

4. Kết luận

Phương pháp định lượng 12 glucocorticoid đã được thẩm định chặt chẽ về tính đặc hiệu, độ chính xác và độ đúng, LOD, LOQ. Kết quả thẩm định cho thấy phương pháp hoàn toàn phù hợp để định tính, định lượng glucocorticoid trong kem bôi da mỹ phẩm. Áp dụng phương pháp xây dựng được trên 11 mẫu mỹ phẩm nghi ngờ, phát hiện thấy 3 mẫu có chứa clobetasol propionat với hàm lượng khoảng 0,001% - 0,0015% (10 - 15 µg/g). Sự có mặt của clobetasol propionat trong mẫu là vi phạm quy định của Bộ Y tế Việt Nam cũng như “Hiệp định hòa hợp ASEAN trong quản lý mỹ phẩm” về các chất bị cấm sử dụng và gây nguy hại cho sức khỏe người dùng.

Tài liệu tham khảo

1. Bộ môn Hoá dược, Trường Đại học Dược Hà Nội (1993), *Hóa dược: Alcaloid, kháng sinh, vitamin, steroid*, Nhà xuất bản Y học, trang 191-237
2. Bộ Y tế (2006), *Dược lâm sàng*, Nhà xuất bản Y học, trang 205-220.
3. Tạ Mạnh Hùng, Đoàn cao Sơn (2012), “Hướng dẫn chung thẩm định qui trình phân tích bằng phương pháp HPLC”, *Tạp chí Kiểm nghiệm thuốc*, 10 (38), trang 1-8.
4. 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), Nhà xuất bản Y học, Hà Nội.
5. *Thuốc và biệt dược.com.vn*.
6. *The United States Pharmacopoeia* 38 (2015).

SUMMARY

A HPLC method was proposed to determine 12 Glucocorticoids in cosmetic. Glucocorticoids is extracted in a mixture of Dichloromethane and Methanol (9:1) and evaporated to dryness. Dissolved residue in a mixture of Acetonitrile - Methanol - Water (20:30:30) to concentration about 0.3 to 6 µg/ml. Pass a portion of the solution through a filter membrane pore size 0.45 µm, then determined by HPLC.

Chromatographic conditions are as follows: The liquid chromatograph is equipped with a 240 nm detector and a 250 x 4.6 mm column that contains 5 µm packing Octadecyl Silyl Silica gel, mobile phase is a mixture of Acetonitrile and Water (47:53) and gradient the flow rate about 1.0 ml/minute to 2.0 ml/minute, the time analysis 60 minutes, injection volume is 5 µl, temperature: ambient.

The method was validated about the specificity, linear range, precision, accuracy, LOD, LOQ, and validation results proved that this method was suitable for determination of 12 Glucocorticoids in cosmetic.

The method was applied to control 11 cosmetic cream samples. The result turned out that there were three samples which contained Clobetasol propionate (about 0.001 to 0.0015% or 10 to 15 µg/g). The presence of this substance was violated regulation of Ministry of Health, also Agreement on harmonize ASEAN Cosmetic and cause risks of toxicity for human health.

(Ngày nhận bài: 27/6/2017 ; Ngày phản biện: 22/8/2017 ; Ngày duyệt đăng: 26/12/2017)

PHƯƠNG PHÁP TỐI ƯU HÓA ĐIỀU KIỆN TẠO TẠP ENALAPRIL DIKETOPIPERAZIN TRONG XÁC ĐỊNH TẠP CHẤT LIÊN QUAN CỦA ENALAPRIL

LÊ THỊ QUỲNH NGA, TRẦN THỊ HỒNG ANH, NGUYỄN THU PHƯƠNG
Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương

Từ khóa: Enalapril, Enalapril Diketopiperazin, tạp chất liên quan, điều kiện tối ưu.

1. Đặt vấn đề

Trong thời gian gần đây, enalapril được sử dụng nhiều trong điều trị bệnh cao huyết áp. Việc xác định giới hạn các tạp chất phân hủy của enalapril trong quá trình phát triển sản phẩm và đăng ký lưu hành thuốc là rất cần thiết. Theo nghiên cứu độ ổn định của Al-Omaria và cộng sự [1] cho thấy bản thân enalapril maleat có độ ổn định cao với nhiệt độ nhưng khi có mặt của các tá dược thì trở nên không bền. Sản phẩm của quá trình phân hủy enalapril maleat chủ yếu là hai chất enalaprilat và enalapril diketopiperazin. Sau khi tham khảo một số quy trình xác định giới hạn tạp chất liên quan của enalapril maleat trong một số chuyên luận của các dược điển tham chiếu (USP 35, BP 2013, ĐĐVN IV) có thể thấy quy trình trong chuyên luận viên nén enalapril maleat của USP 35 là phù hợp với điều kiện thí nghiệm hiện tại, không yêu cầu phải có sẵn tạp chuẩn enalapril diketopiperazin, mà chuẩn này được tạo ra bằng phương pháp đun nóng enalapril maleat. Tuy nhiên, khi áp dụng tại các phòng thí nghiệm thì kết quả tạo tạp enalapril diketopiperazin không ổn định (có thể tạo ra lượng thấp hoặc có thể không tạo ra tạp cần thiết).

Do đó, chúng tôi thấy rằng cần tiến hành nghiên cứu khảo sát chi tiết các điều kiện về thời gian và nhiệt độ để đưa ra một số chú ý cần thiết để tạo ra được tạp enalapril diketopiperazin ổn định và chính xác. Đồng thời áp dụng điều kiện đã tối ưu để tiến hành thẩm định lại phương pháp xác định tạp chất liên quan trong viên nén enalapril maleat theo USP 35 trên viên nang cứng Lifelopin của Công ty Cổ phần Dược phẩm Trung ương 2.

2. Thực nghiệm

2.1. Thiết bị, dụng cụ, 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 sắc ký lỏng hiệu năng cao – Shimadzu LC 20A với detector UV;
- Cột RP8 Phenomenex (250 x 4,6 mm), 5 µm;
- Cân phân tích Mettler toledo AG 245 có độ chính xác 0,1 mg;
- Máy lắc siêu âm;

- Bộ lọc dùng cho sắc ký, các dụng cụ thủy tinh cần thiết cho quá trình thực nghiệm.

2.1.2. Hóa chất, dung môi, chất chuẩn

* **Chất chuẩn:**

- Enalapril maleat chuẩn của VKNTTW, số lô 0108237, hàm lượng 99,96% (khan), độ ẩm 0,12%;
- Enalaprilat chuẩn của USP, số lô 1235274, hàm lượng 99,86% (khan), xác định độ ẩm trước khi sử dụng.

* **Hóa chất thuốc thử**

- Acid phosphoric PA;
- Acetonitril HPLC;
- Natri dihydrophosphat PA.

2.2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Đối tượng nghiên cứu

- Mẫu thử Lifelopin (Lô: NP-070515, ngày SX: 07/05/2015).

Công thức điều chế cho 1 viên nang cứng: Enalapril maleat: 5 mg; tá dược: tinh bột mỳ, lactose, natri bicarbonat, magnesi stearat vừa đủ 1 viên.

- Mẫu placebo (lô: NP-070515, ngày SX: 07/05/2015) do Công ty Cổ phần Dược phẩm Trung ương 2 sản xuất.

2.2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.2.1. Khảo sát các điều kiện tối ưu tạo tạp enalapril diketopiperazin

* **Khảo sát phương pháp xử lý mẫu**

- **Dung dịch enalapril diketopiperazin:** Cân chính xác khoảng 20 mg enalapril maleat vào một cốc có mỏ để tạo thành một khối hình nón dưới đáy cốc. Đun nóng cốc trên bếp điện ở mức nhiệt độ khoảng 300°C (khoảng một nửa so với nhiệt độ tối đa) đến khi bột thuốc có hiện tượng chảy lỏng khoảng 20%, 40%, 60%, 80%, 100%, ngay lập tức lấy cốc ra khỏi bếp điện và để nguội. Thêm 50 ml acetonitril và siêu âm vài phút để hòa tan căn.

- **Dung dịch chuẩn enalaprilat:** Hòa tan enalaprilat trong nước để thu được dung dịch có nồng độ chính xác khoảng 0,4 mg/ml.

- **Dung dịch chuẩn:** Cân chính xác khoảng 20 mg enalapril maleat chuẩn vào bình định mức dung tích 100 ml. Thêm 0,5 ml dung dịch chuẩn enalaprilat và khoảng 50 ml dung dịch đệm pH 2,2, lắc để hòa

tan, siêu âm nếu cần. Pha loãng với dung dịch đệm pH 2,2 đến vạch, lắc đều. Dung dịch thu được có nồng độ 0,2 mg/ml enalapril và 0,002 mg/ml enalaprilat.

- *Dung dịch thử độ thích hợp của hệ thống:* Lấy 0,5 ml dung dịch enalapril diketopiperazin vào bình định mức dung tích 25 ml, thêm dung dịch chuẩn vừa đủ đến vạch, lắc đều.

- Tiến hành sắc ký với các dung dịch thử độ thích hợp của hệ thống với điều kiện sắc ký như mô tả trong mục 2.2.2.2.

2.2.2.2. Áp dụng điều kiện tối ưu tạo tạp enalapril diketopiperazin để thẩm định phương pháp xác định tạp liên quan

** Điều kiện sắc ký*

Điều kiện sắc ký tham khảo theo chuyên luận viên nén enalapril trong USP 35 như sau:

+ Cột Supelco RP 8 (250 x 4,6 mm; 5 µm), nhiệt độ cột duy trì ở 50 °C.

+ Tốc độ dòng: 2 ml/min.

+ Detector: 215 nm.

+ Thể tích tiêm: 50 µl.

+ Pha động: Hỗn hợp dung dịch đệm pH 2,2 - acetonitril (75 : 25). Lọc và đuổi khí. Điều chỉnh tỉ lệ nếu cần.

** Phương pháp xử lý mẫu*

- *Dung dịch enalapril diketopiperazin:* Áp dụng điều kiện tạo tạp tối ưu đã khảo sát được ở mục 2.2.2.1.

- *Dung dịch chuẩn enalaprilat, dung dịch chuẩn, dung dịch thử độ thích hợp của hệ thống:* Thực hiện giống mục 2.2.2.1.

- *Dung dịch thử:* Cân một lượng bột thuốc tương đương với 20 mg enalapil maleat vào bình định mức dung tích 100 ml. Thêm khoảng 70 ml dung dịch đệm pH 2,2, lắc siêu âm 15 phút, tiếp tục lắc cơ học khoảng 30 phút. Pha loãng với dung dịch đệm pH 2,2 đến vạch,

lắc đều và tiếp tục siêu âm 15 phút. Lọc qua màng lọc 0,45 µm.

- *Dung dịch đối chiếu:* Pha loãng 1,0 ml dung dịch chuẩn thành 100,0 ml với dung dịch đệm pH 2,2.

- *Dung dịch placebo:* Cân một lượng bột tá dược (tương đương với 20 mg enalapil maleat) không chứa thành phần hoạt chất enalapil maleat vào bình định mức dung tích 100 ml. Thêm khoảng 70 ml dung dịch đệm pH 2,2, lắc siêu âm 15 phút, tiếp tục lắc cơ học khoảng 30 phút. Pha loãng với dung dịch đệm pH 2,2 đến vạch, lắc đều và tiếp tục siêu âm 15 phút. Lọc qua màng lọc 0,45 µm.

- *Dung dịch mẫu trắng:* là dung dịch đệm pH 2,2.

3. Kết quả và bàn luận

3.1. Chọn điều kiện tối ưu tạo tạp enalapril diketopiperazin

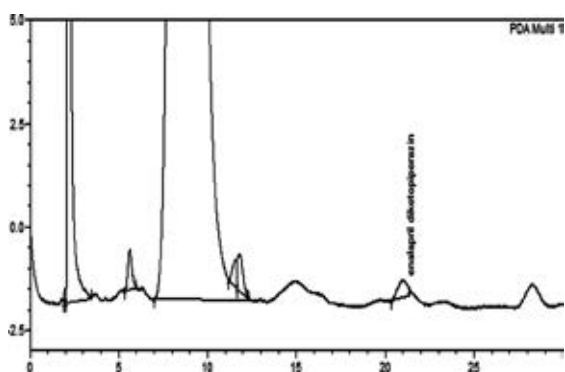
Kết quả quan sát trên sắc ký đồ cho thấy lượng tạp enalapril diketopiperazin tạo thành tăng dần tỷ lệ với lượng enalapril được chảy lỏng.

- Khi khoảng 20% lượng enalapril được chảy lỏng, trên sắc ký đồ không quan sát thấy pic ở thời gian lưu tương ứng với pic enalapril diketopiperazin (Hình 1).

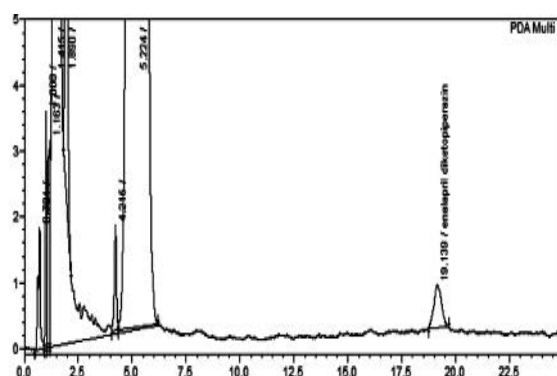
- Khi khoảng 40% lượng enalapril được chảy lỏng, trên sắc ký đồ quan sát thấy pic ở thời gian lưu tương ứng với pic enalapril diketopiperazin với lượng thấp (Hình 2).

- Khi khoảng 80% lượng enalapril được chảy lỏng, trên sắc ký đồ quan sát thấy pic ở thời gian lưu tương ứng với pic enalapril diketopiperazin với lượng tối ưu (Hình 3).

