

NGHIÊN CỨU ĐỊNH LƯỢNG NGUYÊN LIỆU SORAFENIB TOSYLAT BẰNG PHƯƠNG PHÁP HPLC

LÊ ĐÌNH KHÁNH, NGUYỄN THỊ HOA, TRẦN THỊ BÍCH VÂN
Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương

Từ khóa: HPLC, sorafenib tosylat, thẩm định phương pháp phân tích

1. Đặt vấn đề

Sorafenib tosylat là một hoạt chất được sử dụng để điều trị sự phát triển ung thư tế bào thận (RCC; một loại ung thư bắt đầu trong thận) và ung thư biểu mô tế bào gan (một loại bệnh ung thư gan mà không thể điều trị bằng phẫu thuật) [6]. Hiện nay trên thị trường chỉ có biệt dược gốc NEXAVAR của hãng Bayer Healthcare chứa hoạt chất Sorafenib. Thuốc này sẽ hết quyền bảo hộ vào năm 2020, khi đó nhu cầu sản xuất thuốc generic có chứa hoạt chất Sorafenib là rất cao. Mặt khác chưa có chuyên luận về Sorafenib trong các Dược điển hiện hành [1],[2],[3]. Vì vậy để đáp ứng nhu cầu kiểm nghiệm nguyên liệu Sorafenib tosylat, chúng tôi xin giới thiệu kết quả nghiên cứu định lượng nguyên liệu Sorafenib tosylat bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao.

2. Thực nghiệm

2.1. Thiết bị, hóa chất, chất chuẩn

2.1.1. Thiết bị, dụng cụ

Đã được hiệu chuẩn theo quy định của ISO/IEC 17025.
- Máy HPLC Agilent 1260 với detector DAD;
- Cân phân tích Mettler Toledo AB 204 có độ chính xác 0,1 mg;
- Các dụng cụ thủy tinh chính xác: bình định mức, pipet.

2.1.2. Hóa chất, thuốc thử, chất chuẩn

- Chuẩn Sorafenib tosylat của hãng Maya, Hàm lượng: 99,2% (nguyên trạng); Số lô: Maya-CR-6413
- Hóa chất: Acetonitril, methanol, trifluoroacetic acid và nước loại dùng cho HPLC.

2.2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Đối tượng nghiên cứu

Nguyên liệu Sorafenib tosylat; nguồn gốc: Học viện kỹ thuật quân sự; Số lô: 01; Ngày sản xuất: 12/2016.

2.2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.2.1. Điều kiện sắc ký [1],[2],[3]

- Cột: Scharlau C18 (5 μ m; 125 x 4,6 mm) hoặc tương đương;
- Detector: UV bước sóng 254 nm;
- Tốc độ dòng: 1,0 ml/phút;

- Pha động: Acetonitril - methanol - nước - trifluoroacetic acid (35 : 38 : 27 : 0,2);

- Thể tích tiêm: 20 μ l.

2.2.2.2. Phương pháp chuẩn bị mẫu [5]

- Dung môi pha mẫu: Acetonitril - nước (50 : 50)

- Dung dịch chuẩn: Cân chính xác khoảng 25 mg Sorafenib tosylat chuẩn vào bình định mức 50 ml, hòa tan và làm vừa đủ bằng dung môi pha mẫu, lắc đều. Hút chính xác 5,0 ml dung dịch trên vào bình định mức 50 ml, thêm dung môi pha mẫu vừa đủ, lắc đều, lọc qua màng lọc 0,45 μ m.

- Dung dịch thử: Cân chính xác khoảng 25 mg chế phẩm vào bình định mức 50 ml, hòa tan và làm vừa đủ bằng dung môi pha mẫu, lắc đều. Hút chính xác 5,0 ml dung dịch thử gốc vào bình định mức 50 ml, thêm dung môi pha mẫu vừa đủ, lắc đều, lọc qua màng lọc 0,45 μ m.

3. Kết quả và bàn luận

3.1. Chọn điều kiện sắc ký

Sau khi khảo sát một số điều kiện như: thay đổi cột, tốc độ dòng, pha động, tỷ lệ pha động, chúng tôi đã lựa chọn được điều kiện sắc ký như đã nêu ở phần 2.2.2.1, sắc ký đồ thu được của dung dịch chuẩn và thử thể hiện ở Hình 2 và Hình 3.

Trên sắc ký đồ chúng ta thấy, pic Sorafenib tosylat được tách hoàn toàn và cân đối, thời gian lưu khoảng 3,6 phút (Xem hình trang bên).

3.2. Thẩm định phương pháp [4]

3.2.1. Tính đặc hiệu

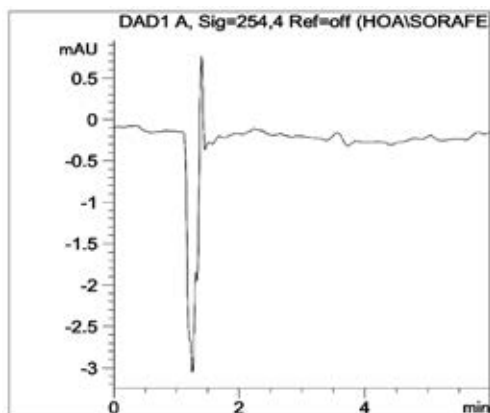
Tiêm vào hệ thống sắc ký lần lượt dung môi pha mẫu; dung dịch chuẩn và dung dịch thử. Kết quả khảo sát tính đặc hiệu như sau.

- Thời gian lưu của pic chính trên sắc ký đồ của dung dịch thử tương ứng với thời gian lưu của pic Sorafenib tosylat trên sắc ký đồ của dung dịch chuẩn:

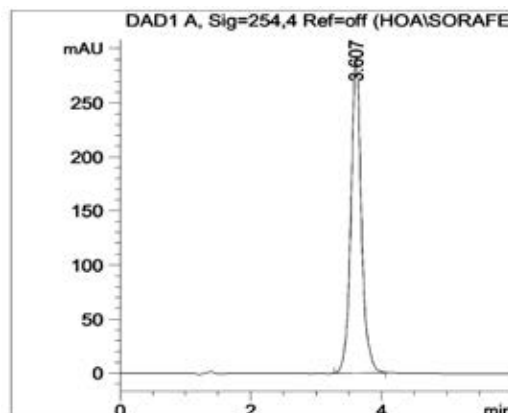
t_r chuẩn ~ 3,6 phút

t_r thử ~ 3,6 phút

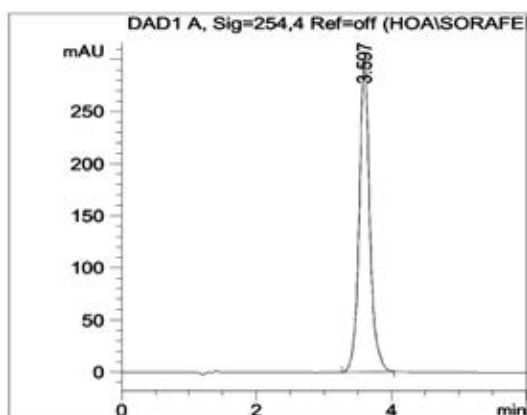
- Phổ UV của pic chính trên sắc đồ của dung dịch thử giống với phổ UV của pic Sorafenib tosylat trên sắc đồ của dung dịch chuẩn.



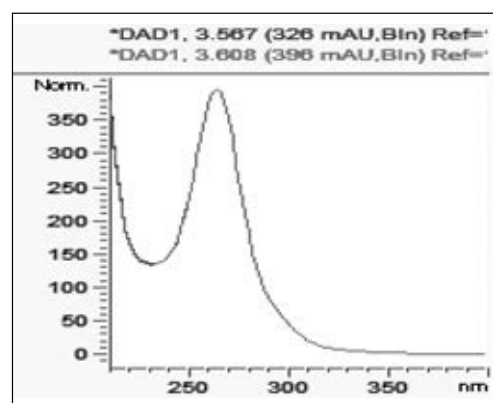
Hình 1. Sắc ký đồ mẫu trắng (dung môi pha mẫu)



Hình 2. Sắc ký đồ dung dịch chuẩn



Hình 3. Sắc ký đồ dung dịch thử



Hình 4. Chồng phổ UV của pic chính trên sắc ký đồ dung dịch chuẩn và dung dịch thử

- Trên sắc ký đồ của mẫu trắng là dung môi pha mẫu không xuất hiện pic có thời gian lưu tương ứng với thời gian lưu của Sorafenib tosylat.

Kết quả cho thấy phương pháp đạt yêu cầu về tính đặc hiệu.

3.2.2. Độ thích hợp của hệ thống sắc ký

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

Stt	Thời gian lưu (phút)	Diện tích pic (mAU.s)
1	3,607	3296,8
2	3,601	3289,5
3	3,593	3293,2
4	3,602	3292,4
5	3,590	3290,6
6	3,601	3292,7
TB	3,599	3292,5
RSD (%)	0,2%	0,1%

Tiêm 6 lần dung dịch chuẩn (ở phần tính đặc hiệu). Ghi lại các sắc ký đồ và xác định giá trị thời gian lưu, diện tích pic. Kết quả được thể hiện ở Bảng 1.

Kết quả khảo sát cho thấy, $RSD_{\text{thời gian lưu}} = 0,2\% < 1,0\%$ và $RSD_{\text{diện tích pic}} = 0,1\% < 2,0\%$. Như vậy, hệ thống sắc ký phù hợp để định tính, định lượng Sorafenib tosylat trong nguyên liệu.