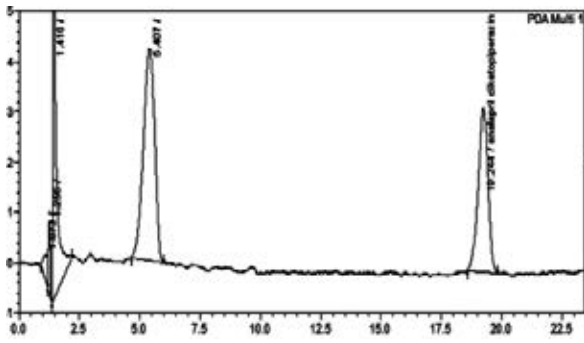
- Khi khoảng 100% lượng enalapril được chảy lỏng, trên sắc ký đồ quan sát thấy không có pic ở thời gian lưu tương ứng với pic enalapril diketopiperazin đồng thời tạo ra nhiều tạp phân hủy (Hình 4).



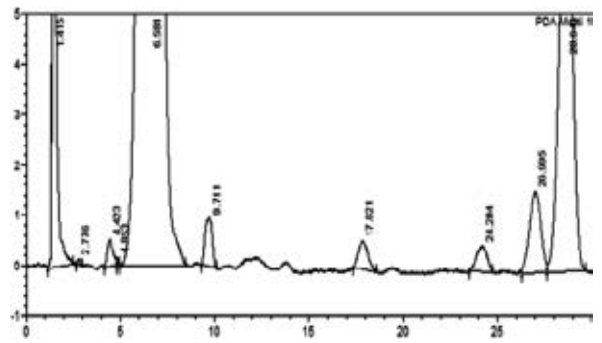
Hình 1. Sắc ký đồ tương ứng với lượng enalapril chảy lỏng 20%



Hình 2. Sắc ký đồ tương ứng với lượng enalapril chảy lỏng 40%



Hình 3. Sắc ký đồ tương ứng với lượng enalapril chảy lỏng 80%



Hình 4. Sắc ký đồ tương ứng với lượng enalapril chảy lỏng 100%

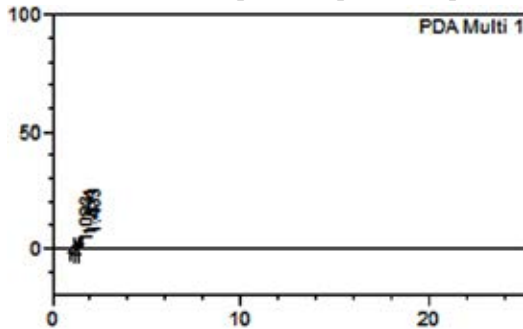
Từ kết quả trên cho thấy xác định được thời điểm ngừng đun chảy chất chuẩn enalapril (khi khoảng 80% lượng bột chảy lỏng) thì tạo ra được chuẩn tạp enalapril diketopiperazin tinh khiết với lượng hợp lý để có thể xác định được pic trên sắc ký đồ là rất cần thiết.

3.2. Thẩm định phương pháp

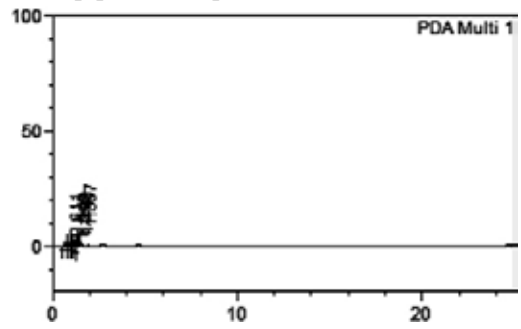
3.2.1. Khảo sát tính đặc hiệu

Tiêm lần lượt dung dịch mẫu trắng, dung dịch chuẩn, dung dịch thử, dung dịch đối chiếu và dung dịch placebo vào hệ thống sắc ký. Ghi lại sắc ký đồ. Kết quả cho thấy:

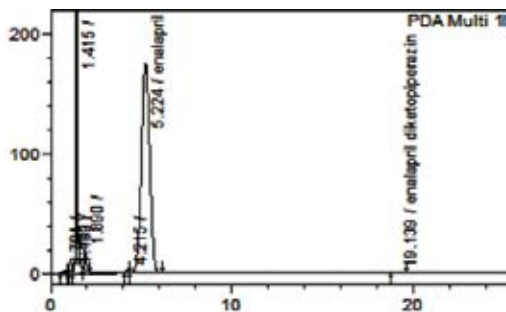
- Độ phân giải giữa pic acid maleic và pic enalaprilat là 3,3; giữa pic enalaprilat và enalapril là 6,4; giữa pic enalapril và enalapril diketopiperazin là 17,6 (Hình 7, Hình 8).
- Trên sắc ký đồ của dung dịch mẫu trắng và dung dịch placebo không xuất hiện pic tại thời gian lưu tương ứng với pic acid maleic, enalapril, enalaprilat và enalapril diketopiperazin nên không ảnh hưởng đến kết quả xác định các tạp này (Hình 5, Hình 6).
- Thời gian lưu của pic enalapril trên sắc ký đồ của dung dịch chuẩn và dung dịch thử giống nhau (khoảng 5,3 phút).
- Độ tinh khiết của các pic enalapril, enalaprilat và enalapril diketopiperazin xấp xỉ 1,0.



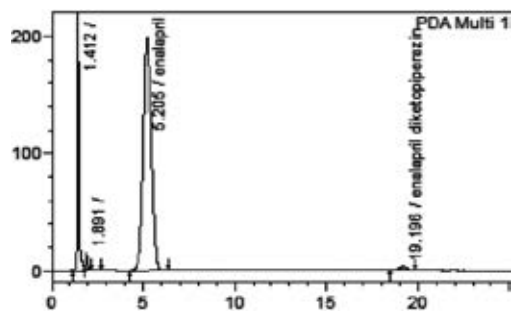
Hình 5. Mẫu trắng



Hình 6. Mẫu placebo



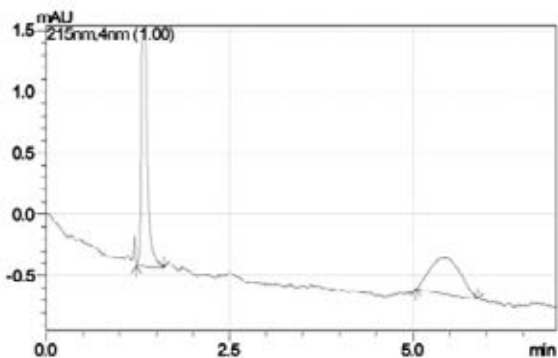
Hình 7. Mẫu thử



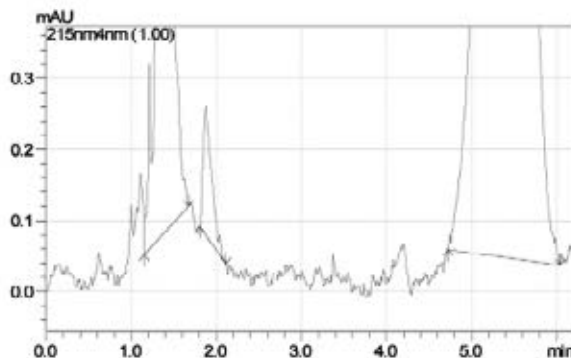
Hình 8. Mẫu chuẩn

3.2.2. Giới hạn phát hiện

Giới hạn phát hiện (LOD) của phương pháp được xác định bằng cách pha loãng dần dung dịch chuẩn enalapril và enalaprilat, so sánh đáp ứng của pic enalapril và enalaprilat với nhiễu của đường nền. Ở mức nồng độ enalapril 0,04 $\mu\text{g/ml}$ đáp ứng pic của enalapril gấp 3 lần nhiễu đường nền (Hình 9) và ở mức nồng độ enalaprilat 0,04 $\mu\text{g/ml}$ đáp ứng pic của enalaprilat gấp 3 lần nhiễu đường nền (Hình 10). Như vậy, LOD của enalapril là 0,4 $\mu\text{g/ml}$ và enalaprilat là 0,04 $\mu\text{g/ml}$.



Hình 9. Sắc ký đồ của pic enalapril ở nồng độ 0,4 $\mu\text{g/ml}$



Hình 10. Sắc ký đồ của pic enalaprilat ở nồng độ 0,04 $\mu\text{g/ml}$

4. Kết luận

Như vậy, chúng tôi đã lựa chọn được điều kiện tối ưu tạo tạp enalapril diketopiperazin trong phương pháp xác định tạp chất liên quan của enalapril là nhiệt độ đun khoảng 300⁰C và khoảng 80% lượng chất rắn được chảy lỏng hoàn toàn. Đồng thời chúng tôi áp dụng điều kiện tối ưu đã lựa chọn được để tạo tạp enalapril diketopiperazin để đánh giá độ thích hợp của hệ thống và thẩm định lại phương pháp xác định tạp chất liên quan theo USP 35 đạt yêu cầu về độ đặc hiệu với giới hạn phát hiện LOD của enalapril là 0,4 $\mu\text{g/ml}$ và enalaprilat là 0,04 $\mu\text{g/ml}$.

Tài liệu tham khảo

1. Bộ Y tế (2015), *Dược thư quốc gia Việt Nam*, Lần xuất bản thứ 2, Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật.
2. Tạ Mạnh Hùng, Đoàn Cao Sơn (2012), “Hướng dẫn chung thẩm định quy trình phân tích bằng phương pháp HPLC”, *Tạp chí kiểm nghiệm thuốc*, 10 (38), trang 1-8.
3. Al-Omaria, M.; Abdelaha, M.; Badwana, A.; Jaberb, A. (2001); “Effect of the drug-matrix on the stability of enalapril maleate in tablet formulations”, *J. Pharm. ioBmed. Anal.*, 25, 893.
4. United State Pharmacopoeia 35 (2012), *Enalapril tablets*.

SUMMARY

The thorough investigation to optimize condition in created Enalapril Diketopiperazine from Enalapril (when temperature reaches about 300⁰C, 80% of the solid is melted). HPLC method for related compounds of enalapril according to enalapril tablets monograph – USP 35 with the optimize condition has been revalidated in Lifelopin capsule. The results shown that this method was suitable with high specificity for Enalapril, Enalaprilat and Enalapril Diketopiperazine, LOD was 0.04 $\mu\text{g/ml}$ for enalaprilat and 0.4 $\mu\text{g/ml}$ for any unknown impurity.

(Ngày nhận bài: 21/02/2017 ; Ngày phản biện: 20/09/2017 ; Ngày duyệt đăng: 26/12/2017)

XÂY DỰNG PHƯƠNG PHÁP ĐỊNH LƯỢNG ĐỒNG THỜI ERYTHROMYCIN STEARAT, SULFAMETHOXAZOL VÀ TRIMETHOPRIM BẰNG ĐIỆN DI MAO QUẢN VÙNG

NGUYỄN THỊ THÙY LINH, VÕ VĂN BÌNH, NGÔ MINH THÚY, LÊ ĐÌNH CHI
Trường Đại học Dược Hà Nội

Từ khóa: Điện di mao quản vùng, định lượng đồng thời,
Sulfamethoxazol, Trimethoprim, Erythromycin stearat.

1. Đặt vấn đề

Hiện nay, trong điều trị nhiễm khuẩn việc sử dụng kết hợp kháng sinh có vai trò rất quan trọng giúp tăng khả năng diệt khuẩn, mở rộng phổ kháng khuẩn, giảm liều dùng và giảm khả năng kháng thuốc. Một trong những chế phẩm có sự kết hợp các kháng sinh là thuốc bột Erybac kết hợp với sulfamethoxazol (SMX), trimethoprim (TMP) và erythromycin stearat (ERS) [2]. Cho tới nay, sắc ký lỏng hiệu năng cao pha đảo với cột C18 là lựa chọn kỹ thuật phổ biến để định lượng đồng thời SMX và TMP [4], ERS và TMP [7], hay đơn lẻ trimethoprim [5], hay phân tích ERS và các tạp chất liên quan [6] v.v. Tuy nhiên, theo tìm hiểu các bài báo khoa học đã công bố, cho tới nay chưa có phương pháp HPLC nào sẵn có cho phép định lượng đồng thời SMX, TMP và ERS trong chế phẩm. Bên cạnh HPLC, điện di mao quản vùng (Capillary Zone Electrophoresis – CZE) là một kỹ thuật tách phân tích có khả năng tách tốt, giá thành vận hành rẻ, có thời gian phân tích nhanh, ứng dụng thuận lợi cho nhiều ứng dụng khác nhau như phân tích hoạt chất trong chế phẩm, nguyên liệu, bán thành phẩm và dịch sinh học. Trong nghiên cứu này, một phương pháp định lượng đồng thời SMX, TMP và ERS trong chế phẩm thuốc bột đã được thiết lập sử dụng kỹ thuật CZE. Phương pháp đã được thẩm định theo đúng các yêu cầu của phương pháp định lượng hoạt chất trong chế phẩm thuốc và đạt các quy định.

2. Thực nghiệm

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

2.1.1. Thiết bị, dụng cụ

Máy điện di mao quản P/ACE MDQ (Sciex, Mỹ) được trang bị detector PDA. Các thiết bị phụ trợ: máy đo pH, máy lọc nước siêu tinh khiết, cân phân tích, dụng cụ thủy tinh chính xác, màng lọc có đường kính lỗ lọc 0,2 µm.

2.1.2. Hóa chất, chất chuẩn

- Chất đối chiếu: Chất chuẩn Erythromycin stearat (67,57% nguyên trạng, SKS: WS.0612007.02); chất chuẩn Trimethoprim (98,70%, SKS: 0313109.02); chất

chuẩn Sulfamethoxazol (100,24%, SKS: 0107110) do Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương cung cấp.

- Hóa chất tinh khiết phân tích: Acid orthophosphoric, natri hydroxyd, kali dihydrophosphat, dinatri hydrophosphat, methanol của Merck, Đức.

- Nước sử dụng trong quá trình phân tích, rửa mao quản và để pha các dung dịch đều là nước được lọc qua bộ lọc nước siêu tinh khiết Purelab (Elga, Đức).

2.2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Đối tượng nghiên cứu

- Thuốc bột Erybact 365 (Mekophar, số lô 15919GN, hạn dùng 01/08/2018).

- Mẫu placebo tự tạo: Các tá dược dùng trong thuốc bột Erybact (Aspartam, acesulfam postasium, ammonium glycyrrhizinat, sodium citrat, hydroxypropyl methyl cellulose, polyethylen glycol 6000, tinh dầu dâu, đường trắng).