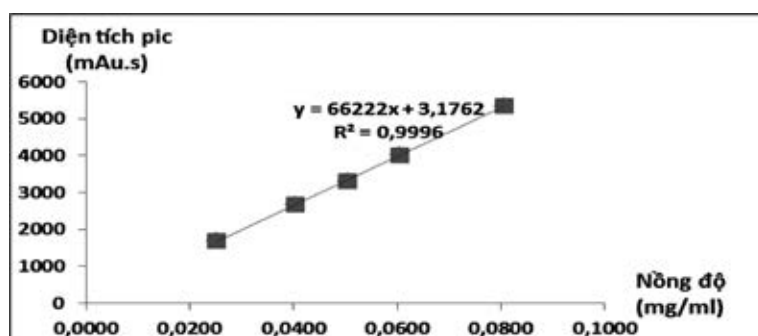
3.2.3. Độ tuyến tính

- Khảo sát trên dãy các dung dịch chuẩn trong dung môi pha mẫu với 5 nồng độ khác nhau. Cách chuẩn bị các dung dịch chuẩn và kết quả được thể hiện trong Bảng 2 và Hình 5.

Kết quả cho thấy với điều kiện sắc ký đã lựa chọn, trong khoảng nồng độ đã khảo sát, có sự tương quan tuyến tính chặt chẽ giữa nồng độ Sorafenib tosylat và diện tích pic đáp ứng.

Bảng 2. Kết quả khảo sát khoảng tuyến tính

Stt	% so với định lượng	Lượng cân chuẩn (mg)	Độ pha loãng	Nồng độ Sorafenib tosylat (mg/ml)	Diện tích pic Sorafenib tosylat (mAU.s)
1	50	25,4	50 x 100/5	0,0252	1688,5
2	80		50 x 50/4	0,0403	2677,8
3	100		50 x 50/5	0,0504	3292,5
4	120		50 x 50/6	0,0605	4023,8
5	160		50 x 50/8	0,0806	5352,9
Phương trình hồi quy: y = 66222 x + 3,2 ; Hệ số tương quan r = 0,9998 ; % Y = 0,1%					



Hình 5. Đồ thị biểu diễn mối tương quan tuyến tính giữa nồng độ Sorafenib tosylat và diện tích pic

3.2.4. Độ chính xác của phương pháp

- Độ lặp lại: Độ lặp lại của phương pháp được đánh giá dựa trên độ lệch chuẩn tương đối của 6 mẫu thử được phân tích riêng biệt theo qui trình phân tích ở mục 2.2.2.

- Độ chính xác trung gian: Độ chính xác trung gian được đánh giá dựa trên độ lệch chuẩn tương đối của 12 mẫu thử được phân tích riêng biệt trên hai thiết bị ở 2 ngày khác nhau và hai kiểm nghiệm viên khác nhau. Kết quả khảo sát độ lặp lại và độ chính xác trung gian được thể hiện ở Bảng 3.

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

Stt	Kiểm nghiệm viên 1			Kiểm nghiệm viên 2		
	Diện tích pic TB mẫu chuẩn: 3292,5 mAU.s Khối lượng cân mẫu chuẩn: 25,4 mg			Diện tích pic TB mẫu chuẩn: 3515,9 mAU.s Khối lượng cân mẫu chuẩn: 26,1 mg		
	Khối lượng mẫu thử (mg)	Diện tích pic thử (mAU.s)	Hàm lượng (%)	Khối lượng mẫu thử (mg)	Diện tích pic thử (mAU.s)	Hàm lượng (%)
1	25,5	3304,4	99,5	24,4	3280,7	99,3
2	25,4	3261,5	98,6	24,8	3329,5	99,2
3	25,4	3293,6	99,5	25,0	3372,0	99,6
4	25,6	3312,0	99,3	25,3	3373,2	98,5
5	25,5	3264,8	98,3	25,4	3412,2	99,2
6	25,6	3311,8	99,3	24,7	3324,7	99,4
Trung bình = 99,1%; n = 6; RSD = 0,5%				Trung bình = 99,2%; n = 6; RSD = 0,4%		
Kết quả định lượng trung bình = 99,1%; n = 12; RSD = 0,5%						

Kết quả cho thấy phương pháp đạt yêu cầu về độ chính xác, độ lặp lại trong ngày và khác ngày của Sorafenib tosylat là 0,5% và 0,5%.

3.2.5. Độ đúng của phương pháp

- *Chuẩn bị dung dịch chuẩn*: Sử dụng dung dịch chuẩn ở mục 3.2.1.

- *Chuẩn bị các dung dịch thử*: Cân chính xác khoảng 20, 25, 30 mg Sorafenib tosylat chuẩn (tương ứng với các nồng độ 80%, 100%, 120% so với nồng độ định lượng) vào bình định mức 50 ml, hòa tan và làm vừa đủ bằng dung môi pha mẫu, lắc đều. Hút chính xác 5,0 ml dung dịch trên vào bình định mức 50 ml, thêm dung môi pha mẫu vừa đủ, lắc đều, lọc qua màng lọc 0,45 μm . Mỗi mức nồng độ làm 03 mẫu.

Khối lượng cân mẫu chuẩn: 25,4 mg; Diện tích pic TB mẫu chuẩn: 3292,5 mAU.s.

Kết quả khảo sát độ đúng được thể hiện ở Bảng 4.

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

Mẫu	Lượng chuẩn Sorafenib tosylat thêm vào (mg)	Diện tích pic Sorafenib tosylat (mAU.s)	Lượng Sorafenib tosylat tìm lại (mg)	% Thu hồi	Trung bình
80%	20,5	2685,7	20,7	101,1	TB = 101,4% RSD = 0,3%
80%	20,4	2684,0	20,7	101,5	
80%	20,3	2676,5	20,6	101,7	
100%	25,5	3345,3	25,8	101,2	TB = 100,8% RSD = 0,5%
100%	25,8	3351,6	25,9	100,2	
100%	25,6	3353,1	25,9	101,0	
120%	30,6	4023,1	31,0	101,4	TB = 101,4% RSD = 0,3%
120%	30,8	4037,3	31,1	101,1	
120%	30,5	4022,4	31,0	101,7	

Kết quả khảo sát cho thấy phương pháp phân tích đạt yêu cầu về độ đúng, tỷ lệ thu hồi của Sorafenib tosylat từ 100,2% đến 101,7%.

4. Kết luận

Xây dựng được phương pháp sắc ký lỏng pha đảo để định lượng nguyên liệu Sorafenib tosylat. Phương pháp sử dụng cột RP 18 (125 x 4,6 mm; 5 μm); Tốc độ dòng 1,0 ml/phút; Thể tích tiêm 20 μl . Pha động là acetonitril - methanol - nước - trifluoroacetic acid (35 : 38 : 27 : 0,2); Detector 254 nm. Phương pháp đã được thẩm định về tính đặc hiệu, tính thích hợp của hệ thống sắc ký, độ tuyến tính, độ đúng, độ lặp lại, độ chính xác trung gian. Kết quả thẩm định cho thấy phương pháp HPLC đã xây dựng hoàn toàn phù hợp cho việc định lượng nguyên liệu Sorafenib tosylat.

Tài liệu tham khảo

- Bộ Y tế (2017), *Dược điển Việt Nam*, lần xuất bản thứ năm, NXB Y học, Hà Nội.
- The British pharmacopoeia*, 2014.
- United state pharmacopoeia* 38, 2015.
- ICH Harmonized Tripartite guidelines*, Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2, 2005, 1-13.
- Ramesh. J et al (2017), "Optimization of stability indicating RP-HPLC method for the estimation of an anti-cancer drug Sorafenib tosylate in pure and pharmaceutical dosage form", *Int. J. of Pharmacy and analytical research*, Vol 6, Issue 1, 141-152 .
- Xin Zhang, Xin-Rong Yang, Xiao-Wu Huang et al (2012), "Sorafenib in treatment of patients with advanced hepatocellular carcinoma: a systematic review", *Hepatobiliary & Pancreatic Diseases International*, Vol 11, Issue 5, 458-466.

SUMMARY

Reversed-phase liquid chromatography method was developed for assay of Sorafenib tosylate. The methods was carried by using a column RP18 (125 x 4.6 mm; 5 μm); the flow rate of mobile phase is maintained at 1.0 ml per minute, injection volume: 20 μl . A mixture of Acetonitrile - Methanol - Water - Trifluoroacetic acid (35 : 38 : 27 : 0.2) as mobile phase. Detector set up at 254 nm. The method was validated in specificity, linear range; accuracy, precision. Validation results proved that the developed method was suitable for assay of Sorafenib tosylate.

(Ngày nhận bài: 23/11/2017 ; Ngày phản biện: 30/8/2018 ; Ngày duyệt đăng: 02/01/2019)

ĐỊNH LƯỢNG NATRI HYALURONAT TRONG THUỐC NHỎ MẮT ESKAR TEARS BẰNG PHƯƠNG PHÁP HPLC VỚI DETECTOR DAD

NGUYỄN THỊ KIỀU ANH

Trường Đại học Dược Hà Nội

NGUYỄN MAI QUYÊN, BÙI VIỆT PHƯƠNG,
NGUYỄN THỊ HỒNG VINH, TRẦN THÚY HẠNH

Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương

Từ khóa: HPLC, natri hyaluronat, thuốc nhỏ mắt, thẩm định phương pháp phân tích

1. Đặt vấn đề

Natri hyaluronat là một polymer thiên nhiên. Đây là một mucopolysaccharid xuất hiện một cách tự nhiên trong khắp cơ thể người, đặc biệt cần thiết cho chất nhờn bôi trơn ở sụn, khớp, da và mắt. Natri hyaluronat làm ổn định màng nước mắt và làm tăng thời gian tan màng nước mắt. Điều này dẫn đến làm giảm cảm giác nóng rát, sợ ánh sáng, đau và cảm giác có dị vật, cải thiện cảm giác dễ chịu, khỏe khoắn cho bệnh nhân. Hơn nữa, natri hyaluronat có thể kích thích sự di cư và tăng sinh tế bào biểu mô giác mạc dẫn đến làm lành nhanh chóng vết thương giác mạc. Kết quả từ nhiều nghiên cứu cho thấy khả năng natri hyaluronat làm tăng tỉ lệ làm lành, giảm diện tích vết thương và cải thiện tổn thương bề mặt nhãn cầu [7].

Hiện nay, trên thị trường xuất hiện ngày càng nhiều thuốc nhỏ mắt có chứa hoạt chất natri hyaluronat. Tuy nhiên, Dược điển Anh (BP) [3] và Dược điển Hàn Quốc (KP) [2] chỉ có chuyên luận nguyên liệu natri hyaluronat. Phương pháp định lượng trong các chuyên luận này là phương pháp đo quang. Dược điển Nhật XVII (JP) [4] đã có chuyên luận thuốc nhỏ mắt với phương pháp định lượng bằng sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) sử dụng cột nhồi porous polymethacrylate - không phải là cột phân tích thông dụng có sẵn trong các phòng thí nghiệm.

Với mong muốn đưa ra phương pháp định lượng natri hyaluronat đảm bảo độ chính xác, tin cậy, tiến hành đơn giản và nhanh chóng, chúng tôi giới thiệu phương pháp định lượng natri hyaluronat trong sản phẩm thuốc nhỏ mắt Eskar tears bằng HPLC pha đảo (sử dụng cột RP18). Việc thẩm định được thực hiện đúng theo hướng dẫn của ICH đối với phép thử định lượng.

2. Thực nghiệm

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

2.1.1. Thiết bị, dụng cụ

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

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

- Cột phân tích sắc ký Phenomenex Luna C18 (250 x 4,6 mm; 5 µm);

- Cân phân tích Mettler Toledo MS 105 độ chính xác 0,01 mg;
- Bộ lọc dùng cho sắc ký với màng lọc 0,45 µm;
- Các dụng cụ thủy tinh chính xác loại A.

2.1.2. Chất chuẩn

- Natri hyaluronat RS: Nguồn gốc: Eur.Ph; Số lô: 2 ; Hàm lượng: 100,0% (nguyên trạng).

2.1.3. Hóa chất thuốc thử

- Natri perclorat loại PA (Merck); Nước RO.

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

2.2.1. Đối tượng nghiên cứu:

- Thuốc nhỏ mắt Eskar tears: Lô SX: 280417, HD: 28/04/2019, do Công ty Cổ phần Dược khoa nghiên cứu phát triển sản phẩm với công thức bào chế của 5 ml dung dịch chế phẩm như sau: *Dược chất:* Natri hyaluronat (5,0 mg); *Tá dược:* ϵ -amino caproic acid, dinatri edetat, acid boric, natri borat, benzalkonium clorid, natri clorid, kali clorid, glycerin, HCl hoặc NaOH (để chỉnh pH về 6,0 - 8,0), nước tinh khiết vừa đủ.

- Mẫu placebo: Dung dịch có thành phần giống công thức bào chế nhưng không có natri hyaluronat.

2.2.2. Nội dung

- Xây dựng và thẩm định quy trình định lượng natri hyaluronat bằng kỹ thuật HPLC.

- Ứng dụng để định lượng natri hyaluronat trong thuốc nhỏ mắt Eskar tear do công ty CP Dược khoa nghiên cứu và xây dựng công thức bào chế.

2.2.3. Phương pháp nghiên cứu

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

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

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

3. Kết quả và bàn luận

3.1. Xây dựng quy trình định lượng natri hyaluronat bằng HPLC

Tiến hành khảo sát về thành phần, tỷ lệ pha động, cột sắc ký, bước sóng phát hiện, tốc độ dòng, nồng độ mẫu thử, thể tích tiêm, chúng tôi xây dựng được quy trình phân tích như sau:

3.1.1. Điều kiện HPLC

- Pha động: Dung dịch natri perclorat 0,05 mol/l;
- Cột: Phenomenex Luna C18 (250 x 4,6 mm; 5 μ m);
- Detector: 215 nm;
- Tốc độ dòng: 0,8 ml/phút;
- Thể tích tiêm: 20 μ l.

3.1.2. Phương pháp xử lý mẫu

- *Dung dịch chuẩn*: Dung dịch natri hyaluronat chuẩn pha trong pha động có nồng độ khoảng 0,2 mg/ml.

- *Dung dịch thử*: Hút chính xác 5,0 ml chế phẩm pha loãng thành 25 ml bằng pha động, lắc đều. Lọc qua màng lọc 0,45 μ m và tiến hành tiêm vào hệ thống HPLC.

3.2. Thẩm định phương pháp

3.2.1. Tính đặc hiệu

- *Dung dịch mẫu placebo*: Hút chính xác 5,0 ml mẫu placebo, pha loãng thành 25 ml bằng pha động, lắc đều. Lọc qua màng lọc 0,45 μ m.

- *Dung dịch chuẩn*: Cân chính xác 40,07 mg chất chuẩn natri hyaluronat hòa tan trong pha động và thêm

pha động vừa đủ 50 ml. Hút chính xác 5,0 ml dung dịch này vào bình định mức 20 ml, pha loãng bằng pha động đến vạch, lắc đều. Lọc qua màng lọc 0,45 μ m.

- *Dung dịch thử*: Hút chính xác 5,0 ml chế phẩm pha loãng thành 25 ml bằng pha động, lắc đều. Lọc qua màng lọc 0,45 μ m.

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

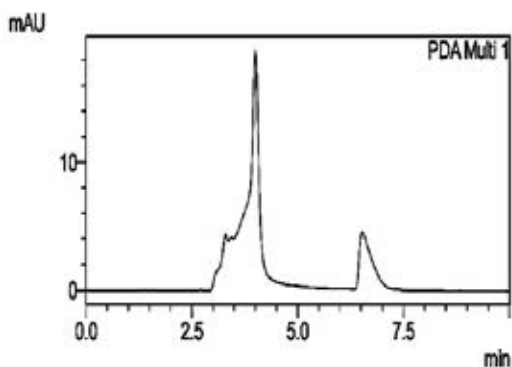
+ Thời gian lưu của pic natri hyaluronat trên sắc ký đồ của dung dịch chuẩn và dung dịch thử giống nhau: đều bằng ~ 2,2 phút.

+ Độ tinh khiết của pic natri hyaluronat trong sắc ký đồ của dung dịch chuẩn và thử đều bằng 0,999999 (khoảng 100%).

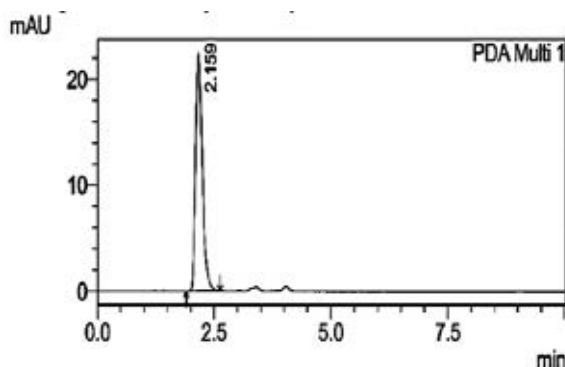
+ Phổ UV của pic natri hyaluronat trên sắc ký đồ của dung dịch thử và dung dịch chuẩn giống nhau.

+ Dung dịch placebo không xuất hiện pic nào tại thời gian lưu tương ứng với thời gian lưu của pic natri hyaluronat nên không ảnh hưởng tới phép thử.

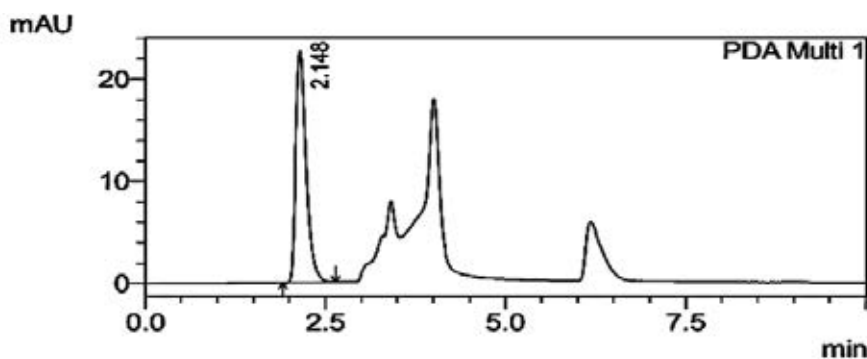
Như vậy phương pháp là đặc hiệu để định lượng natri hyaluronat.



Hình 1. Sắc ký đồ của dung dịch mẫu placebo



Hình 2. Sắc ký đồ của dung dịch chuẩn



Hình 3. Sắc ký đồ của dung dịch thử

3.2.2. Tính thích hợp của hệ thống sắc ký

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

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

<i>Stt</i>	<i>Thời gian lưu của natri hyaluronat (phút)</i>	<i>Diện tích pic natri hyaluronat (mAU.s)</i>	<i>Hệ số đuôi</i>
1	2,159	227812	1,456
2	2,154	227680	1,454
3	2,156	228131	1,459
4	2,159	228316	1,460
5	2,157	228269	1,454
6	2,153	228511	1,456
TB	2,160	228119,83	
RSD	0,12% < 1,0%	0,14% < 2,0%	

Giá trị RSD của thời gian lưu và diện tích pic natri hyaluronat đều < 1,0%.

Các số liệu thu được cho thấy hệ thống sắc ký trên phù hợp cho việc phân tích định tính và định lượng natri hyaluronat.

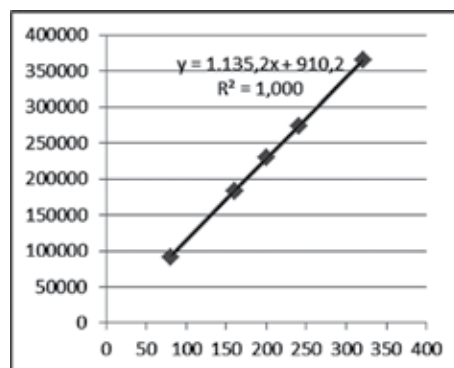
3.2.3. Độ tuyến tính

- Dung dịch chuẩn gốc: Hòa tan 40,07 mg chuẩn natri hyaluronat trong vừa đủ 50 ml pha động.