2.2.2. Phương pháp nghiên cứu

- Chuẩn bị mẫu chuẩn: Chuẩn ERS, TMP, SMX được chuẩn bị thành các dung dịch gốc riêng lẻ của từng kháng sinh trong dung môi methanol ở nồng độ tương ứng với mỗi kháng sinh là 1250 ppm, 1000 ppm và 5000 ppm, pha loãng bằng nước loại ion tới nồng độ để phân tích.

- Chuẩn bị mẫu thử: Cân chính xác một lượng chế phẩm có chứa erythromycin stearat, trimethoprim và sulfamethoxazol tương ứng cho vào bình định mức 10 ml. Thêm 1,0 ml methanol rồi đem siêu âm 5 phút, sau đó bổ sung nước loại ion tới vạch .

- Chuẩn bị mẫu placebo: Cân chính xác khoảng 0,0260 g hỗn hợp placebo vào bình định mức 10 ml. Thêm 1,0 ml methanol, đem siêu âm 5 phút, sau đó bổ sung nước loại ion tới vạch.

Tất cả các dung dịch đều được lọc qua màng lọc 0,2 µm trước khi chạy điện di.

- Các điều kiện phân tích điện di cơ bản (bản chất, nồng độ, pH dung dịch điện ly nền, hiệu điện thế áp vào hai đầu mao quản) được tối ưu hóa đơn biến để lựa chọn điều kiện phân tích phù hợp. Định lượng các kháng sinh

ERS, TMP, SMX trong chế phẩm bằng cách so sánh diện tích pic thu được trên điện di đồ của các mẫu thử và mẫu chuẩn.

- Xử lý thống kê kết quả bằng phần mềm Microsoft Excel 2010 để thiết lập đường hồi quy tuyến tính, xác định giá trị trung bình, độ lệch chuẩn, độ lệch chuẩn tương đối trong phần thẩm định phương pháp.

3. Kết quả và bàn luận

3.1. Kết quả

3.1.1. Khảo sát lựa chọn điện di cơ bản để tách ERS, TMP, SMX bằng CZE

Để xây dựng quy trình tách, các điều kiện phân tích cơ bản dưới đây được sử dụng cố định:

- *Cột mao quản*: Mao quản silica nung chảy, chiều dài hiệu dụng 30 cm, chiều dài tổng 40,2 cm, đường kính trong 75 μm , nhiệt độ mao quản 25°C.

- *Tiêm mẫu*: Áp suất 0,5 psi trong thời gian 10 giây.

- *Rửa mao quản*: Với mao quản mới, mao quản được hoạt hóa bằng dung dịch natri hydroxyd 0,1M trong 60 phút, sau đó rửa bằng nước loại ion trong 10 phút. Trong quá trình phân tích, trước mỗi lần chạy điện di, rửa mao quản theo thứ tự: nước loại ion trong 1 phút, dung dịch natri hydroxyd 0,1M trong 1 phút, nước loại ion trong 2 phút, dung dịch đệm điện di trong 2 phút. Khi kết thúc ngày làm việc, rửa mao quản theo thứ tự: nước loại ion trong 2 phút, dung dịch natri hydroxyd 0,1M trong 2 phút, nước loại ion trong 5 phút. Bảo quản mao quản bằng cách làm đầy bên trong mao quản bằng nước loại ion.

Bên cạnh các điều kiện kể trên, một số điều kiện phân tích cơ bản khác đã được khảo sát để đưa ra lựa chọn thích hợp:

- *Lựa chọn bước sóng phát hiện*: Tiến hành quét phổ của dung dịch chuẩn ba chất trong đệm phosphat pH 6,87 với bước sóng từ 190 nm đến 300 nm. Kết quả độ hấp thụ cực đại của các kháng sinh ở các bước sóng khác nhau (TMP là 280 nm, SMX là 271 nm), riêng ERS hấp thụ rất yếu. Do đó, lựa chọn bước sóng định lượng erythromycin stearat là 205 nm, trimethoprim và sulfamethoxazol là 270 nm.

- *Lựa chọn dung dịch điện ly nền*: Tiến hành điện di dung dịch chuẩn hỗn hợp ba chất, sử dụng dung dịch điện ly nền lần lượt là dung dịch đệm borat 25 mM, pH 9,3 và dung dịch đệm phosphat 25 mM, pH 6,87. Điện thế áp vào hai đầu mao quản là 20 kV. Kết quả khi sử dụng dung dịch đệm phosphat thì xuất hiện cả 3 pic, khả năng tách của các chất cao hơn. Do đó, lựa chọn dung dịch đệm phosphat làm dung dịch điện ly nền cho chương trình điện di.

- *Lựa chọn pH dung dịch điện ly nền*: Tiến hành điện di dung dịch chuẩn hỗn hợp ba chất, sử dụng dung dịch điện ly nền là dung dịch phosphat 25 mM có pH lần lượt là 6,87; 6,00; 5,00; 4,00. Điện thế áp vào hai đầu mao quản là 20 kV. Kết quả cho thấy pH 5,00 là pH tối ưu cho chương trình điện di.

- *Lựa chọn nồng độ dung dịch điện ly nền*: Tiến hành điện di dung dịch chuẩn hỗn hợp ba chất, sử dụng dung dịch đệm phosphat pH 5,00 ở các nồng độ khác nhau: 25 mM, 20 mM, 15 mM, 10 mM, 5 mM. Điện thế áp vào hai đầu mao quản là 20 kV. Kết quả lựa chọn dung dịch đệm phosphat 15 mM.

- *Lựa chọn điện thế áp lên mao quản*: Thay đổi hiệu điện thế áp vào mao quản 10 kV, 15 kV, 20 kV. Mức thế 20 kV được lựa chọn vì cường độ dòng tạo ra ổn định và thích hợp (khoảng 60 – 70 μA).

Từ các kết quả khảo sát thu được, điều kiện điện di để phân tích đồng thời ERS, TMP, SMX được lựa chọn như sau:

- *Mao quản điện di*: Cột silica nung chảy, chiều dài 40,2 cm, chiều dài hiệu dụng 30 cm, đường kính trong 75 μm .

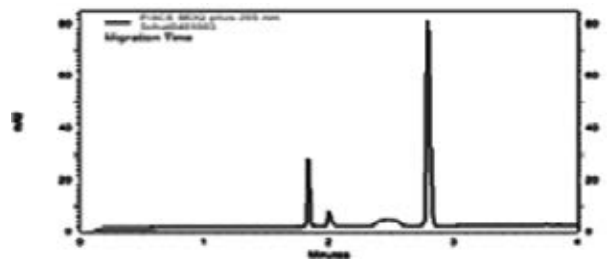
- *Detector*: PDA với bước sóng phát hiện 205 nm để định lượng erythromycin stearat, 270 nm để định lượng trimethoprim và sulfamethoxazol.

- *Dung dịch điện ly nền*: Dung dịch KH_2PO_4 15 mM + Na_2HPO_4 15 mM, pH 5,00.

- *Nhiệt độ mao quản duy trì ở*: 25°C.

- *Chế độ tiêm mẫu*: 0,5 psi x 10 s.

- *Hiệu điện thế đặt vào hai đầu mao quản*: + 20 kV



Hình 1. Điện di đồ của ERS, TMP và SMX ở điều kiện đã khảo sát

3.1.2. Kết quả thẩm định phương pháp phân tích

3.1.2.1. Độ phù hợp của hệ thống CE

Tiến hành điện di lặp lại 6 lần cùng một dung dịch chuẩn hỗn hợp ba chất gồm erythromycin stearat 125 $\mu\text{g/ml}$, trimethoprim 40 $\mu\text{g/ml}$, sulfamethoxazol 200 $\mu\text{g/ml}$ tại điều kiện điện di đã khảo sát. Kết quả được trình bày ở Bảng 1.

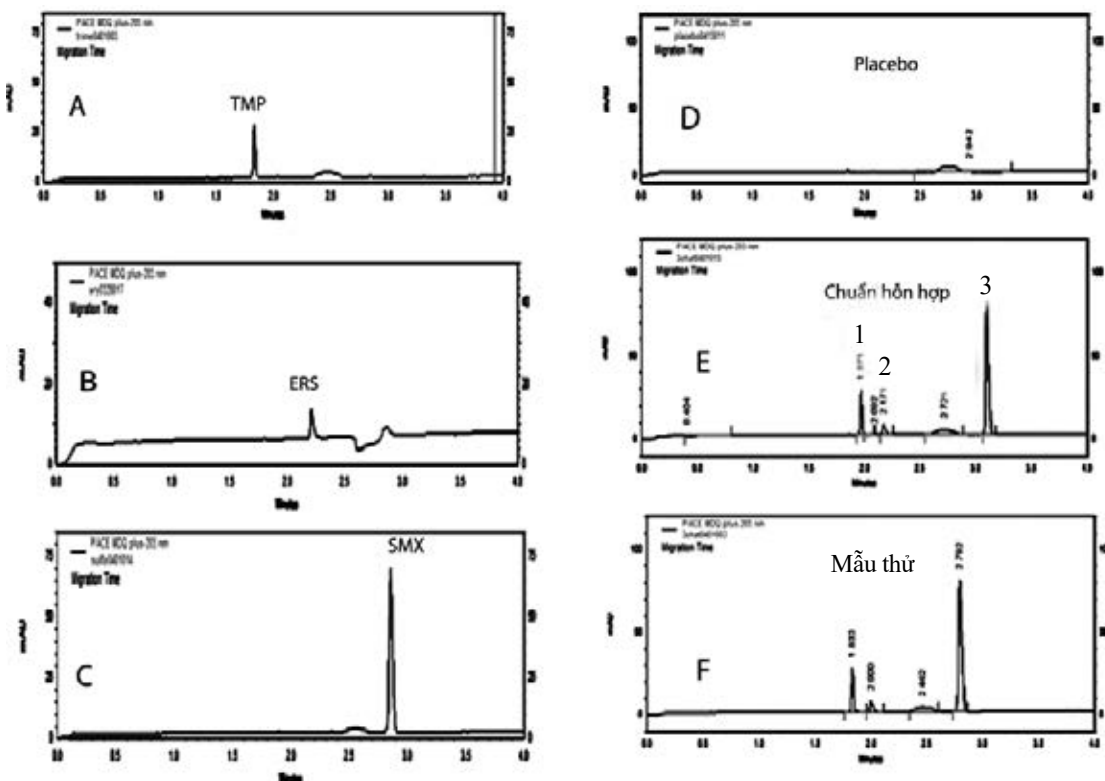
Bảng 1. Kết quả đánh giá độ phù hợp hệ thống điện di

STT	Trimethoprim		Erythromycin stearat		Sulfamethoxazol	
	t_M (phút)	S (mAU.s)	t_M (phút)	S (mAU.s)	t_M (phút)	S (mAU.s)
1	1,858	14010	2,038	4870	3,142	400708
2	1,842	13804	2,017	4783	3,146	408635
3	1,842	13984	2,017	4890	3,038	399861
4	1,821	13641	1,992	5011	3,177	409943
5	1,846	14078	2,033	4890	3,146	392259
6	1,854	14078	2,042	4807	3,103	392669
TB	1,844	13926	2,023	4875	3,125	400679
RSD (%)	0,70	1,21	0,92	1,24	1,56	1,88

Kết quả trong Bảng cho thấy thời gian di chuyển, diện tích pic của các chất phân tích đều có độ lặp lại tốt ($RSD \leq 2\%$) và độ phân giải giữa 2 pic liền kề > 2 , chứng tỏ hệ thống điện di phù hợp cho việc định lượng ba chất ERS, TMP và SMX.

3.1.2.2. Độ đặc hiệu

Tiến hành điện di theo điều kiện đã thiết lập lần lượt các mẫu sau: Dung dịch placebo, dung dịch chuẩn đơn từng chất, dung dịch chuẩn hỗn hợp ba chất trong placebo, dung dịch thử hỗn hợp ba chất chuẩn bị từ thuốc bột Erybact 365. Kết quả trên điện di đồ của mẫu placebo không xuất hiện pic tại thời điểm xuất hiện pic của mẫu chuẩn và mẫu thử. Thời gian di chuyển của pic trên điện di đồ của mẫu thử tương ứng với thời gian di chuyển của pic trên điện di đồ của mẫu chuẩn. Thứ tự rửa giải các chất lần lượt trên điện di đồ là trimethoprim (1), erythromycin stearat (2) và sulfamethoxazol (3) (Hình E).



Hình 2. Điện di đồ của nền placebo (D), chuẩn trimethoprim (A), chuẩn erythromycin stearat(B), chuẩn sulfamethoxazol (C) và placebo thêm chuẩn hỗn hợp (E), và mẫu thử Erybact 365 (F)

3.1.2.3. Khoảng nồng độ tuyến tính

Chuẩn bị dung dịch chuẩn hỗn hợp ba chất có nồng độ là TMP 40 µg/ml, ERS 125 µg/ml, SMX 200 µg/ml làm nồng độ định lượng. Tiến hành chạy điện di các dung dịch chuẩn hỗn hợp ba chất có nồng độ tương đương 60% - 140% so với nồng độ làm việc. Dãy các dung dịch chuẩn hỗn hợp ba chất được pha từ dung dịch chuẩn gốc với hệ số pha loãng khác nhau. Kết quả xác định khoảng nồng độ tuyến tính được trình bày ở Bảng 2.

Bảng 2. Kết quả khảo sát khoảng tuyến tính của TMP, ERS, SMX

STT	Trimethoprim		Erythromycin stearat		Sulfamethoxazol	
	Nồng độ (µg/ml)	S pic (mAU.s)	Nồng độ (µg/ml)	S pic (mAU.s)	Nồng độ (µg/ml)	S pic (mAU.s)
1	24,45	9492	75,90	4501	119,28	249907
2	32,96	15281	101,12	6119	159,04	463758
3	41,20	20108	126,40	8203	198,80	637539
4	49,44	23965	151,68	10216	238,56	927776
5	57,58	29937	176,96	11951	278,32	1152652
Phân tích HQ	y = 599,21 x - 4886,7 r = 0,9978		y = 75,183 x - 1306 r = 0,9991		y = 5708 x - 448854 r = 0,9968	

Từ đồ thị cho thấy có mối quan hệ tuyến tính chặt chẽ giữa nồng độ của trimethoprim, erythromycin stearat, sulfamethoxazol với diện tích pic tương ứng. Đường hồi quy có dạng đường thẳng và có hệ số tương quan $r \geq 0,995$ (hay $R^2 \geq 0,99$).