- Chuẩn bị dãy dung dịch chuẩn: Lần lượt hút chính xác 2,0 ml; 4,0 ml; 5,0 ml; 6,0 ml và 8,0 ml dung dịch chuẩn gốc (tương ứng 40%, 80%, 100%, 120% và 160% của nồng độ định lượng) vào các bình định mức 20 ml riêng biệt, thêm pha động vừa đủ, lắc đều. Lọc qua màng lọc 0,45 µm. Tiến hành sắc ký các dung dịch chuẩn. Kết quả được ghi lại trong Bảng 2.

Bảng 2. Kết quả khảo sát khoảng tuyến tính của phương pháp

<i>STT</i>	<i>Nồng độ natri hyaluronat (C₁₄H₂₀NNaO₁₁)_n (µg/ml)</i>	<i>Diện tích pic natri hyaluronat (mAU.s)</i>
1	80,1	91458
2	160,3	183337
3	200,4	229145
4	240,4	272921
5	320,6	364917
Phương trình hồi qui	y = 1135,2 x + 910,2 ; r = 1,000	



Với điều kiện sắc ký đã lựa chọn, trong khoảng nồng độ đã khảo sát, có sự tương quan tuyến tính chặt chẽ giữa nồng độ natri hyaluronat với diện tích pic đáp ứng.

3.2.4. Độ đúng

- Chuẩn bị các dung dịch khảo sát: Cân chính xác khoảng 16 mg; 20 mg và 24 mg natri hyaluronat (tương ứng với mẫu tự tạo chứa 80, 100 và 120% lượng natri hyaluronat so với hàm lượng ghi trên nhãn) vào các bình định mức 20 ml, hòa tan và pha loãng bằng mẫu placebo tới vừa đủ 20 ml. Hút chính xác 5,0 ml dung dịch này vào bình định mức 25 ml, pha loãng đến vừa đủ bằng pha động. Mỗi mức nồng độ làm 03 mẫu.

- Tiến hành sắc ký các dung dịch khảo sát. Sử dụng dung dịch chuẩn ở phần 3.2.2. Tính thích hợp của hệ thống sắc ký để tính tỷ lệ thu hồi của các mẫu. Kết quả thể hiện ở Bảng 3.

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

Stt	Lượng thêm vào so với nhãn	Lượng cân natri hyaluronat cho vào các mẫu (mg)	Diện tích pic natri hyaluronat (mAU.s)	Lượng natri hyaluronat (C ₁₄ H ₂₀ NNaO ₁₁) _n tìm lại (mg)	% Thu hồi	% Thu hồi TB ở mỗi mức nồng độ khảo sát
1	80%	16,01	181725	15,96	99,69	TB = 100,04% RSD = 0,35%
2	80%	15,99	182720	16,05	100,38	
3	80%	16,05	182906	16,06	100,06	
4	100%	19,93	227642	19,99	100,30	TB = 100,20% RSD = 0,10%
5	100%	19,94	227455	19,98	100,20	
6	100%	20,03	228305	20,05	100,10	
7	120%	23,84	272846	23,96	100,50	TB = 100,38% RSD = 0,18%
8	120%	23,92	272832	23,96	100,17	
9	120%	23,78	272023	23,89	100,46	
% Thu hồi từ 99,69% đến 100,50%: nằm trong khoảng [98,0% - 102,0%]						

Từ kết quả thu được trong Bảng 3 cho thấy qui trình thử đạt yêu cầu về độ đúng.

3.2.5. Độ chính xác

3.2.5.1. Độ lặp lại

Khảo sát trên thuốc nhỏ mắt Eskar tears với các điều kiện sắc ký và cách xử lý mẫu như ở mục 3.1.1 và 3.1.2 lặp lại thí nghiệm 6 lần, kết quả được trình bày trong Bảng 4.

Kết quả cho thấy phương pháp có độ lặp lại tốt (RSD = 0,12%) có thể áp dụng để định lượng natri hyaluronat trong các mẫu thành phẩm.

3.2.5.2. Độ chính xác trung gian

Kiểm nghiệm viên 1: Lấy kết quả ở mục 3.2.5.1 Độ lặp lại. Kiểm nghiệm viên 2 tiến hành thực nghiệm Độ lặp lại như kiểm nghiệm viên 1, trên cùng thiết bị nhưng khác ngày. Kết quả được trình bày trong Bảng 4.

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

Stt	Kiểm nghiệm viên 1 <i>Kết quả phần 3.2.5.1. (Kết quả độ lặp lại)</i> Lượng cân chuẩn: 40,07 mg Diện tích pic trung bình của chuẩn (n = 6) = 228119,83 mAU.s		Kiểm nghiệm viên 2 Lượng cân chuẩn: 40,43 mg Diện tích pic trung bình của chuẩn (n = 6) = 232101,17 mAU.s	
	Diện tích pic (mAU.s)	HL (%) so với lượng ghi trên nhãn	Diện tích pic (mAU.s)	HL (%) so với lượng ghi trên nhãn
1	230047	101,02	229305	105,11
2	229747	100,89	230491	106,07
3	229953	100,98	230742	106,60
4	230447	101,20	230574	106,34
5	229705	100,87	230545	106,87
6	229849	100,93	229768	106,39
TB = 100,98%; n = 6; RSD = 0,12%			TB = 100,26%; n = 6; RSD = 0,25%	
Trung bình = 100,62%; n = 12; RSD = 0,42%				

Từ kết quả thu được trong Bảng 4 cho thấy độ chính xác trung gian đạt yêu cầu với RSD = 0,42%, n = 12.

4. Kết luận

Quy trình định lượng natri hyaluronat trong thuốc nhỏ mắt Eskar tears bằng phương pháp sắc ký lỏng pha đảo đã được thiết lập. Phương pháp phân tích sử dụng cột Phenomenex Luna C18 (250 x 4,6 mm; 5 μ m) với pha động là dung dịch natri perchlorat 0,05 mol/l, tốc độ dòng 0,8 ml/phút, thể tích tiêm 20 μ l; detector DAD ở bước sóng 215 nm. Quy trình phân tích được thẩm định về tính đặc hiệu, độ thích hợp của hệ thống, độ tuyến tính, khoảng xác định, độ đúng, độ lặp lại và độ chính xác trung gian. Kết quả thẩm định cho thấy quy trình được xây dựng hoàn toàn phù hợp cho việc định lượng natri hyaluronat trong thuốc nhỏ mắt Eskar tears và có thể áp dụng định lượng chất này trong các chế phẩm thuốc nhỏ mắt, mũi, tai ... có chứa natri hyaluronat.

Tài liệu tham khảo

1. Bộ Y tế (2017), *Dược điển Việt Nam*, Lần xuất bản thứ năm, NXB Y học, Hà Nội.
2. *Dược điển Hàn Quốc X* (KP X), 2012.
3. *Dược điển Anh* (BP), 2016.
4. *Dược điển Nhật Bản 17* (JP 17), 2016.
5. *Dược điển Mỹ 39* (USP 39), 2016.
6. *Validation of analytical procedure text and Methodology - ICH Q2* (R1), 2005.
7. Thông tin về thuốc tại: <https://www.mims.com/vietnam/drug/info>.

SUMMARY

A reversed-phase liquid chromatography method was developed assay for sodium hyaluronate in Eskar tears ophthalmic solution. The method was carried by using a Phenomenex Luna C18 (250 x 4.6 mm; 5 μ m) column and sodium perchlorate 0.05 mol/l as mobile phase. The flow rate of mobile phase is maintained at 0.8 ml per minute, injection volume 20 μ l, analyte was detected by a DAD detector set at 215 nm. The method was validated in specificity, linearity, range; accuracy and precision. Validation results proved that the developed method was suitable for assay for sodium hyaluronate in Eskar tears ophthalmic solution.

(Ngày nhận bài: 17/11/2017 ; Ngày phản biện: 05/9/2018 ; Ngày duyệt đăng: 24/09/2018)

ĐỊNH LƯỢNG ĐỒNG THỜI BỐN THÀNH PHẦN: PARACETAMOL, GUAIFENESIN, NATRI BENZOAT VÀ OXOMEMAZIN TRONG VIÊN NANG BẰNG PHƯƠNG PHÁP SẮC KÝ LỎNG HIỆU NĂNG CAO

LÊ THỊ HUỆ, NGUYỄN THỊ HỒNG YẾN,
NGUYỄN HỒNG HẠNH, TRẦN THỊ HỒNG ANH
Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương

Từ khóa: Định lượng đồng thời, HPLC, paracetamol, guaifenesin, natri benzoat, oxomemazin

1. Đặt vấn đề

Trên thị trường hiện nay có rất nhiều loại thuốc ho kết hợp nhiều thành phần. Trong số đó có chế phẩm chứa bốn thành phần paracetamol, guaifenesin, natri benzoat và oxomemazin do một số công ty sản xuất dưới dạng viên nang, điều trị được đồng thời các triệu chứng: sốt, đau đầu, đau họng, tăng tiết dịch...[2]. Tuy nhiên trong các dược điển như USP, BP, ĐĐVN V,... chúng tôi chưa thấy có phương pháp định lượng đồng thời cả bốn hoạt chất này trong bất kỳ dạng bào chế nào [1],[5],[6]. Trong tiêu chuẩn của các nhà sản xuất phải sử dụng hai hoặc ba hệ sắc ký để định lượng bốn thành phần trên. Để đáp ứng nhu cầu kiểm tra chất lượng và góp phần nâng cao khả

năng kiểm tra chất lượng thuốc, rút ngắn thời gian và tiết kiệm chi phí kiểm nghiệm, trong phạm vi bài viết này chúng tôi xin giới thiệu phương pháp định lượng đồng thời bốn thành phần paracetamol, guaifenesin, natri benzoat và oxomemazin trong viên nang bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao.

2. Thực nghiệm

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

2.1.1. Thiết bị, dụng cụ

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

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

- Cột phân tích: Germini RP18 (250 x 4,6 mm; 5 µm);
- Cân phân tích: Mettler Toledo AG245;
- Máy lắc siêu âm.
- Bộ lọc dùng cho sắc ký, các dụng cụ thủy tinh chính xác class A.

2.1.2. Hóa chất, chất chuẩn

- Methanol (HPLC): Merck
- Nước RO: Viện KNTTW
- Acid acetic băng (PA): Scharlau
- Chất chuẩn oxomemazin hydroclorid của Viện Kiểm nghiệm thuốc TP. HCM. Lô: QT 074050815; Hàm lượng: 99,78% (nguyên trạng).
- Chất chuẩn paracetamol của Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương, Lô: 020801; Hàm lượng: 99,90% (khan); Âm: 0,06%.
- Chất chuẩn guaifenesin của Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương, Lô: WS 0212181.02; Hàm lượng: 99,81% (nguyên trạng).
- Chất chuẩn Natri benzoat của Sigma – aldrich, Lô: LRAA9041; Hàm lượng: 99,8% (nguyên trạng).

2.1.3. Đối tượng nghiên cứu

- Viên nang: Nadytopxil do Công ty Cổ phần Dược phẩm 2 – 9 TP. Hồ Chí Minh sản xuất. Công thức bào chế cho 1 viên nang như sau:

Oxomemazin hydroclorid (tương đương oxomemazin)	Một phẩy sáu lăm miligam	1,65 mg
Paracetamol	Ba mươi ba phẩy ba ba miligam	33,33 mg
Guaifenesin	Ba mươi ba phẩy ba ba miligam	33,33 mg
Natri benzoat	Ba mươi ba phẩy ba ba miligam	33,33 mg
Tá dược	Vừa đủ	1 viên (233 mg)

- Mẫu placebo: Là lô mẫu giả được được chuẩn bị như một lô mẫu thử nhưng không có bốn thành phần paracetamol, guaifenesin, natri benzoat và oxomemazin.

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

- Mẫu placebo B: Là mẫu giả được được chuẩn bị như một lô mẫu thử nhưng không có 3 thành phần paracetamol, guaifenesin, natri benzoat.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Điều kiện sắc ký

- Cột Germini C18 (250 x 4,6 mm; 5 µm).
- Pha động: Methanol – dung dịch acid acetic 5% (55 : 45)
- Tốc độ dòng: 1,0 ml/phút
- Detector UV: 272 nm
- Thể tích tiêm mẫu: 10 µl
- Dung môi pha mẫu: Nước - Methanol (45 : 55)

2.2.2. Phương pháp xử lý mẫu

- *Dung dịch chuẩn gốc oxomemazin*: Cân chính xác khoảng 45,75 mg oxomemazin hydroclorid vào bình định mức 100 ml, thêm khoảng 70 ml dung môi pha mẫu, lắc siêu âm để hòa tan, thêm dung môi pha mẫu vừa đủ đến vạch, trộn đều. Lọc qua màng lọc 0,45 µm.

- *Chuẩn bị dung dịch chuẩn hỗn hợp*: Cân chính xác các chất chuẩn khoảng 33,33 mg paracetamol; 33,33 mg guaifenesin và 33,33 mg natri benzoat vào bình định mức 100 ml, thêm khoảng 70 ml dung môi pha mẫu, lắc siêu âm để hòa tan, thêm chính xác 4,0 ml dung dịch chuẩn gốc oxomemazin, thêm dung môi pha mẫu vừa đủ đến vạch, trộn đều. Lọc qua màng lọc 0,45 µm.

- *Dung dịch thử*: Cân và xác định khối lượng trung bình của 20 viên nang, nghiền mịn và trộn đều. Cân chính xác một lượng bột thuốc tương ứng với khoảng 33,33 mg paracetamol vào bình định mức 100 ml, thêm khoảng 70 ml dung môi pha mẫu, lắc siêu âm để hòa tan, thêm dung môi pha mẫu vừa đủ đến vạch, trộn đều. Lọc qua màng lọc 0,45 µm.

- *Dung dịch placebo*: Cân chính xác một lượng bột mẫu placebo tương ứng 1 viên vào bình định mức 100 ml, thêm khoảng 70 ml dung môi pha mẫu, lắc siêu âm để hòa tan, thêm dung môi pha mẫu vừa đủ đến vạch, trộn đều. Lọc qua màng lọc 0,45 µm.

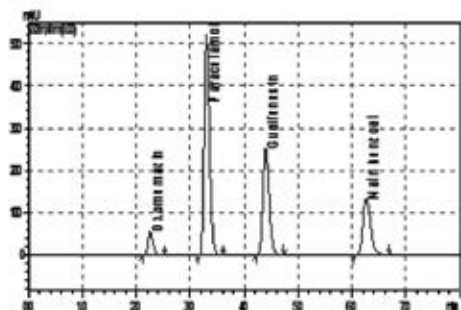
Kiểm tra tính thích hợp của hệ thống sắc ký: Tiến hành sắc ký với dung dịch chuẩn hỗn hợp, thứ tự rửa giải của 4 pic lần lượt là oxomemazin, paracetamol, guaifenesin, natri benzoat; hệ số đối xứng của cả 4 pic không được lớn hơn 2,0; Hệ số phân giải giữa paracetamol và guaifenesin không nhỏ hơn 2,0 và độ lệch chuẩn tương đối của các diện tích pic đáp ứng từ 6 lần tiêm lặp lại dung dịch chuẩn hỗn hợp không quá 2,0%.

Tiêm lần lượt 10 µl dung dịch placebo, dung dịch chuẩn hỗn hợp và dung dịch thử vào hệ thống sắc ký. Ghi lại sắc ký đồ và đáp ứng của pic chính trong dung dịch chuẩn hỗn hợp và dung dịch thử.

3. Kết quả và bàn luận

3.1. Lựa chọn điều kiện sắc ký

Trên cơ sở tham khảo một số tài liệu [1],[6] và các trang thiết bị có sẵn, chúng tôi đã tiến hành khảo sát thành phần pha động, cột, gradient dung môi, tốc độ dòng,... chúng tôi đã lựa chọn được điều kiện sắc ký như đã nêu ở phần 2.2.1, sắc ký đồ thu được của dung dịch chuẩn

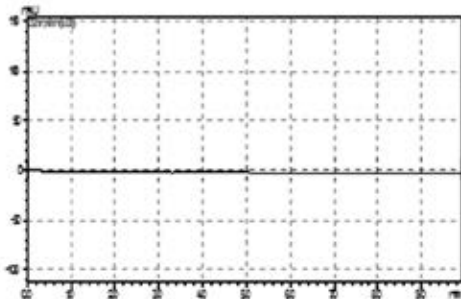


Hình 1. Sắc ký đồ của dung dịch chuẩn hỗn hợp

3.2. Đánh giá phương pháp [3],[4]

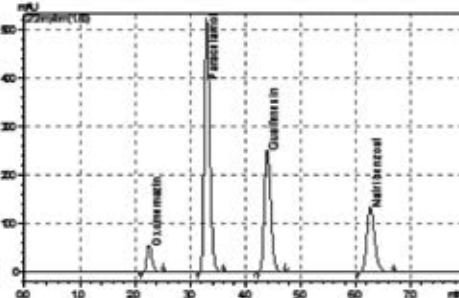
3.2.1. Khảo sát tính đặc hiệu

Tiêm lần lượt các mẫu: Dung môi pha mẫu, dung dịch placebo, dung dịch chuẩn oxomemazin, dung dịch chuẩn paracetamol, dung dịch chuẩn guaifenesin và dung dịch chuẩn natri benzoat vào hệ thống sắc ký. Trên sắc ký đồ thu được từ chương trình sắc ký, dung môi pha mẫu không có pic đáp ứng, dung dịch placebo không có pic đáp ứng và không có pic nào có thời gian lưu



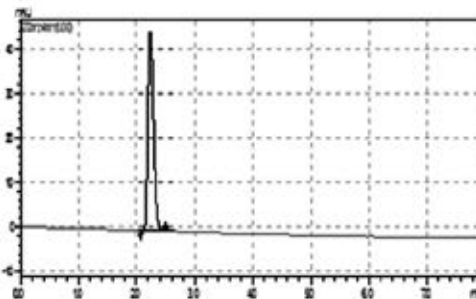
Hình 3. Sắc ký đồ của dung dịch Placebo

hỗn hợp và dung dịch thử thể hiện ở Hình 1 và Hình 2. Thứ tự rửa giải của 4 pic trên được xác định bằng cách tiêm dung dịch chuẩn đơn của từng chất (với nồng độ tương ứng như trong dung dịch chuẩn hỗn hợp), lần lượt là oxomemazin, paracetamol, guaifenesin và natri benzoat; các pic tách rõ ràng, pic đối xứng và gọn. Như vậy việc lựa chọn các điều kiện sắc ký là phù hợp.