3.1.2.4. Độ lặp lại

Độ lặp lại của phương pháp được xác định trên 6 mẫu thử song song của cùng một mẫu với cùng điều kiện điện di, trong cùng một ngày.

Chuẩn bị mẫu thử: Cân khoảng 0,0300 g thuốc bột Erybact 365 vào bình 10,0 ml. Thêm 1,0 ml methanol rồi đem siêu âm 5 phút. Bổ sung đến vạch bằng nước loại ion. Tiến hành lọc dung dịch thu được qua giấy lọc. Dịch lọc thu được đem lọc qua màng lọc 0,2 µm. Lấy dịch lọc cuối cùng để tiến hành chạy điện di. Kết quả thu được ở Bảng 3.

Bảng 3. Kết quả đánh giá độ lặp lại trên mẫu thuốc bột Erybact 365

STT	Khối lượng cân (g)	Trimethoprim			Erythromycin stearat			Sulfamethoxazol		
		Diện tích pic (mAU.s)	Nồng độ (µg/ml)	Hàm lượng (mg)	Diện tích pic (mAU.s)	Nồng độ (µg/ml)	Hàm lượng (mg)	Diện tích pic (mAU.s)	Nồng độ (µg/ml)	Hàm lượng (mg)
1	0,0298	16348	40,37	40,64	8233	122,71	123,53	495177	197,01	198,33
2	0,0301	16525	40,71	40,58	8208	122,41	122,01	516149	202,72	202,05
3	0,0299	16041	39,77	39,90	8266	123,09	123,51	510057	201,06	201,74
4	0,0305	16791	41,24	40,56	8699	128,17	126,07	508583	200,66	197,37
5	0,0296	16333	40,34	40,88	8166	121,92	123,57	505170	199,73	202,43
6	0,0293	15874	39,44	40,38	8190	122,20	125,12	487512	194,92	199,58
Trung bình		TB = 40,49 mg; n = 6; RSD = 0,8%			TB = 123,97 mg; n = 6; RSD = 1,15%			TB = 200,25 mg; n = 6; RSD = 1,06%		

Kết quả ở Bảng 3 chứng tỏ phương pháp có độ lặp lại tốt: Độ lặp lại các kết quả định lượng của trimethoprim, erythromycin stearat, sulfamethoxazol trong mẫu thử tốt ($RSD \leq 2\%$).

3.1.2.5. Độ đúng của phương pháp

Tiến hành thẩm định độ đúng theo phương pháp mẫu tự tạo, thêm chính xác dung dịch chuẩn hỗn hợp ba chất vào mẫu thử. Lượng chất chuẩn thêm vào ở ba mức nồng độ 60%, 80%, 100% so với nồng độ làm việc. Nồng độ mẫu thử khoảng 20% so với nồng độ làm việc. Mỗi mức nồng độ gồm có 3 mẫu độc lập. Xác định phần trăm tìm lại được của mỗi chất phân tích so với lượng ban đầu. Kết quả độ đúng được thể hiện ở các Bảng 4, 5, 6.

Bảng 4. Kết quả đánh giá độ đúng của TMP

STT	Nồng độ mẫu thử	Nồng độ chuẩn thêm lý thuyết ($\mu\text{g/ml}$)	Diện tích pic (mAU.s)	Nồng độ chuẩn thêm thực tế ($\mu\text{g/ml}$)	Độ thu hồi (%)
1	7,79	26,40	15143	26,36	99,9
2	7,79		15549	26,82	101,6
3	7,79		14763	25,93	98,2
4	7,79	35,20	21058	35,23	100,1
5	7,79		21047	35,21	100,0
6	7,79		20952	35,06	99,6
7	7,79	44,00	31021	48,83	99,6
8	7,79		30833	43,59	99,1
9	7,79		30924	43,71	99,3

Bảng 5. Kết quả đánh giá độ đúng của ERS

STT	Nồng độ mẫu thử	Nồng độ chuẩn thêm lý thuyết ($\mu\text{g/ml}$)	Diện tích pic (mAU.s)	Nồng độ chuẩn thêm thực tế ($\mu\text{g/ml}$)	Độ thu hồi (%)
1	24,95	77,40	3856	77,00	99,5
2	24,95		3974	78,62	101,6
3	24,95		3993	78,88	101,9
4	24,95	103,20	4317	104,54	101,3
5	24,95		4171	101,51	98,4
6	24,95		4254	103,23	100,0
7	24,95	129,00	8016	128,20	99,4
8	24,95		8250	130,19	100,9
9	24,95		8060	128,58	99,7

Bảng 6. Kết quả đánh giá độ đúng của SMX

STT	Nồng độ mẫu thử	Nồng độ chuẩn thêm lý thuyết ($\mu\text{g/ml}$)	Diện tích pic (mAU.s)	Nồng độ chuẩn thêm thực tế ($\mu\text{g/ml}$)	Độ thu hồi (%)
1	39,75	119,28	391992	120,00	100,6
2	39,75		386319	118,42	99,3
3	39,75		390239	119,51	100,2
4	39,75	159,04	509475	161,88	101,8
5	39,75		503871	160,51	100,9
6	39,75		494036	158,12	99,4
7	39,75	198,80	767983	200,48	100,9
8	39,75		768378	202,26	101,7
9	39,75		767216	197,10	99,1

Kết quả trong các Bảng cho thấy, độ thu hồi của erythromycin stearat, trimethoprim và sulfamethoxazol đều nằm trong khoảng từ 98,0% đến 102,0%.

Như vậy phương pháp định lượng cho độ đúng cao khi định lượng ba chất trên.

3.1.3. Ứng dụng trên chế phẩm để định lượng hoạt chất

Phương pháp phân tích bằng CZE sau khi thẩm định đã được áp dụng để định lượng ERS, TMP, SMX trong chế phẩm dạng viên nén, thuốc bột chứa các kháng sinh này. Kết quả định lượng (Bảng 7) cho thấy hàm lượng thực của các kháng sinh tương ứng trong chế phẩm này đều nằm trong khoảng dao động cho phép về hàm lượng so với ghi

trên nhãn theo quy định hiện hành của Dược điển Việt Nam IV [1].

Bảng 7. Kết quả định lượng hoạt chất trên chế phẩm

Chế phẩm		Hàm lượng thực tế TB ± SD (mg) (n = 6)	(%) so với hàm lượng trên nhãn (TB ± SD)	Dao động (%) về hàm lượng cho phép theo ĐDVN IV
Thuốc bột Erybact 365	TMP	40,37 ± 0,4	100,9 ± 1,0	95 – 105
	ERS	123,0 ± 0,9	98,41 ± 0,7	95 – 105
	SMX	200,7 ± 2,1	100,3 ± 1,0	95 – 105

3.2. Bàn luận

Việc sử dụng kỹ thuật CZE, phương pháp này tương đối phù hợp với cả 3 chất trimethoprim, erythromycin stearat và sulfamethoxazol với thời gian phân tích ngắn (dưới 4,0 phút) (Hình 2). Phương pháp đã chứng tỏ được sự phù hợp trên mẫu chế phẩm thực Erybact 365 là chế phẩm mới. Trước đây chỉ là sự phối hợp của trimethoprim và sulfamethoxazol theo tỉ lệ 1 : 5 là hai chất diệt khuẩn, sử dụng thêm kháng sinh kìm khuẩn erythromycin stearat để làm tăng khả năng diệt khuẩn của thuốc cũng như mở rộng phổ kháng khuẩn. Nhóm nghiên cứu chưa tìm thấy tài liệu nào nghiên cứu phương pháp định lượng đồng thời cả 3 hoạt chất trên bằng CZE. Lợi thế chủ yếu của phương pháp được nghiên cứu thiết lập là dùng chung một phương pháp để phân tích đồng thời 3 hoạt chất trên, một phương pháp an toàn, kinh tế và nhanh. Trong thời gian tới, nhóm nghiên cứu sẽ thẩm định lại phương pháp để áp dụng cho các chế phẩm có chứa thành phần erythromycin stearat, hay các chế phẩm chỉ có 2 thành phần trimethoprim và sulfamethoxazol đang lưu hành trên thị trường [4],[6],[7]. Hy vọng phương pháp CE được dùng để bổ trợ, thay thế khi cần thiết cho nhiều phương pháp HPLC đang hiện hành.

4. Kết luận

Phương pháp đã xây dựng để định lượng ERS, TMP, SMX cho thời gian phân tích tương đối ngắn. Kết quả thẩm định theo ICH cho thấy phương pháp đã xây dựng phù hợp để áp dụng định lượng 3 kháng sinh kể trên trong chế phẩm, có độ đúng, độ tuyến tính và độ chính xác phù hợp [3]. Phương pháp có triển vọng tốt để ứng dụng định lượng ERS, TMP, SMX trong các chế phẩm chứa các kháng sinh này trên thị trường như một lựa chọn kỹ thuật bổ sung bên cạnh các phương pháp sẵn có sử dụng kỹ thuật HPLC.

Tài liệu tham khảo

1. Bộ Y tế (2009), *Dược điển Việt Nam*, Lần xuất bản thứ tư (Bản điện tử).
2. Bộ Y Tế (2015), *Hướng dẫn sử dụng kháng sinh*, Hà Nội.
3. ICH (1996), “Validation of Analytical Procedure: Text and Methodology” Q2 (R1).
4. A.V. Pereira, Q.B. Cass (2005), “High-performance liquid chromatography method for the simultaneous determination of sulfamethoxazole and trimethoprim in bovine milk using an on-line clean-up column”, *Journal of Chromatography B*, 826, pp.139-146.
5. Ghorban Behzadian Nejad, Abbas Rezaee, Abbas Kebriaeeza, Reza Ahmadkhoneiha (1998), “High performance liquid chromatographic determination of trimethoprim in mouse liver”, *Pharmacy and Pharmacology Communications*, 4, pp.439-441.
6. Jacqueline Wardrop, Daniel Ficker, Stephen Franklin, Ronald J. Gorski (2000), “Determination of erythromycin and related substances in enteric-coated tablet formulations by reversed-phase liquid chromatography”, *Journal of pharmaceutical sciences*, 89, pp.1097-1105.
7. Sonia T. Hassib, Awatef E. Farag, Ehab F. Elkady (2011), “Liquid chromatographic and spectrophotometric methods for the determination of erythromycin stearate and trimethoprim in tablets”, *Bulletin of Faculty of Pharmacy*, 49, pp.81-89.

SUMMARY

A CZE method was developed for the assay of Sulfamethoxazole, Trimethoprim and Erythromycin stearate in solid dosage forms. Column: Fused-silica capillary (effective length 30 cm, total length 40.2 cm, inner diameter 75 µm); Background electrolyte -15 mM solution of Potassium dihydrogen phosphate and 15 mM Disodium hydrogen phosphate, adjusted to pH 5.0; Detector: PDA (205 nm for Erythromycin stearate; 270 nm for Sulfamethoxazole, Trimethoprim); The total running time was about 4 minutes. The method was validated in terms of specificity, linearity, accuracy (recovery rate: 98,2 – 101,9%) and so, the suitability and reliability was confirmed for the intended applications.

(Ngày nhận bài: 15/9/2017 ; Ngày phản biện: 03/10/2017 ; Ngày duyệt đăng: 26/12/2017)

XÁC ĐỊNH DUNG MÔI ETHANOL TỒN DƯ TRONG THUỐC BẰNG PHƯƠNG PHÁP SẮC KÝ KHÍ MAO QUẢN

PHAN NGUYỄN TRƯỜNG THẮNG, HÀ MINH HIỀN
Viện Kiểm nghiệm Thuốc TP. Hồ Chí Minh

Từ khóa: Sắc ký khí mao quản, dung môi tồn dư, Ethanol

1. Đặt vấn đề

Theo tài liệu CPMP/ICH/283/95 của cơ quan dược phẩm châu Âu (EMA), ethanol là dung môi được sử dụng trong sản xuất thuốc với các lý do như: dung môi trong giai đoạn kết hạt để sản xuất thuốc viên, dung môi trong dung dịch bao phim trong trường hợp dược chất dễ hỏng do hơi ẩm và yêu cầu phải được kiểm tra giới hạn trong thành phẩm [1]. Ethanol thuộc nhóm 3 của các dung môi phải được giới hạn vì GMP hoặc vì các yêu cầu chất lượng khác [2]. Dược điển Việt nam IV đưa ra quy trình chung xác định dung môi tồn dư bằng phương pháp sắc ký khí với kỹ thuật tiêm hơi pha tĩnh [2]. Kỹ thuật này đòi hỏi phải trang bị kèm theo máy sắc ký khí bộ tiêm mẫu hóa hơi, ủ, lắc, lấy và tiêm mẫu tự động thông qua phần mềm điều khiển nên tiêu tốn tài lực và thời gian. Thực tiễn máy sắc ký khí tại nhiều phòng kiểm nghiệm ở nước ta chỉ có bộ tiêm mẫu lỏng trực tiếp hoặc chia dòng/không chia dòng, không tiêm được mẫu pha hơi. Do vậy, đề tài: “Xác định dung môi ethanol tồn dư trong thuốc bằng phương pháp sắc ký khí mao quản” được thực hiện nhằm xây dựng và thẩm định các phương pháp xác định dung môi tồn dư ethanol, tuân thủ các quy định của ICH (Hội nghị quốc tế về hài hòa các yêu cầu kỹ thuật để đăng ký các thuốc dùng cho người) ghi trong “Văn bản thẩm định quy trình phân tích” (*Text on validation of analytical procedures*) và “Mở rộng văn bản thẩm định quy trình phân tích” (*Extension of the ICH Text on validation of analytical procedures*). Quy trình phân tích này giúp cho các đơn vị kiểm nghiệm khai thác trang thiết bị hiện có để kiểm soát dung môi tồn dư không mong muốn trong quá trình sản xuất thuốc.

2. Thực nghiệm

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

2.1.1. Thiết bị, dụng cụ

Đã được hiệu chuẩn theo GLP và ISO/IEC 17025:2005.

- Cân phân tích.
- Máy sắc ký khí GC Shimadzu 2010 Plus: Bộ tiêm mẫu lỏng tự động AOC-20i, đầu dò FID-2010 Plus, buồng tiêm mẫu kiểu chia dòng/không chia dòng SPL-2010 Plus với bộ điều khiển dòng khí bằng kỹ thuật số AFC, phần mềm xử lý dữ kiện LabSolutions phiên bản 2.5.

- Dụng cụ thủy tinh và các dụng cụ thông thường khác phù hợp cho mục đích thí nghiệm

2.1.2. Hóa chất, thuốc thử và chất chuẩn

- Ethanol (Fisher), số lô: 1549916, hàm lượng: 99,99% C₂H₆O.
- 2-propanol (Fisher), số lô: 1562431, hàm lượng: 99,97% C₃H₈O.
- Nước cất 2 lần

2.2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Đối tượng nghiên cứu

Viên nén bao phim Fexostad 60, số lô: 010516/0011, hạn dùng: 05/2019 do Công ty TNHH Liên doanh Stada sản xuất.

2.2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.2.1. Xây dựng phương pháp thử

Chuẩn bị các dung dịch tiêm sắc ký (chuẩn bị trước khi phân tích).

- *Dung dịch chuẩn nội:* Cân chính xác khoảng 500 mg 2-propanol (TT) vào bình định mức 100 ml, pha loãng bằng nước đến thể tích và lắc đều thu được dung dịch chuẩn nội.

- *Dung dịch chuẩn gốc:* Cân chính xác khoảng 500 mg ethanol (TT) vào bình định mức 100 ml, pha loãng bằng nước đến thể tích và lắc đều thu được dung dịch chuẩn gốc ethanol.

- *Dung dịch chuẩn làm việc:* Hút chính xác 5 ml dung dịch chuẩn nội, 5 ml dung dịch chuẩn gốc, cho vào bình định mức 100 ml, pha loãng đến thể tích bằng nước, lắc đều, thu được dung dịch chuẩn làm việc ethanol.

- *Dung dịch thử:* Cân chính xác khoảng 1,0 g mẫu thử vào bình định mức 20 ml, thêm chính xác 1 ml dung dịch chuẩn nội, thêm 10 ml nước, siêu âm 30 phút, pha loãng đến thể tích bằng nước, lắc đều, ly tâm 3000 vòng/phút trong 10 phút, lấy lớp dịch trong thu được dung dịch thử.

- *Dung dịch thẩm định độ đúng:* Dung dịch thử có nồng độ ethanol lần lượt khoảng: LOQ, 0,25 và 0,3 mg/ml trong dung dịch 2-propanol có nồng độ khoảng 0,25 mg/ml.

2.2.2.2. Điều kiện sắc ký

Detector: Ion hóa ngọn lửa

Cột:

- *Chất liệu:* Silica nung chảy

- *Kích thước*: Dài = 30 m (độ dày lớp bao 1,8 μm), Đường kính trong = 0,32 mm.

- *Pha tĩnh*: 6% cyanopropylphenyl - 94% dimethylpolysiloxan.

Nhiệt độ theo chương trình:

	Thời gian (min)	Nhiệt độ (°C)
Cột	0	70
	0-10	100
	10-16	220
	16-20	220
Buồng tiêm mẫu		200
Detector		260

Tỷ lệ chia dòng: 1 : 3

Khí mang: Heli dùng cho sắc ký

Tốc độ dòng khí mang: 1,65 ml/min

Tốc độ dòng tối đa tuyến tính khí mang: 30,1 cm/s

Tốc độ dòng khí nén: 400 ml/min

Tốc độ dòng khí hydro: 40 ml/min

Thể tích tiêm: 1 μl

2.2.2.3. Cách tiến hành

Tiêm lần lượt dung dịch chuẩn và dung dịch thử

vào máy sắc ký khí. Ghi lại sắc ký đồ, thời gian lưu và diện tích pic ethanol, 2-isopropanol. Tính lượng ethanol (C₂H₆O) trong 100 g chế phẩm:

$$\text{Kết quả} = (R_U / R_S) \times C_S \times P \times (20 \times 10^6 / M_U)$$

Trong đó: R_U/R_S: Tỷ lệ diện tích giữa pic của ethanol và 2-propanol có được từ sắc ký đồ của dung dịch thử/chuẩn, C_S: Hàm lượng của ethanol trong dung dịch chuẩn (mg/ml), P: Hàm lượng của chuẩn ethanol (% kl/kl), M_U: Khối lượng mẫu thử (mg)

3. Kết quả và bàn luận

Thẩm định phương pháp phân tích [3]

3.1. Khảo sát tính phù hợp của hệ thống sắc ký

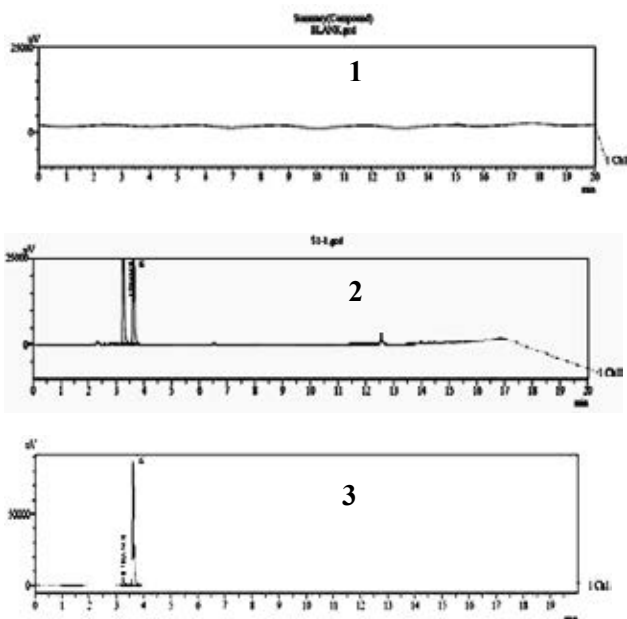
Tiến hành sắc ký 6 lần dung dịch chuẩn, ghi lại sắc ký đồ. Các thông số về sắc ký như hệ số đối xứng (A), số đĩa lý thuyết (N), các thông số về sự tách sắc ký như độ phân giải (R_s) và thông số về độ chụm thể hiện ở RSD (%) đối với: thời gian lưu của pic ethanol, thời gian lưu của pic 2-propanol với 6 lần tiêm: ≤ 1,0% và RSD (%) đối với: tỷ lệ diện tích pic ethanol so với pic 2-propanol trên 6 lần tiêm: ≤ 2,0%. Độ phân giải giữa pic ethanol và pic 2-propanol trong sắc ký đồ của dung dịch chuẩn phải R_s ≥ 3. Hệ số đối xứng của pic ethanol phải A ≤ 2. Số đĩa lý thuyết pic ethanol phải N ≥ 10000.

Bảng 1. Tính phù hợp của hệ thống sắc ký (n = 6)

STT	Thời gian lưu pic ethanol (min)	Thời gian lưu pic 2-propanol (min)	Diện tích pic ethanol	Diện tích pic 2-propanol	Tỷ lệ diện tích pic	Độ phân giải (R _s)	Hệ số đối xứng (A)	Số đĩa lý thuyết (N)
1	3,250	3,622	258554	247589	1,044	5,116	1,551	34925
2	3,251	3,624	261637	252290	1,037	5,123	1,599	35264
3	3,257	3,628	243770	234335	1,040	5,253	1,438	37160
4	3,254	3,626	256903	244528	1,051	5,166	1,612	36127
5	3,257	3,628	244973	235442	1,040	5,252	1,443	37160
6	3,250	3,622	258276	247356	1,044	5,116	1,55	34925
TB	3,253	3,625			1,043	5,171	1,532	35927
% RSD	0,10	0,08			0,45			

3.2. Tính đặc hiệu

Sắc ký đồ của mẫu trắng (nước) không cho pic lạ có thời gian lưu trùng với thời gian lưu của pic ethanol (3,25 phút); pic 2-propanol (3,63 phút) trong sắc ký đồ của mẫu chuẩn. Sắc ký đồ mẫu thử cho pic ethanol có thời gian lưu (3,25 phút), khác nhau không có ý nghĩa thống kê với pic ethanol (3,29 phút) trong sắc ký đồ của mẫu chuẩn. Mẫu thử không cho thêm chuẩn nội 2-propanol không có pic tại thời gian lưu tương ứng với pic của chuẩn nội trong sắc ký đồ mẫu chuẩn (3,63 phút). Sắc ký đồ mẫu thử có xuất hiện pic ethanol và trên sắc ký đồ của mẫu thử thêm chuẩn ethanol thấy diện tích pic ethanol tăng lên và tại thời gian lưu của pic ethanol không xuất hiện tình trạng tách, chệch pic.



Hình 1. Sắc ký đồ (1) mẫu trắng, (2) mẫu chuẩn, (3) mẫu thử

3.3. Độ chính xác

3.3.1. Độ lặp lại

Tiến hành sắc ký riêng biệt 6 dung dịch thử chuẩn bị ở mục 2.3.1.1. Tiêm 6 lần dung dịch chuẩn làm việc chuẩn bị ở mục 2.2.2.1.a để kiểm tra độ ổn định của hệ thống sắc ký.

3.3.2. Độ chính xác trung gian

Tiến hành như độ lặp lại vào ngày khác và kiểm nghiệm viên khác. So sánh kết quả thu được giữa 2 lần thử nghiệm. Giá trị hai kết quả phân tích phải khác nhau không có ý nghĩa thống kê (sử dụng test F với mức ý nghĩa 95%).

Bảng 2. Kết quả khảo sát độ lặp lại và độ chính xác trung gian của phương pháp

STT	Khối lượng mẫu (mg)	Diện tích pic ethanol (μV) (A)	Diện tích pic 2-propanol (μV) (B)	A/B	Hàm lượng ethanol (ppm)
Độ lặp lại (Kiểm nghiệm viên 1)					
1	1009,3	17963	299617	0,060	265,2
2	1009,4	18416	302089	0,061	270,3
3	1009,6	19141	304564	0,063	279,8
4	1007,8	18396	302365	0,061	269,7
5	1007,9	18408	304857	0,060	267,4
6	1008,0	18085	302681	0,060	264,2
Kết quả thống kê	Trung bình = 269,4 ppm; SD = 5,6166; RSD = 2,09% $\bar{X} \pm \Delta X = 269,4 \text{ ppm} \pm 5,8943$				
Độ lặp lại (Kiểm nghiệm viên 2)					
1	1008,9	18626	298663	0,0624	277,4
2	1009,0	18293	278391	0,0657	294,3
3	1008,2	19916	304645	0,0654	292,6
4	1008,2	17637	274330	0,0643	287,1
5	1008,3	17966	283425	0,0634	282,6
6	1008,3	18389	288684	0,0637	284,1
Kết quả thống kê	Trung bình = 286,4 ppm; SD = 6,3570; RSD = 2,22% ; $\bar{X} \pm \Delta X = 286,4 \pm 6,6712$				
Độ chính xác trung gian	$SD_1 = 5,6166$; $SD_2 = 6,3570$; $F_{\text{exp}} = 1,28 < F_{0,05} = 5,05$				

Độ lệch chuẩn tương đối (% RSD) kết quả định lượng của kiểm nghiệm viên 1 và 2 lần lượt là 2,09 và 2,22%, đạt yêu cầu so với tiêu chuẩn chấp nhận không quá 3,7% [4]. Mặt khác, kết quả trắc nghiệm test F: $F_{\text{exp}} = 1,28 < F_{0,05} = 5,05$ cho thấy 2 phương sai không khác nhau có ý nghĩa thống kê. Như vậy, phương pháp định lượng đạt yêu cầu về độ chính xác.

3.4. Độ đúng

Thêm chuẩn ethanol vào mẫu thử từ nồng độ ở LOQ đến 120% giới hạn cho phép (5000 ppm) là các dung dịch thẩm định độ đúng ở mục 2.2.2.1.a. Tiến hành sắc ký 9 dung dịch trên để xác định lượng tìm thấy và tính tỷ lệ phục hồi. Kết quả được trình bày trong Bảng 3.

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

Nồng độ (%)	Lượng mẫu thử (mg)	Lượng thêm vào (mg/ml)	Diện tích pic ethanol (μV) (A)	Diện tích pic 2-propanol (μV) (B)	A/B	Lượng tìm thấy (mg/ml)	Tỷ lệ phục hồi (%)
LOQ	1006,5	0,0049	6133	293660	0,021	0,0046	93,22
	1006,6	0,0049	6294	294325	0,021	0,0047	95,76
	1009,9	0,0049	6251	295648	0,021	0,0046	94,54
100	1009,8	0,2454	298452	301860	0,989	0,2454	100,02
	1010,4	0,2454	302111	306834	0,985	0,2444	99,60
	1003,6	0,2454	299157	303762	0,985	0,2445	99,62
120	1002,9	0,2945	357942	303679	1,179	0,2927	99,40
	1003,0	0,2945	368134	312728	1,177	0,2923	99,27
	1002,9	0,2945	370082	319165	1,160	0,2880	97,78
Tỷ lệ phục hồi trung bình = 97,69%; RSD = 2,61%							

Tỷ lệ phục hồi từ 93,22% - 100,02% với độ lệch chuẩn tương đối (% RSD) của tỷ lệ phục hồi là 2,61% đạt yêu cầu so với tiêu chuẩn chấp nhận từ 90,0% - 107,0% [4]. Như vậy, phương pháp định lượng đạt yêu cầu về độ đúng.

3.5. Tính tuyến tính

Chuẩn bị các dung dịch chuẩn có nồng độ từ LOQ đến 120% giới hạn cho phép (5000 ppm). Các dung dịch này có nồng độ nằm trong khoảng: 0,005 – 0,301 mg/ml. Kết quả đánh giá thống kê tính tuyến tính được trình bày trong Bảng 4.