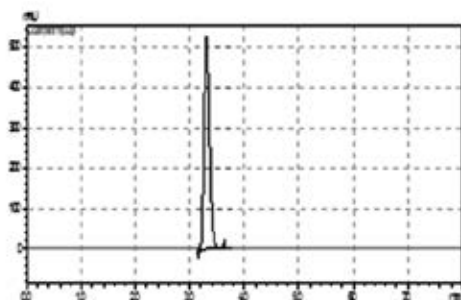


Hình 2. Sắc ký đồ của dung dịch thử

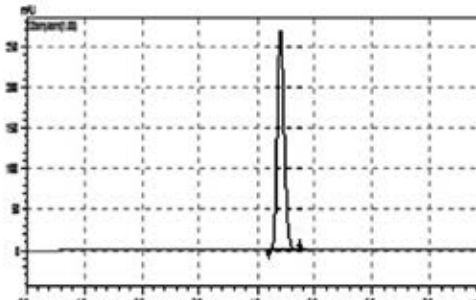
tương ứng với các pic oxomemazin hydroclorid (khoảng 2,2 phút), paracetamol (khoảng 3,3 phút), guaifenesin (khoảng 4,4 phút), natri benzoat (khoảng 6,3 phút) (Hình 3). Quét phổ hấp thụ tử ngoại khả kiến của dung dịch chuẩn và dung dịch thử với detector PDA cho thấy quang phổ hấp thụ tử ngoại khả kiến của các hoạt chất thu được từ dung dịch thử phù hợp với quang phổ hấp thụ tử ngoại khả kiến của pic chính thu được từ các dung dịch chuẩn tương ứng, hệ số trùng phổ giữa chuẩn và thử đều xấp xỉ 1,0 (Hình 8, 9, 10 và Hình 11).



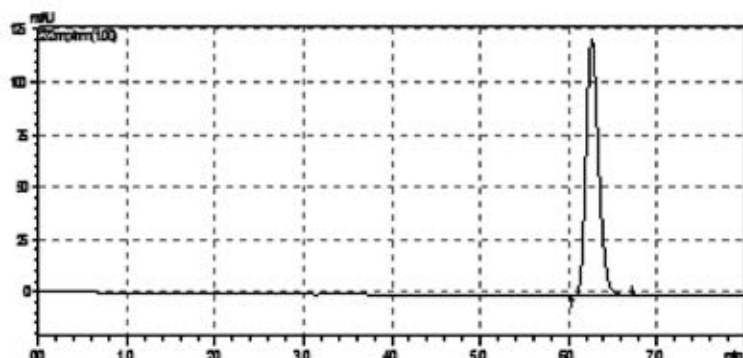
Hình 4. Sắc ký đồ của dung dịch chuẩn oxomemazin hydroclorid



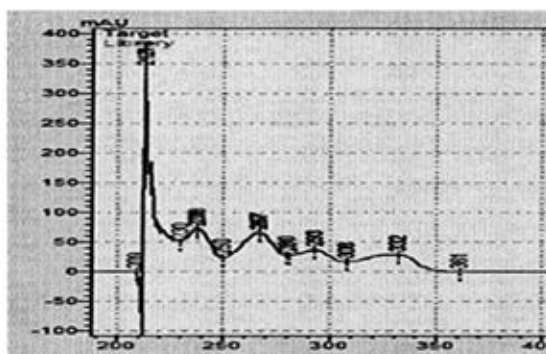
Hình 5. Sắc ký đồ của dung dịch chuẩn paracetamol



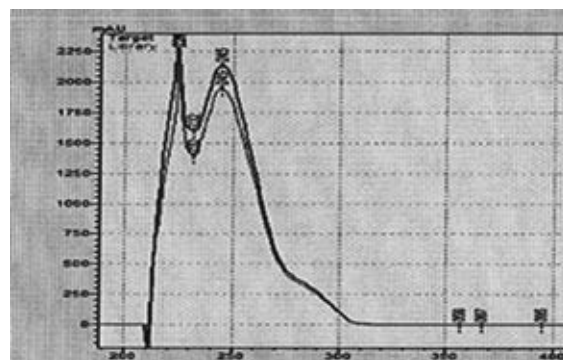
Hình 6. Sắc ký đồ của dung dịch chuẩn guaifenesin



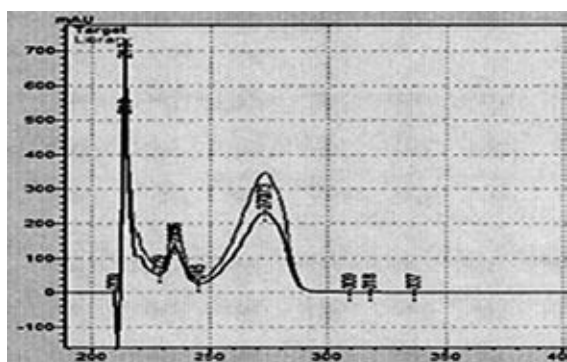
Hình 7. Sắc ký đồ của dung dịch chuẩn natri benzoat



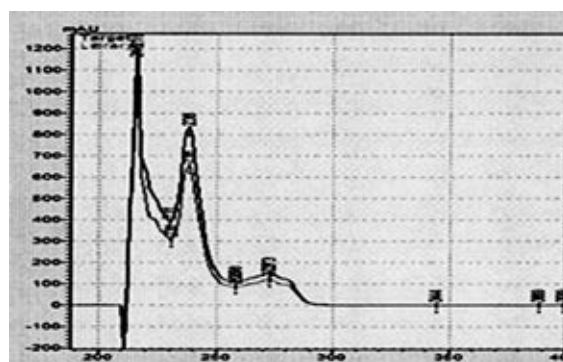
Hình 8. Hình ảnh chồng phổ UV-VIS của pic oxomemazin hydroclorid



Hình 9. Hình ảnh chồng phổ UV-VIS của pic paracetamol



Hình 10. Hình ảnh chồng phổ UV-VIS của pic guaifenesin



Hình 11. Hình ảnh chồng phổ UV-VIS của pic natri benzoat

Với các điều kiện sắc ký như trên và từ các kết quả thu được đã chứng tỏ phương pháp là đặc hiệu để phân tích định tính và định lượng các hoạt chất oxomemazin hydroclorid, paracetamol, guaifenesin và natri benzoat trong chế phẩm Nadytopxil.

3.2.2. Tính thích hợp của hệ thống sắc ký

Tính thích hợp của hệ thống sắc ký được xác định

bằng cách tiến hành tiêm lặp lại 6 lần dung dịch chuẩn hỗn hợp có nồng độ oxomemazin khoảng 0,0165 mg/ml và nồng độ của paracetamol, guaifenesin và natri benzoat khoảng 0,3333 mg/ml. Ghi lại các giá trị về thời gian lưu, diện tích pic, độ cân xứng pic (T) và độ phân giải giữa 4 pic (R).

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

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

STT	Oxomemazin hydroclorid		Paracetamol		Guaifenesin		Natri benzoat	
	Thời gian lưu (phút)	Diện tích pic (mAU.s)	Thời gian lưu (phút)	Diện tích pic (mAU.s)	Thời gian lưu (phút)	Diện tích pic (mAU.s)	Thời gian lưu (phút)	Diện tích pic (mAU.s)
1	2,246	322475	3,292	3796115	4,393	2139883	6,257	1168912
2	2,248	321914	3,294	3795760	4,394	2137278	6,255	1167383
3	2,242	322376	3,291	3802398	4,396	2140087	6,257	1168327
4	2,238	322605	3,292	3801456	4,391	2139485	6,259	1168102
5	2,246	322669	3,301	3802063	4,392	2139518	6,253	1168713
6	2,247	322245	3,297	3801406	4,390	2140719	6,252	1168904
TB	2,245	322380,7	3,295	3799866,3	4,393	2139495,0	6,256	1168390,2
RSD%	0,17	0,08	0,12	0,07	0,05	0,05	0,04	0,05
T	1,6		1,4		1,4		1,4	
R			3,6 (so với oxomemazin.HCl)		4,0 (so với paracetamol)		6,5 (so với guaifenesin)	

Các số liệu thu được cho thấy hệ thống sắc ký trên phù hợp cho việc phân tích định tính, định lượng đồng thời oxomemazin hydroclorid, paracetamol, guaifenesin và natri benzoat trong chế phẩm (RSD < 2,0%, hệ số bất đồng T < 2,0; hệ số phân giải R > 2,0).

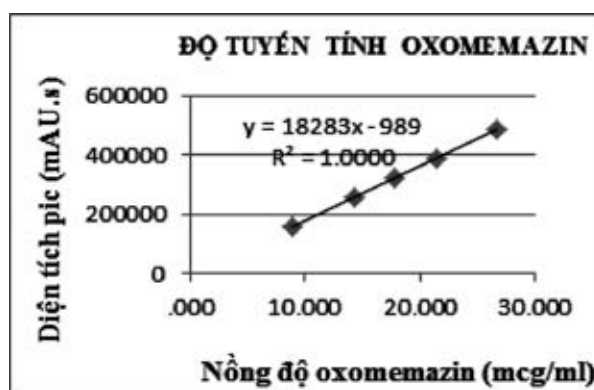
3.2.3. Khảo sát khoảng tuyến tính

3.2.3.1. Khảo sát khoảng tuyến tính của oxomemazin hydroclorid

Khảo sát trên 5 dung dịch chuẩn đơn oxomemazin hydroclorid với 5 nồng độ khác nhau, kết quả ghi được trong Bảng 2 và Hình 12.

Bảng 2. Kết quả khảo sát tính tuyến tính của oxomemazin hydroclorid

Dung dịch	Nồng độ (mcg/ml)	Diện tích pic (mAU.s)
1	8,9004	161628
2	14,2406	259419
3	17,8008	324407
4	21,3609	389918
5	26,7011	486956
Phương trình hồi quy: $y = 18283x - 989$ Hệ số tương quan tuyến tính: $r = 1,000$		



Hình 12. Đồ thị khảo sát tính tuyến tính của oxomemazin hydroclorid

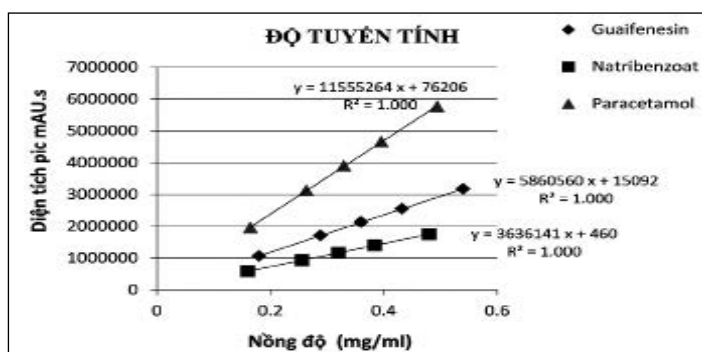
Với điều kiện sắc ký đã chọn, trong khoảng nồng độ đã khảo sát, có sự tương quan tuyến tính chặt chẽ giữa nồng độ oxomemazin hydroclorid và diện tích pic đáp ứng.