Bảng 4. Kết quả tính tuyến tính của phương pháp định lượng

STT	Nồng độ ethanol (mg/ml)	Diện tích pic ethanol (μV) (A)	Diện tích pic 2-propanol (μV) (B)	A/B
1	0,005	6235	295546	0,021
2	0,050	53013	255828	0,207
3	0,100	101383	250546	0,405
4	0,251	268410	264036	1,017
5	0,301	399081	344331	1,159
Kết quả thống kê	y-intercept = 0,0074 ; Slope = 3,9281 ; R² = 0,9989 ; Sr = 0,0017 ; t_{b,exp} = 0,53 ; t_{a,exp} = 61,13 ; S_a = 0,06 ; S_b = 0,01			

Kết quả các giá trị hệ số tương quan $r = 0,9995$ ($> 0,999$) cho thấy có tương quan tuyến tính giữa nồng độ và tỷ lệ diện tích pic giữa ethanol và 2-propanol. Các giá trị thống kê cho thấy phương trình hồi quy là tương thích với khoảng tin cậy hẹp.

4. Kết luận

Đã xây dựng và thẩm định quy trình phân tích dung môi tồn dư ethanol thuộc nhóm 3 trong viên nén bao phim Fexostad 60 bằng phương pháp sắc ký khí mao quản sử dụng bộ tiêm mẫu lỏng. Thẩm định được tiến hành theo hướng dẫn của ICH Q2A và Q2B với các chỉ tiêu: tính đặc hiệu, độ chính xác, độ đúng. Quy trình này ít tốn thời gian, có tính đặc hiệu, cho độ đúng và chính xác cao. Có thể áp dụng để xác định dung môi trên trong các thành phẩm khác với điều kiện pic ethanol và 2-propanol tách khỏi các thành phần khác và trong mẫu thử không có chứa dung môi 2-propanol.

Tài liệu tham khảo

1. European Medicines Agency (2013), *CPMP/ICH/283/95 Impurities: Guideline for Residual Solvents, Annex II: residues of solvents used in the manufacture of finished products*, p. 6.
2. Bộ Y tế (2009), *Dược điển Việt nam IV*, Nhà xuất bản Y học, tr. PL 210-212.
3. International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use (2005), *Validation of Analytical Procedure: Text and Methodology*, pp. 1-13.
4. AOAC Official Methods of Analysis (2012), *Guidelines for Standard Method Performance Requirements*, Appendix F, AOAC International, pp. 7-9.

SUMMARY

The capillary gas chromatographic method for rapid determination of class 3 residual solvent namely ethanol in a film coated tablets has been validated. The method was performed according to the requirement of ICH validation guidelines Q2A and Q2B. Specificity, precision, accuracy, linearity, limit of quantitation were determined and good results were obtained.

(Ngày nhận bài: 08/5/2017 ; Ngày phản biện: 26/6/2017 ; Ngày duyệt đăng: 26/12/2017)

NGHIÊN CỨU PHÂN LẬP VÀ TINH CHẾ NOTOGINSENO SID R1 TỪ SAPONIN TOÀN PHẦN CỦA TAM THẮT

NGUYỄN VIỆT THÚY, NGUYỄN TUẤN ANH, TRẦN THỊ THU TRANG, ĐOÀN CAO SON
Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương

Từ khóa: Phân lập, tinh chế, Notoginsenoside R1, Saponin, Tam thất.

1. Đặt vấn đề

Vị dược liệu Tam thất là rễ của cây *Panax notoginseng* (Burk) F.H Chen, họ Nhân sâm (Araliaceae), là một trong những vị dược liệu được sử dụng phổ biến trong đông y. Thành phần hóa học chính của Tam thất là các saponin thuộc nhóm dammaran mà phần aglycon là hai chất: 20(S) protopanaxadiol và 20(S) protopanaxatriol, đã xác định được các chất như ginsenosid-Rg1, Rb1, Re, Rd, notoginsenosid R1... là các chất chiếm tỷ lệ lớn [1],[2]. Thành phần notoginsenosid R1 (N-R1) đã được Dược điển Trung Quốc quy định là một trong những chất đánh dấu trong phép thử định tính, định lượng của chuyên luận Tam thất, đã được định lượng bằng phương pháp HPLC và đưa ra giới hạn hàm lượng. Dự thảo của Dược điển Việt Nam (ĐĐVN) IV, chuyên luận Tam thất đã được bổ sung thêm phần định tính notoginsenosid R1 bằng TLC và định lượng notoginsenosid R1 bằng HPLC.

Tuy nhiên, hiện nay chúng ta chưa sẵn có các chất chuẩn đặc trưng cho Tam thất trong đó có notoginsenosid R1 để kiểm tra chất lượng dược liệu đang sử dụng và lưu hành trên thị trường. Các chất chuẩn này thường được nhập từ nước ngoài với giá cao, thời gian chờ đợi dài gây khó khăn cho công tác kiểm nghiệm. Xuất phát từ nhu cầu thực tiễn đòi hỏi phải có chất chuẩn nhằm bổ sung vào quỹ chất chuẩn ĐĐVN phục vụ công tác kiểm tra và quản lý chất lượng dược liệu Tam thất, chúng tôi đã nghiên cứu chiết xuất, phân lập và tinh chế notoginsenosid R1 từ Saponin toàn phần của Tam thất

làm chất chuẩn để kiểm tra chất lượng dược liệu.

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) 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 có độ chính xác $d = 0,1$ mg;
- 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 μ m);
- Nồi cách thủy, bộ cát 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

Các dung môi, hóa chất đã dùng đạt cấp độ tinh khiết phân tích (PA) và tinh khiết sắc ký (dùng cho HPLC).

Loại tinh khiết phân tích (PA): Methanol, aceton, cloroform, ethyl acetat, ethanol tuyệt đối, acid phosphoric, acid sulfuric, dicloromethan.

Loại tinh khiết sắc ký (HPLC): Acetonitril.

2.1.3. Chất chuẩn

- Chất chuẩn sử dụng là chuẩn notoginsenosid R1 nguồn gốc Trung Quốc, SKS 110745-200617, hàm lượng 100% tính theo nguyên trạng.

2.2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Đối tượng nghiên cứu

Saponin toàn phần của Tam thất được điều chế từ nguyên liệu là rễ và thân rễ của loài *Panax notoginseng* (Burk) F.H Chen, được quy định trong Dược điển Trung quốc 2010 [7] như sau: Dược liệu được nghiền nhỏ, đun hồi lưu với ethanol 70%, lọc lấy dịch chiết và thu hồi dung môi trong chân không lấy cặn. Cặn được đưa lên cột đã nhồi sẵn chất hấp phụ không phân cực hoặc phân cực yếu với chất mang là styren đồng trùng hợp, rửa giải với nước và ethanol 80%. Loại bỏ nước, giữ lại dịch rửa giải ethanol 80%, bốc hơi trong chân không đến khô.

Về cảm quan, nguyên liệu có màu gần trắng hoặc vàng nhạt, vị đắng nhẹ và hơi ngọt.

Thành phần của Saponin toàn phần của Tam thất bao gồm: N-R1 khoảng 5%, ngoài ra còn có 4 hoạt chất khác đó là ginsenosid (G) Rg1, Re, Rb1, Rd. Hàm lượng saponin toàn phần khoảng 75% (đối với dạng uống) đến 85% (đối với dạng tiêm truyền).

Nguyên liệu của đề tài là Saponin toàn phần của Tam thất, được chúng tôi mua trên thị trường. Kiểm tra sự có mặt của Notoginsenosid R1; sơ bộ định lượng hàm lượng N-R1 theo Dược điển Trung quốc 2010 bằng phương pháp HPLC, sử dụng nguyên liệu có hàm lượng N-R1 $\geq 5,0\%$ đem đi phân lập N-R1.

- Tên Latinh: *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. Phương pháp phân lập và tinh chế notoginsenoside R1 từ Saponin toàn phần của Tam thất

- *Phân lập: Sử dụng phương pháp sắc ký cột qua 2 bước.*

Bước 1: Sử dụng pha tĩnh hấp phụ qua hai giai đoạn (silica gel của Merck loại 63 – 200 μm và 40 – 63 μm) để phân lập các thành phần hoạt chất. Khảo sát lựa chọn dung môi chạy cột thích hợp. Kiểm tra các phân đoạn bằng SKLM, tìm phân đoạn có mặt N-R1. Xác định hàm lượng N-R1 phân lập được bằng phương pháp HPLC [7].

Bước 2: Sử dụng pha tĩnh hấp phụ C18 của Merck (loại 140 μm) để phân lập N-R1. Khảo sát lựa chọn dung môi chạy cột thích hợp. Kiểm tra các phân đoạn bằng SKLM, tìm phân đoạn có mặt N-R1. Xác định hàm lượng N-R1 phân lập được bằng phương pháp HPLC [7].

- *Tinh chế:* Sử dụng phương pháp sắc ký cột pha đảo với pha tĩnh C18 để tinh chế N-R1 từ sản phẩm của quá trình phân lập để thu được chất chuẩn có hàm lượng phù hợp. Kiểm tra N-R1 tinh chế được bằng phương pháp SKLM và HPLC [7].

2.2.2.2. Xác định cấu trúc, nhận dạng và đánh giá độ tinh khiết của chất chiết được.

- *Xác định cấu trúc và nhận dạng:* Từ chất tinh khiết đã tinh chế được, xác định cấu trúc bằng các phương pháp hiện đại như: xác định điểm chảy, đo phổ UV-VIS, IR, NMR (^1H , ^{13}C , DEPT), xác định khối lượng phân tử bằng LC-MS.

- *Định tính, định lượng và đánh giá độ tinh khiết:* Sử dụng phương pháp HPLC (mục 3.2) so sánh với N-R1 chuẩn để định tính, định lượng và đánh giá độ tinh khiết của chất chiết được.

3. Kết quả và bàn luận

3.1. Quy trình phân lập và tinh chế N-R1

3.1.1. *Phân lập: Quá trình phân lập qua hai bước:*

Bước 1: Phân lập thô qua hai giai đoạn.

Giai đoạn 1: Sử dụng silica gel có kích thước hạt 63 – 200 μm dung môi rửa giải là dicloromethan - methanol - nước với độ phân cực tăng dần hứng các phân đoạn có chứa N-R1. Kết quả thu được R1 ở phân đoạn dicloromethan - methanol - nước (60 : 10 : 1).

Giai đoạn 2: Sử dụng silica gel có kích thước hạt 40 – 63 μm với dung môi rửa giải là hỗn hợp dicloromethan - methanol - nước có độ phân cực tăng dần hứng các phân đoạn có chứa N-R1. Kết quả thu được N-R1 ở phân đoạn dicloromethan - methanol - nước (60 : 10 : 1).

Bước 2: Phân lập tinh: Sử dụng phương pháp sắc ký cột với pha đảo YMC RP-18 có kích thước hạt 140 μm với dung môi rửa giải là hỗn hợp methanol- nước có độ phân cực tăng dần đã tách được N-R1 ra khỏi các thành phần khác. Kết quả thu được N-R1 ở phân đoạn methanol - nước (55 : 45).

Quy trình phân lập đã xây dựng được dễ thực hiện, ổn định và sản phẩm phân lập cho hàm lượng N-R1 khoảng 82,13%.

3.1.2. Tinh chế

Sản phẩm của quá trình phân lập được tinh chế qua cột sắc ký pha đảo YMC-RP18 với dung môi rửa giải là hỗn hợp aceton - nước (40 : 60) thu được sản phẩm là N-R1 có dạng bột vô định hình màu trắng, hàm lượng 97,32% (HPLC) (mục 3.2). Hiệu suất của toàn bộ quá trình phân lập và tinh chế là 57,5%.

3.2. Xác định cấu trúc, nhận dạng và đánh giá độ tinh khiết của chất tinh chế được

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

3.2.1. Tính chất: Bột vô định hình màu trắng.

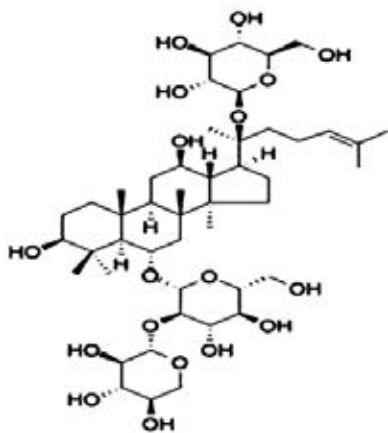
3.2.2. Nhiệt độ nóng chảy:

Chất tinh chế được sấy khô ở 50°C đến khối lượng không đổi, để trong bình hút ẩm có silica gel trong 24 giờ, nghiền mịn rồi đem xác định nhiệt độ nóng chảy. Kết quả điểm chảy đo được là 215°C, phù hợp với nhiệt độ nóng chảy của N-R1 theo tài liệu tham khảo được là 215°C – 217°C [5].

3.2.3. Phổ hấp thụ tử ngoại khả kiến (UV-VIS) và phổ hồng ngoại (IR) đều trùng với các phổ của chất chuẩn N-R1. Ngoài ra phổ IR cho các đỉnh hấp thụ đặc trưng cho các nhóm (-OH) ở 3419, (-CH) ở 2924, (-CO) ở 1646 cm^{-1} và các đỉnh hấp thụ mạnh đặc trưng cho -CH=CH- vòng thơm ở 1456, 1385, 1073, 1043, 891, 668 cm^{-1} .

3.2.4. Phổ cộng hưởng từ hạt nhân

Phổ cộng hưởng từ hạt nhân được ghi bao gồm các phổ: Phổ $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$, DEPT, HMBC và HSQC. Từ các kết quả phân tích của các phổ trên kết hợp với tài liệu tham khảo [3], chất chiết được chính là N-R1, chính xác và hoàn toàn phù hợp với cấu trúc của phân tử N-R1 sau đây:



3.2.5. Phổ khối

Để xác định chính xác pic phân tử của chất tinh chế được bằng thiết bị LC-MS, trong quá trình bắn phá mẫu bằng phương pháp ESI, tác nhân Na^+ đã được sử dụng. Kết quả đã ghi được 1 phổ chỉ chứa pic ion phân tử có giá trị $[\text{M}+\text{Na}]^+ m/z = 955,52$ dalton. Như vậy số khối m/z của chất tinh chế được là $955,52 - 23 = 932,52$ dalton. Do $z = 1$ nên khối lượng phân tử của chất tinh chế được là 932,52 dalton, xấp xỉ 933, phù hợp với công thức phân tử của N-R1 là $\text{C}_{47}\text{H}_{80}\text{O}_{18}$ và phù hợp với các tài liệu đã tham khảo được [4],[6].

3.2.6. Định lượng bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC)

Điều kiện sắc ký:

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

- Detector DAD: 203 nm

- Pha động: Acetonitril – Nước (22:78)

- Tốc độ dòng: 1,5 ml/phút

- Thể tích tiêm: 20 μl

- Nhiệt độ phân tích: Nhiệt độ phòng thí nghiệm

- Thời gian phân tích: 20 phút

- Dung dịch thử: Hòa tan một lượng mẫu thử trong methanol để được dung dịch có nồng độ khoảng 0,15 mg/ml.

- Dung dịch chuẩn: Hòa tan một lượng mẫu chuẩn notoginsenosid R1 trong methanol để được dung dịch có nồng độ khoảng 0,15 mg/ml.

Tiến hành:

- Kiểm tra khả năng thích hợp của hệ thống sắc ký: Tiến hành sắc ký với dung dịch chuẩn, ghi nhận sắc ký đồ, thời gian lưu và diện tích của pic chính. Độ lệch chuẩn tương đối của diện tích pic N-R1 từ 6 lần tiêm lặp lại không lớn hơn 2,0%. Hệ số bất đối của pic N-R1 không được lớn hơn 1,5; số đĩa lý thuyết không nhỏ hơn 4000.

- Tiêm riêng biệt dung dịch thử và dung dịch chuẩn vào hệ thống sắc ký, tiến hành sắc ký theo điều kiện đã mô tả, ghi lại sắc ký đồ.

- Tính hàm lượng phần trăm của N-R1 trong mẫu thử theo nguyên trạng dựa theo diện tích pic chính của dung dịch thử và dung dịch chuẩn, độ pha loãng của dung dịch thử và dung dịch chuẩn, hàm lượng N-R1 chuẩn.

Kết quả: Hàm lượng của notoginsenosid R1 chiết được có hàm lượng 97,32% tính theo nguyên trạng.

4. Kết luận

Đã xây dựng được quy trình phân lập và tinh chế N-R1 tương đối đơn giản với các hóa chất và dung môi phổ biến, sẵn có, ít độc, dễ dàng áp dụng tại các phòng thí nghiệm. Với nguyên liệu ban đầu dễ kiếm (mua trên thị trường), với giá thành thấp và khối lượng ít (50 g), chúng tôi đã

tinh chế được lượng chất N-R1 tinh khiết là 2,05 g (hiệu suất toàn bộ quá trình phân lập và tinh chế là 57,5%) với hàm lượng 97,32% tính theo nguyên trạng.

Đã tiến hành xác minh cấu trúc của N-R1 tinh chế được dựa trên phân tích các thông số hóa lý như tính chất, nhiệt độ nóng chảy và các phương pháp phổ cộng hưởng từ hạt nhân, phương pháp phân tích khối phổ, phương pháp quang phổ hồng ngoại. Kết quả thực nghiệm đã khẳng định công thức phân tử cũng như cấu trúc của N-R1 tinh chế được là phù hợp với các kết quả nghiên cứu đã được công bố.

Tài liệu tham khảo

1. Bộ môn Dược liệu, Trường Đại học Dược Hà Nội (2007), *Bài giảng dược liệu*, tập 1, Nhà xuất bản Y học.
2. Đỗ Tất Lợi (1999), *Những cây thuốc và vị thuốc Việt Nam*, Nhà xuất bản Y học.
3. Hong-Xiang Sun, Yuehua Chen, and Yiping Ye (2006) “Ginsenoside Re and Notoginsenoside R1: Immunologic Adjuvants with Low Haemolytic Effect”, *Chemistry & Biodiversity* - Vol 3.
4. Jing Wang, Chun-ming Liu, Li Li and He-long Bai (2010), “Isolation of Four High-purity Dammarane Saponins from Extract of Panax notoginseng by Centrifugal Partition Chromatography Coupled with Evaporative Light Scattering Detection in One Operation”, *Phytochem. Anal.* 2011, 22, (263–267).
5. Jun Zhou, Ming-zhu Wu, Shigenori Taniyashu, Hiromichi Besso, Osamu Tanaka, Yuichiro Sauruwatari, Tohru Fuwa (1981), “Damarane-Saponins of Sanchi-Ginseng, Roots of Panax notoginseng (Burk) F.H Chen (Araliaceae): Structure of New Saponins, Notoginsenoside-R1 and -R2 and Identification of Ginsenosides-Rg2 and -Rh1”, *Chem. Pharm. Bull.*, 29, (2844-2850).
6. Qizhen Du, Gerold Jerz, Reiner Waibel, Peter Winterhalter (2003), “Isolation of dammarane saponin from Panax notoginseng by high-speed counter – current chromatography”, *Journal of Chromatography A*, 1008, (173-180).
7. *The People of Republic of China Pharmacopoeia* (2010), volume I.

SUMMARY

The isolation, purification of Notoginsenoside R1 from Panax notoginseng saponins are bought in the market. Notoginsenoside R1 was isolated and purified by chromatographic column method using silica gel (the particle size of the silica gel is in the range of 40 – 200 μ m) and reverse phases (RP18) as station phases with the suitable resolution solvent-systems.

The Notoginsenoside R1 structure of final products is confirmed by IR, MS and NMR spectrum. The content of Notoginsenoside R1 obtained is 97.32% (determined by HPLC). This product can be used to control the quality of herbal materials and drugs which are suspected to contain the Notoginsenoside R1.

(Ngày nhận bài: 20/6/2017 ; Ngày phản biện: 18/8/2017; Ngày duyệt đăng: 15/9/2017)

THÔNG TIN KHOA HỌC - TIN TỨC

DANH MỤC THUỐC KHÔNG ĐẠT CHẤT LƯỢNG ĐÃ ĐƯỢC BỘ Y TẾ XỬ LÝ TỪ 01/06/2017 ĐẾN 30/11/2017

HÀ THỊ MINH CHÂU
Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương

Để tăng cường giám sát các cơ sở sản xuất, kinh doanh trong việc thực hiện thu hồi thuốc vi phạm chất lượng, đồng thời giúp cho các đồng nghiệp có thêm thông tin về những hoạt chất và các tên thuốc cần lưu ý về chất lượng, chúng tôi tập hợp danh mục các thuốc vi phạm chất lượng từ 01/06/2017 đến 30/11/2017 mà Bộ Y tế đã ra văn bản thông báo thuốc giả, thuốc bị thu hồi, rút số đăng ký của thuốc và đình chỉ lưu hành: 25 thuốc bị đình chỉ và thu hồi, rút số đăng ký của 74 thuốc.

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

Danh mục thuốc bị rút số đăng ký từ ngày 01/06/2017 đến ngày 30/11/2017

STT	Tên thuốc	Số đăng ký	Tên cơ sở sản xuất	Tên cơ sở đăng ký	Vấn bản xử lý	Hình thức xử lý
1	Victrelis	VN-19710-16	MSD International GmbH	Merck Sharp & Dohme (Asia) Ltd.	Quyết định số 397/QĐ-QLD ngày 19/09/2017	Rút SĐK tự nguyện
2	Nuvaring	VN-16839-13	N. V Organon	Như trên	Như trên	Như trên
3	Cedax	VN-19254-15	Merck Sharp & Dohme Corp	Như trên	Như trên	Như trên
4	Puregon	QLSP-0787-14	Vetter Pharma-Fertigung GmbH&Co. KG	Như trên	Như trên	Như trên
5	Isentress	VN2-509-16	MSD International GmbH	Như trên	Như trên	Như trên
6	Celestone Tablet	VN-19270-15	PT. Merck Sharp & Dohme Pharma Tbk	Như trên	Như trên	Như trên
7	Peptiose injection	VN-17460-13	Theragen Etex Co., Ltd	Il Hwa Co., Ltd	Như trên	Như trên
8	Ilsolu Injection	VN-19479-15	Theragen Etex Co., Ltd	Il Hwa Co., Ltd	Như trên	Như trên
9	Vancomycin GSK 1g	VN-16768-13	Agila Specialities	GlaxoSmithKline Pte., Ltd	Như trên	Như trên
10	Gridokline	VN-17960-14	Dr. Reddys Laboratories Ltd.	Như trên	Như trên	Như trên
11	Pegasy	QLSP-864-15	Catalent Belgium SA	F. Hoffmann-La Roche Ltd.	Như trên	Như trên
12	Pegasy	QLSP-863-15	Catalent Belgium SA	Như trên	Như trên	Như trên
13	Recormon	QLSP-820-14	Roche Diagnostics GmbH	Như trên	Như trên	Như trên
14	Rocephin 250mg I.V	VN-17037-13	F. Hoffmann-La Roche Ltd.	Như trên	Như trên	Như trên
15	Ropegra	QLSP-1009-17	Như trên	Như trên	Như trên	Như trên
16	Roferon-A	QLSP-0722-13	Như trên	Như trên	Như trên	Như trên
17	Etexcefuroxime Injection	VN-17928-14	Theragen Etex Co., Ltd	Hawon Pharmaceutical Corporation	Như trên	Như trên
18	Sexapil	VD-24882-16	Công ty cổ phần Trường Thọ	Công ty cổ phần Trường Thọ	Như trên	Như trên
19	Newgengenetil Inj.	VN-19573-16	New Gene Pharm Inc.	Harbin Pharmaceutical Group Co., Ltd General Pharm.		
20	Newcixone Inj. 1g	VN-8459-09	Dae Han New Pharm Co., Ltd	Binex Co., Ltd.	Như trên	Như trên
21	Etexvalix Vaginal Soft Capsule	VN-9013-09	Theragen Etex Co., Ltd	Như trên	Như trên	Như trên

22	Etexaroxi cap. 500mg	VN-5860-08	Như trên	Như trên	Như trên	Như trên
23	Newginkonek soft cap.	VN-4178-07	Union Korea Pharm. Co., Ltd.	Như trên	Như trên	Như trên
24	Qlaira	VN2-437-15	Bayer Weimar GmbH und Co. KG	Bayer (South East Asia) Pte., Ltd.	Như trên	Như trên
25	Elomet	VN-19271-15	PT. Meerck Sharp Dohme Pharma Tbk	Như trên	Như trên	Như trên
26	Melgez 7.5mg tablets	VN-18492-14	Delorbis Pharmaceuticals Ltd.	Delorbis Pharmaceuticals Ltd.	Như trên	Như trên
27	Protase Tab.	VD-5071-08	Công ty TNHH Thương mại và Dược phẩm, bao bì y tế Quang Minh	Công ty TNHH Thương mại và Dược phẩm, bao bì y tế Quang Minh	Quyết định số 416/QĐ-QLD ngày 21/09/2017	Rút SDK, đính chỉ lưu hành và thu hồi toàn quốc
28	Brosafe	VD-12452-10	Công ty cổ phần Dược Trung ương Mediplantex	Công ty cổ phần Dược Trung ương Mediplantex	Như trên	Như trên
29	Pedonase	VD-18019-12	Như trên	Như trên	Như trên	Như trên
30	Kimose	VD-15123-11	Công ty cổ phần Boston Việt Nam	Công ty cổ phần Boston Việt Nam	Như trên	Như trên
21	Stomedon	VD-16099-11	Công ty cổ phần Pymepharco	Công ty cổ phần Pymepharco	Như trên	Như trên
32	Trizodom	VD-18083-12	Công ty Liên doanh Meyer- BPC	Công ty Liên doanh Meyer- BPC	Như trên	Như trên
33	Molingas	VD-18259-13	Công ty cổ phần Boston Việt Nam	Công ty cổ phần Boston Việt Nam	Như trên	Như trên
34	Prazodom	VD-20407-14	Công ty cổ phần BV Pharma	Công ty cổ phần BV Pharma	Như trên	Như trên
35	Bipando	VD-20512-14	Công ty cổ phần SPM	Công ty cổ phần SPM	Như trên	Như trên
36	Defanton	VD-21002-14	Như trên	Như trên	Như trên	Như trên
37	Lomerate	VD-18823-13	Như trên	Như trên	Như trên	Như trên
38	Ausmezol-D	VD-21208-14	Công ty cổ phần Dược Hà Tĩnh	Công ty cổ phần Dược Hà Tĩnh	Như trên	Như trên
39	Othevinco	VD-23442-15	Công ty cổ phần Danapha	Công ty cổ phần Danapha	Như trên	Như trên
40	Domeloc	VD-23650-15	Công ty cổ phần Dược phẩm Sao Kim	Công ty cổ phần Dược phẩm Sao Kim	Như trên	Như trên
41	Domprenzil	VD-24169-16	Công ty TNHH Dược phẩm Glomed	Công ty TNHH Dược phẩm Glomed	Như trên	Như trên
42	Dompan forte	VN-7255-08	Medley Pharmaceuticals Ltd.	Medley Pharmaceuticals Ltd.	Như trên	Như trên