3.2.3.2. Khảo sát độ tuyến tính của paracetamol, guaifenesin, natri benzoat.

Khảo sát trên 5 dung dịch chuẩn hỗn hợp gồm paracetamol, guaifenesin và natri benzoat với 5 nồng độ khác nhau, kết quả được ghi trong Bảng 3 và Hình 13.

Bảng 3. Kết quả khảo sát độ tuyến tính của paracetamol, guaifenesin và natri benzoat

STT	Paracetamol		Guaifenesin		Natri benzoat	
	Nồng độ (mg/ml)	Diện tích pic (mAU.s)	Nồng độ (mg/ml)	Diện tích pic (mAU.s)	Nồng độ (mg/ml)	Diện tích pic (mAU.s)
1	0,1649	1959945	0,1802	1065816	0,1602	581183
2	0,2638	3137447	0,2883	1707250	0,2563	933634
3	0,3298	3904875	0,3603	2131056	0,3204	1166543
4	0,3957	4661208	0,4324	2553714	0,3844	1399500
5	0,4947	5771030	0,5405	3176594	0,4805	1745808
	Phương trình hồi quy: $y = 11555264 x + 76206$ $r = 1,000$		Phương trình hồi quy: $y = 5860560 x + 15092$ $r = 1,000$		Phương trình hồi quy: $y = 3636141 x + 460$ $r = 1,000$	



Hình 13. Đồ thị khảo sát độ tuyến tính của paracetamol, guaifenesin và natri benzoat

Nhận xét: Với điều kiện sắc ký đã chọn, trong khoảng nồng độ đã khảo sát, các chất (paracetamol, guaifenesin và natribenzoat) có sự tương quan tuyến tính chặt chẽ giữa nồng độ và diện tích pic đáp ứng.

3.2.4. Khảo sát độ chính xác

3.2.4.1. Khảo sát độ lặp lại

Khảo sát trên viên nang Nadytopxil với các điều kiện sắc ký và cách xử lý mẫu như ở mục 2.2.1 và 2.2.2, lặp lại thí nghiệm 6 lần, kết quả được trình bày trong Bảng 4.

Bảng 4. Kết quả khảo sát độ lặp lại của phương pháp

Mẫu thử	Lượng cân (g)	Oxomemazin		Paracetamol		Guaifenesin		Natri benzoat	
		Diện tích pic (mAU.s)	Hàm lượng (%)	Diện tích pic (mAU.s)	Hàm lượng (%)	Diện tích pic (mAU.s)	Hàm lượng (%)	Diện tích pic (mAU.s)	Hàm lượng (%)
1	0,2435	352100	101,06	1967088	92,82	1967088	92,82	1263369	99,29
2	0,2449	349868	99,85	1956587	91,80	1956587	91,80	1258409	98,33
3	0,2458	354038	100,67	1974292	92,29	1974292	92,29	1267540	98,68
4	0,2477	352420	99,44	1965080	91,16	1965080	91,16	1265485	97,77
5	0,2496	362199	101,42	1958836	90,17	1958836	90,17	1316534	100,94
6	0,2487	362672	101,92	1961416	90,62	1961416	90,62	1317414	101,37
TB (%)			100,73		91,48		91,48		99,40
RSD (%)			0,94		1,11		1,11		1,46

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

3.2.4.2. Khảo sát độ chính xác trung gian

Xác định độ chính xác trung gian bằng cách xác định hàm lượng các hoạt chất trong các mẫu thử bởi kiểm nghiệm viên khác, tiến hành thử nghiệm với điều kiện thực nghiệm tại thời điểm khác nhau với các điều kiện sắc ký và cách xử lý mẫu như ở mục 2.2.1 và 2.2.2, lặp lại thí nghiệm 6 lần. Kết quả của kiểm nghiệm viên 2 và kết quả xác định độ chính xác trung gian của 2 kiểm nghiệm viên được thể hiện trong Bảng 5.

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

Stt	Lượng mẫu thử (g)	Oxomemazin		Paracetamol		Guaifenesin		Natri benzoat	
		Diện tích pic (mAU.s)	Hàm lượng (%)	Diện tích pic (mAU.s)	Hàm lượng (%)	Diện tích pic (mAU.s)	Hàm lượng (%)	Diện tích pic (mAU.s)	Hàm lượng (%)
1	0,2515	332575	101,98	3530129	92,24	1910315	93,96	1216162	99,69
2	0,2517	332143	101,77	3528339	92,12	1906973	93,72	1214487	99,48
3	0,2511	331275	101,74	3508277	91,81	1902482	93,73	1212360	99,54
4	0,2514	330683	101,44	3507768	91,69	1907747	93,87	1212014	99,39
5	0,2516	338292	103,69	3538314	92,42	1882926	92,58	1252044	102,60
6	0,2570	337920	101,40	3541909	90,57	1885019	90,73	1254471	100,63
Trung bình		102,00%; n = 6; RSD = 0,84%		91,81%; n = 6; RSD = 0,72%		93,10%; n = 6; RSD = 1,36%		100,22%; n = 6; RSD = 1,24%	
2 KNV (n = 12)		RSD = 1,07%		RSD = 0,70%		RSD = 1,50%		RSD = 1,36%	

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

3.2.5. Khảo sát độ đúng

3.2.5.1. Độ đúng của phương pháp (đối với oxomemazin)

Độ đúng được xác định bằng phương pháp thêm chuẩn vào nền mẫu placebo A. Tiến hành pha dung dịch chuẩn gốc oxomemazin trong dung môi pha mẫu có nồng độ 0,448 mg/ml. Lấy chính xác 2,0 ml; 4,0 ml và 6,0 ml dung dịch gốc oxomemazin (tương ứng với 50%, 100% và 150% lượng oxomemazin ghi trên nhãn) vào bình định mức 100 ml đã có chứa sẵn khoảng 231 mg mẫu placebo A, thêm 70 ml dung môi pha mẫu, siêu âm 10 phút để hòa tan, pha loãng đến vừa đủ 100,0 ml với cùng dung môi.

Tiến hành sắc ký theo điều kiện đã ghi ở mục 2.2.1 và tính lượng hoạt chất thu hồi. Kết quả được biểu thị ở Bảng 6.

3.2.5.2. Độ đúng của phương pháp (đối với paracetamol, guaifenesin và natri benzoat)

Chuẩn bị 3 mẫu tự tạo ở 3 nồng độ khác nhau (50%; 100%; 150%) bằng cách thêm vào một lượng chính xác mỗi chất chuẩn paracetamol, guaifenesin và natri benzoat vào mẫu placebo B. Mỗi mức nồng độ tiến hành 3 lần. Tiến hành sắc ký theo điều kiện đã ghi ở mục 2.2.1 và tính lượng hoạt chất thu hồi. Kết quả được thể hiện ở Bảng 6.

Kết quả khảo sát cho thấy phương pháp có độ đúng cao (tỷ lệ tìm lại là 100,25% đối với oxomemazin; 100,07% đối với paracetamol; 101,28% đối với guaifenesin và 99,44% đối với natri benzoat), đảm bảo tốt cho việc định lượng đồng thời bốn thành phần oxomemazin, paracetamol, guaifenesin và natri benzoat trong chế phẩm.

Bảng 6. Kết quả khảo sát độ đúng của phương pháp

STT	% so với định lượng	% thu hồi Oxomemazin	% thu hồi Paracetamol	% thu hồi Guaifenesin	% thu hồi Natri benzoat
1	50%	101,57	99,64	101,40	99,55
2	50%	101,57	99,79	101,23	99,28
3	50%	101,56	100,18	101,51	98,77
4	100%	99,25	100,38	101,51	99,28
5	100%	99,24	100,71	100,61	99,16
6	100%	99,21	99,91	100,82	99,49
7	150%	99,85	99,87	101,68	99,74
8	150%	99,94	100,06	101,52	99,53
9	150%	100,06	100,07	101,25	100,20
Trung bình (n = 9)		100,25%	100,07%	101,28%	99,44%
RSD		1,03%	0,32%	0,25%	0,40%

3.2.6. Khoảng xác định

Từ kết quả khảo sát độ đúng và độ tuyến tính, suy ra khoảng xác định của quy trình định lượng đã xây dựng là từ 50% đến 150% so với hàm lượng ghi trên nhãn.

4. Kết luận

Qua khảo sát thực nghiệm, chúng tôi đã xây dựng được một hệ sắc ký lỏng hiệu năng cao để định lượng đồng thời bốn thành phần oxomemazin, paracetamol, guaifenesin và natri benzoat trong viên nang Nadytopxil. Phương pháp xây dựng có sự tương quan tuyến tính chặt chẽ giữa diện tích pic đáp ứng và nồng độ hoạt chất, độ lặp lại, độ chính xác trung gian và độ đúng cao với các điều kiện trang thiết bị, hóa chất thuốc thử phù hợp với đa số các phòng thí nghiệm. Với các kết quả thu được, chúng tôi đề nghị có thể áp dụng phương pháp định lượng đã nghiên cứu cho chế phẩm viên nang có 4 thành phần oxomemazin, paracetamol, guaifenesin và natri benzoat.