43	Dompan	VN-8824-09	Như trên	Như trên	Như trên	Như trên
44	Digazo	VN-5223-10	APC Pharmaceuticals & Chemicals Ltd.	APC Pharmaceuticals & Chemicals Ltd.	Như trên	Như trên
45	Panido - D	VN-5250-10	Shine Pharmaceutical Ltd.	Công ty TNHH Thương mại Thanh Danh	Như trên	Như trên
46	Ornicap - D	VN-11209-10	Micro Labs Limited	Micro Labs Limited	Như trên	Như trên
47	L-Cid-D	VN-15375-12	Gracure Pharmaceuticals Ltd.	Công ty TNHH Thiên Thành	Như trên	Như trên
48	Lanzee-DM	VN-15697-12	Zee Laboratories	Zee Laboratories	Như trên	Như trên
49	G-Pandom	VN-16537-13	Medibios Laboratories Pvt., Ltd.	Shine Pharmaceuticals Ltd.	Như trên	Như trên
50	Limzer	VN-17519-13	Inventia Healthcare Private Ltd.	Mega Lifesciences Public Company Limited	Như trên	Như trên
51	Digazo	VN-17821-14	Atra Pharmaceuticals Pvt. Ltd	Công ty TNHH Reliv Pharma	Như trên	Như trên
52	Uiceburg D	VN-19327-15	Rhydburg Pharmaceuticals Limited	Rhydburg Pharmaceuticals Limited	Như trên	Như trên
53	Strikase	VN-6113-08	BMI Korea Co., Ltd.	Dasan Medichem Co., Ltd.	Như trên	Như trên
54	Gimof	VN-7076-08	Dongsung pharm. Co., Ltd.	Công ty TNHH SXTMDV và KDDP Vĩnh An An	Như trên	Như trên
55	Trimelan Tab.	VN-7801-09	Samik Pharmaceutical Co., Ltd.	Pharmix Corporation	Như trên	Như trên
56	Belarasin	VN-7802-09	Seoul Pharm Co., Ltd	Như trên	Như trên	Như trên
57	Orzynase Tablet	VN-7901-09	Chunggei Pharm Co., Ltd.	Boram Pharma Co., Ltd.	Như trên	Như trên
58	Probilase Tablet	VN-8389-09	Korea Arico Pharm. Co., Ltd.	Như trên	Như trên	Như trên
59	Berovase Tablet	VN-5037-10	Korea Core Pharm. Co., Ltd.	Như trên	Như trên	Như trên
60	Brotrin Tab.	VN-8976-09	Union Korea Pharm. Co., Ltd,	Young II Pharm. Co., Ltd.	Như trên	Như trên
61	Bromtab Tablet	VN-10234-10	Efroze Chemical Industries (Pvt) Ltd.	Efroze Chemical Industries (Pvt) Ltd.	Như trên	Như trên
62	Kotase Tab.	VN-11925-11	Korea Pharma Co., Ltd.	Kolon Global Corporation	Như trên	Như trên
63	Daeshinprotase	VN-13103-11	Dae Hwa Pharm Co., Ltd.	Dae Hwa Pharm Co., Ltd.	Như trên	Như trên
64	Paticur	VN-13399-11	Chunggei Pharm Co., Ltd.	TDS Pharm. Corporation	Như trên	Như trên
65	Brotlase	VN-13518-11	Kolmar Pharma Co., Ltd.	Kolmar Pharma Co., Ltd.	Như trên	Như trên

66	Kimoral S	VN-14762-12	Chunggei Pharm Co., Ltd.	Công ty cổ phần Dược phẩm APAC	Như trên	Như trên
67	Bonxicam	VN-15497-12	Chunggei Pharm Co., Ltd.	Kukje Pharma Ind. Co., Ltd.	Như trên	Như trên
68	Phartino	VN-15951-12	Samik Pharmaceutical Co., Ltd.	Công ty cổ phần Dược phẩm Đất Việt	Như trên	Như trên
69	Beecerazon Inj	VN-19489-15	Samik Pharmaceutical Co., Ltd.	Kukje Pharma Ind. Co., Ltd.	Quyết định số 442/QĐ-QLD ngày 06/10/2017	Như trên
70	Emileva Inj	VN-18919-15	Như trên	Như trên	Như trên	Như trên
71	Beecefron Inj	VN-18607-15	Như trên	Như trên	Như trên	Như trên
72	Perikacin	VN-18733-15	Như trên	Như trên	Như trên	Như trên
73	Samik Amikacin	VN-17999-14	Như trên	Như trên	Như trên	Như trên
74	Hepa-World	VN-17498-13	Như trên	Như trên	Như trên	Như trên

Danh mục đình chỉ lưu hành thuốc từ ngày 01/06/2017 đến ngày 30/11/2017

STT	Tên thuốc	Số lô	Ngày sản xuất	Hạn dùng	Số đăng ký	Tên cơ sở sản xuất	Tên cơ sở đơn vị nhập khẩu	Chỉ tiêu không đạt	Văn bản xử lý	Hình thức xử lý
1	Thuốc bột Viêm tấy - V.A	28301216		30/12/2018	V47-H12-16	Cơ sở Đông dược Vĩnh An		Định tính tam thất và Giới hạn nhiễm khuẩn	Công văn: số 8650/QLD-CL ngày 21/06/2017	Đình chỉ lưu hành và thu hồi toàn quốc
2	Viên nén Colchicine 1 mg	OC106	02/07/15	01/07/18	VN-11342-10	Synmedic Laboratories (Ấn Độ)	Công ty TNHH một thành viên Dược Sài Gòn (Sarpharco)	Tạp chất liên quan	Công văn: số 8651/QLD-CL ngày 21/06/2017	Như trên
3	Viên nang Omeprazole Delayed Release Capsule	BNC0716032		29/07/2019	VN-14944-12	Brawn Laboratories Ltd. (India)	Công ty cổ phần Dược phẩm Trung ương Codupha	Đồng đều hàm lượng và Định lượng	Công văn: số 8653/QLD-CL ngày 21/06/2017	Như trên
4	Viên nén bao phim Cefuroxime 250mg	011116	23/11/2016	23/11/2019	VD-22939-15	Công ty cổ phần Dược phẩm Dân		Định lượng	Công văn: số 9341/QLD-CL ngày 03/07/2017	Như trên

5	Viên nén Metrothabi	021116		201119	VD-22268-15	Công ty cổ phần Dược Vật tư Y tế Thái Bình				Độ hòa tan	Công văn: số 9346/QLD-CL ngày 04/07/2017	Như trên
6	Viên nén Alphachy motrypsin BVP	03B17	27/02/2017	27/02/2019	VD-132220-10	Công ty cổ phần BV Pharma				Định lượng	Công văn: số 9360/QLD-CL ngày 04/07/2017	Như trên
7	Thuốc bột uống Cefuroxim TVP	015		12/06/2018	VD-11749-10	Công ty cổ phần Dược phẩm TV Pharm				Định lượng	Công văn: số 9474/QLD-CL ngày 06/07/2017	Như trên
8	Viên nén Agi - Beta	00215		15/06/2018	VD-11491-10	Công ty cổ phần Dược phẩm Agimexpharm				Độ hòa tan	Công văn: số 10887/QLD-CL ngày 28/07/2017	Như trên
9	Viên nén bao phim Korus Albenazole tab. 400mg	16107008	13/12/2016	12/12/2019	VN-15569-12	Hankook Korus Pharm Co., Ltd.	Công ty cổ phần Dược phẩm Vimedimex			Độ hòa tan	Công văn: số 11361/QLD-CL ngày 03/08/2017	Như trên
10	Viên nén bao phim Cetirizine	409N6		240619	VD-16746-12	Chi nhánh công ty Cổ phần Armephaco - Xi nghiệp Dược phẩm 150 (Cophavina)				Độ hòa tan	Công văn: số 15045/QLD-CL ngày 26/09/2017	Như trên
11	Viên nén bao phim Necpod-100	LNTA16001	22/04/2016	21/04/2018	VN-16655-13	Nectar Lifesciences Limited India	Công ty cổ phần Dược Trung ương 3			Độ hòa tan	Công văn: số 13323/QLD-CL ngày 29/08/2017	Như trên
12	Viên nang cứng Lanspro-30	H244	24/11/2016	23/05/2019	VN-15158-12	XL Laboratories Pvt., Ltd. (India)	Công ty cổ phần Thương mại Dược phẩm Hà Lan			Độ hòa tan và Định lượng	Công văn: số 13866/QLD-CL ngày 07/09/2017	Như trên
13	Viên nang Miepraz	5121762	24/08/2015	23/02/2018	VN-12243-11	Alkem Laboratories Ltd. India	Công ty TNHH MTV Dược Sài Gòn (SAPHARCO)			Độ hòa tan	Công văn: số 14629/QLD-CL ngày 19/09/2017	Như trên
14	Viên nén Darius 4	1512001		03/12/2018	VD-18821-13	Công ty cổ phần S.P.M				Độ hòa tan	Công văn: số 14630/QLD-CL ngày 19/09/2017	Như trên

15	Viên nén Vitamin B1 1/E7	050216	03/02/16	03/02/18	VD-13822-11	Công ty cổ phần Dược phẩm Hà Nội			Định lượng	Công văn: số 14631/QLD-CL ngày 19/09/2017	Như trên
16	Viên nén Oliveirim	16005		27/12/2019	VD-21062-14	Công ty TNHH Dược phẩm Đạt Vi Phú			Định lượng	Công văn: số 14701QLD-CL ngày 20/09/2017	Như trên
17	Viên bao đường Hoạt huyết dưỡng não	01.03.2017	02/03/2017	01/03/2020	VD-24472-16	Công ty cổ phần Thương mại Dược Vật tư Y tế Khải Hà			Định lượng, tỷ lệ các thành phần của cao bạch quả	Công văn: số 15326/QLD-CL ngày 29/09/2017	Như trên
18	Viên nén bao phim Olecin - 500	TE-5399		05/11/2018	VN-11490-10	Gracure Pharmaceutical Ltd. (India)	Công ty cổ phần dược Trung ương 3		Định tính và khối lượng trung bình viên	Công văn: số 17158/QLD-CL ngày 20/10/2017	Như trên
19	Viên nén bao phim Olecin - 500	TE-5401		6/11/2018	VN-11490-10	Như trên	Như trên		Như trên	Như trên	Như trên
20	Viên nén bao phim tan trong ruột Denizen	0560215	30/7/2015	30/7/2018	VD-10027-10	Công ty cổ phần Dược Minh Hải			Định lượng	Công văn: số 17466/QLD-CL ngày 26/10/2017	Như trên
21	Viên nén dài Prednisolon 5mg	010317		04/03/2020	VD-13888-11	Công ty cổ phần Dược phẩm Tipharco			Độ hòa tan	Công văn: số 17464/QLD-CL ngày 26/10/2017	Như trên
22	Viên nang cứng Sarinex	M-005		21/12/19	VN-11567-10	Efroze chemical industries (Pvt) Ltd, Pakistan	Công ty CPDP Hà Tây		Độ hòa tan	Công văn: số 18044/QLD-CL ngày 03/11/2017	Như trên
23	Viên nang cứng Limzer	LIZ0193		01/04/2019	VN-17519-13	Inventia Healthcare Pvt. Ltd. India	Công ty cổ phần dược phẩm Thiết bị Y tế Hà Nội (Hapharco)		Độ hòa tan và Tạp chất liên quan	Công văn: số 18457QLD-CL ngày 09/11/2017	Như trên
24	Viên nang cứng Limzer	LIZ0196		05/2019	VN-17519-13	Như trên	Như trên		Như trên	Như trên	Như trên
25	Viên nang cứng Cầm xuyên hương	01	15/09/2016	14/09/2019	V483-H12-10	Công ty TNHH Dược phẩm Hà Thành			Đồng đều khối lượng	Công văn: số 19971QLD-CL ngày 28/11/2017	Như trên

MỤC LỤC

	<i>Trang</i>
● Nghiên cứu khoa học	
- Nghiên cứu định tính, định lượng đồng thời 12 Glucocorticoid trong kem bôi da mỹ phẩm bằng phương pháp HPLC. <i>LÊ THỊ HƯỜNG HOA, HOÀNG THANH TÂM, ĐOÀN CAO SƠN, THÁI NGUYỄN HÙNG THU</i>	1
- Phương pháp tối ưu hóa điều kiện tạo tạp Enalapril diketopiperazin trong xác định tạp chất liên quan của Enalapril. <i>LÊ THỊ QUỲNH NGA, TRẦN THỊ HỒNG ANH, NGUYỄN THU PHƯƠNG</i>	8
- Xây dựng phương pháp định lượng đồng thời Erythromycin stearat, Sulfamethoxazol và Trimethoprim bằng điện di mao quản vùng. <i>NGUYỄN THỊ THÙY LINH, VÕ VĂN BÌNH, NGÔ MINH THÚY, LÊ ĐÌNH CHI</i>	12
- Xác định dung môi Ethanol tồn dư trong thuốc bằng phương pháp sắc ký khí mao quản. <i>PHAN NGUYỄN TRƯỜNG THẮNG, HÀ MINH HIỀN</i>	18
- Nghiên cứu phân lập và tinh chế Notoginsenosid R1 từ Saponin toàn phần của Tam thất. <i>NGUYỄN VIỆT THÚY, NGUYỄN TUẤN ANH, TRẦN THỊ THU TRANG, ĐOÀN CAO SƠN</i>	22
● Thông tin khoa học - Tin tức	
- Thuốc không đạt chất lượng đã được Bộ Y tế xử lý từ 01/6/2017 đến 30/11/2017. <i>HÀ THỊ MINH CHÁU</i>	25

CONTENTS

	<i>Page</i>
● Scientific researches	
- Study on simultaneous identification and determination of 12 Glucocorticoids in cosmetic skin cream by HPLC method. <i>LÊ THỊ HƯỜNG HOA, HOÀNG THANH TÂM, ĐOÀN CAO SƠN, THÁI NGUYỄN HÙNG THU</i>	1
- Optimal conditions for creating Enalapril diketopiperazin in determining the related substances of Enalapril. <i>LÊ THỊ QUỲNH NGA, TRẦN THỊ HỒNG ANH, NGUYỄN THU PHƯƠNG</i>	8
- Development of Capillary Zone Electrophoresis method for simultaneous determination of Erythromycin stearate, Sulfamethoxazole and Trimethoprim. <i>NGUYỄN THỊ THÙY LINH, VÕ VĂN BÌNH, NGÔ MINH THÚY, LÊ ĐÌNH CHI</i>	12
- Determination of residual solvent namely Ethanol in drug by Capillary Gas Chromatographic method. <i>PHAN NGUYỄN TRƯỜNG THẮNG, HÀ MINH HIỀN</i>	18
- Study on isolation and purification of Notoginsenoside R1 from total Saponin of the <i>Panax notoginseng</i> . <i>NGUYỄN VIỆT THÚY, NGUYỄN TUẤN ANH, TRẦN THỊ THU TRANG, ĐOÀN CAO SƠN</i>	22
● Technical information – News	
- Substandard pharmaceuticals recalled from June 2017 to December 2017 on decision of Ministry of Health. <i>HÀ THỊ MINH CHÁU</i>	25