Tài liệu tham khảo

1. Bộ Y tế (2017), *Dược điển Việt Nam*, Lần xuất bản thứ năm, NXB Y học, Hà Nội.
2. Bộ Y tế (2015), *Dược thư quốc gia Việt Nam*, Lần xuất bản thứ hai, NXB Khoa học và Kỹ thuật, Hà Nội.
3. Bộ Y tế - 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).
4. ICH Harmonized Tripartite guidelines, Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2, 2005, 1-13.
5. *The British Pharmacopoeia* 2016.
6. *The United State Pharmacopoeia* 40, Guaifenesin capsules.

SUMMARY

A HPLC method for simultaneous determination of Oxomemazine, Paracetamol, Guaifenesin and Sodium benzoate in Nadytopxil capsule is introduced:

The mobile phase is programmed as follows:

Methanol – Acetic acid solution 5% (55 : 45). Make adjustments if necessary

- Detector UV: 272 nm

- Column: Germini Rp 18 (250 x 4.6 mm; 5 µm)

- Flow rate: 1.0 ml/min

- Injection volume: 10 µl

The method was validated about the specificity, system suitability, linear range, precision, accuracy and validation results proved that this method was suitable for simultaneous determination of Oxomemazine, Paracetamol, Guaifenesin and Sodium benzoate in capsules.

(Ngày nhận bài: 29/11/2017 ; Ngày phản biện: 10/9/2018 ; Ngày duyệt đăng: 02/01/2019)

NGHIÊN CỨU ĐỊNH LƯỢNG CEFPODOXIM TRONG HUYẾT TƯƠNG NGƯỜI BẰNG PHƯƠNG PHÁP HPLC

CAO NGỌC CƯỜNG, PHAN THỊ NGHĨA, TẠ MẠNH HÙNG
Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương

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

1. Đặt vấn đề

Cefpodoxim là kháng sinh cephalosporin thế hệ thứ 3, được sử dụng trong điều trị các nhiễm khuẩn nhạy cảm. Cefpodoxim ở trên thị trường là dạng thuốc uống cefpodoxim proxetil (ester của cefpodoxim). Cefpodoxim proxetil được hấp thu qua đường tiêu hóa và được chuyển hóa bởi các esterase không đặc hiệu ở thành ruột thành chất chuyển hóa cefpodoxim có tác dụng kháng khuẩn. Ở mức liều khuyến nghị sử dụng 100 - 400 mg, nồng độ đỉnh cefpodoxim đạt được trong huyết tương người khoảng từ 1,4 – 3,9 µg/ml [1]. Hiện nay, một số doanh nghiệp dược đã và đang nghiên cứu sản xuất các chế phẩm thuốc uống chứa dược chất cefpodoxim dạng proxetil nên nhu cầu nghiên cứu tương đương sinh học là điều cần thiết. Xuất phát từ thực tế này, đồng thời dựa vào trang thiết bị hiện có và tham khảo một số phương pháp phân tích đã được các tác giả công bố [3],[4],[6] cũng như dựa trên nguyên lý của phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao, chúng tôi đã tiến hành nghiên cứu định lượng cefpodoxim trong huyết tương người bằng phương pháp HPLC.

2. Thực nghiệm

2.1. Nguyên vật liệu

- **Chất chuẩn:** Cefpodoxim ($C_{15}H_{17}N_5O_6S_2$; KLPT: 427,45 g/mol); SKS: P16D031, hàm lượng: 98,98%, độ ẩm: 0,39% của hãng Alfa Aesar (Thermo Fisher Scientific).

- **Dung môi, hóa chất:** Acetonitril, methanol, kali dihydrophosphat (KH_2PO_4) đạt tiêu chuẩn tinh khiết dùng cho phân tích hoặc sắc ký.

- **Huyết tương trắng:** Không có Cefpodoxim (CEFPO) của Viện Huyết học và Truyền máu Trung ương.

2.2. Thiết bị và dụng cụ phân tích

2.2.1. Thiết bị

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

- Máy sắc ký lỏng hiệu năng cao Shimadzu, Nhật Bản;

- Cân phân tích 5 số Mettler (Thụy Sĩ, độ chính xác $d = 0,01$ mg);

- Cân kỹ thuật Sartorius;
- Máy đo pH meter 913 (Mettler, Thụy Sĩ);
- Tủ lạnh sâu $-35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Panasonic – Nhật Bản);
- Máy ly tâm lạnh (Sigma 4-16K – Đức);

2.2.2. Dụng cụ

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

2.3. Điều kiện phân tích

2.3.1. Điều kiện sắc ký

- Cột sắc ký: C18 (250 x 4,6 mm; 5 µm). Nhiệt độ cột $40\text{ }^{\circ}\text{C}$.

- Pha động: Methanol - dung dịch đệm KH_2PO_4 0,02M pH 6,8 (tỷ lệ thích hợp).

- Tốc độ dòng: 1,5 ml/phút.
- Detector: PDA, $\lambda = 235$ nm.
- Thể tích tiêm: 50 µl.
- Nhiệt độ autosampler: $15\text{ }^{\circ}\text{C}$.

2.3.2. Chuẩn bị mẫu

Chuẩn CEFPO được hòa tan trong hỗn hợp dung môi methanol - acetonitril (1:1) thu được dung dịch có nồng độ khoảng 500 µg/ml. Từ dung dịch chuẩn trong dung môi, chuẩn bị các dung dịch chuẩn CEFPO trong nước có nồng độ khoảng 100 µg/ml. Sau đó tiến hành chuẩn bị các mẫu chuẩn CEFPO trong huyết tương ở các nồng độ khảo sát khác nhau.

2.3.3. Phương pháp xử lý mẫu

Lấy 1,0 ml mẫu huyết tương (HT) đã rối đông ở nhiệt độ phòng, thêm 3 ml acetonitril, lắc, ly tâm 10000 vòng/phút x 5 phút. Chuyển lớp dịch trong sang ống chiết 15 ml, thêm 3 ml dicloromethan, lắc cơ học 10 phút, ly tâm 3000 vòng/phút x 5 phút. Hút lớp dịch trong phía trên, tiêm sắc ký.

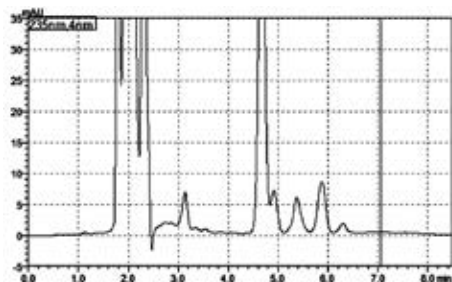
2.3.4. Phương pháp tính kết quả

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

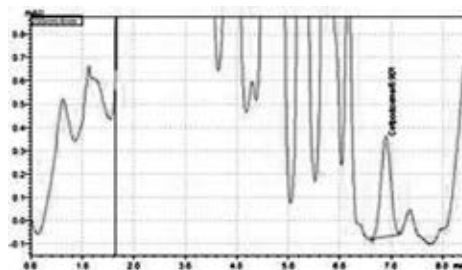
3. Kết quả và bàn luận

3.1. Độ đặc hiệu - chọn lọc của phương pháp

Phân tích các mẫu HT trắng, mẫu HT tự tạo chứa chuẩn CEFPO nồng độ khoảng 0,05 µg/ml theo phương pháp đã xây dựng và ghi lại các sắc ký đồ (Hình 1, 2).



Hình 1. SKĐ mẫu HT trắng



Hình 2. SKĐ mẫu HT trắng có CEFPO nồng độ 0,05 µg/ml

Trên SKĐ của mẫu HT trắng (Hình 1), tại thời điểm từ 6,8 đến 7,2 phút (trùng với thời gian lưu của pic CEFPO trong SKĐ mẫu chuẩn - Hình 2) không xuất hiện các pic có đáp ứng bằng 1/5 lần đáp ứng pic của mẫu chuẩn CEFPO ở nồng độ LLOQ. Do vậy, phương pháp phân tích có độ đặc hiệu-chọn lọc với CEFPO theo các quy định của phương pháp phân tích thuốc trong dịch sinh học [2],[5].

3.2. Đường chuẩn và khoảng tuyến tính

Phân tích các mẫu HT chứa chuẩn CEFPO có nồng độ khoảng 0,05 µg/ml đến 5,0 µg/ml theo quy trình đã xây dựng. Xác định sự tương quan giữa nồng độ CEFPO có trong mẫu và diện tích pic CEFPO thu được trên SKĐ bằng phương pháp hồi qui tuyến tính, sử dụng hệ số tỷ trọng $1/(\text{nồng độ})^2$.

Kết quả xác định mối tương quan này được trình bày ở Bảng 1.

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

Mẫu chuẩn Nồng độ (µg/ml)	Độ đúng (%)				
	Đường chuẩn 1	Đường chuẩn 2	Đường chuẩn 3	Đường chuẩn 4	Đường chuẩn 5
0,05	102,6	102,0	105,4	100,6	102,6
0,1	95,6	97,0	90,0	99,3	95,9
0,2	97,5	97,1	97,8	98,8	96,9
0,5	102,3	104,0	100,0	99,2	101,2
1,0	97,9	94,4	101,0	101,6	98,9
2,0	103,2	101,5	101,8	102,1	104,0
3,5	101,1	101,8	101,1	98,3	99,7
5,0	99,8	102,1	102,9	100,0	100,8
Phương trình hồi quy* ($y = a x + b$)	$y = 92886,0 x + 156,110$	$y = 93202,1 x + 544,765$	$y = 93188,9 x + 1004,54$	$y = 95063,8 x + 336,726$	$y = 95007,23 x + 331,702$
Hệ số r	0,9995	0,9992	0,9986	0,9999	0,9995

(*) Ghi chú: x là nồng độ CEFPO (µg/ml) có trong mẫu; y là diện tích pic CEFPO

Kết quả thẩm định cho thấy trong khoảng nồng độ từ 0,05 µg/ml đến 5,0 µg/ml có sự tương quan tuyến tính giữa nồng độ CEFPO và diện tích pic CEFPO với hệ số tương quan xấp xỉ bằng 1. Nồng độ CEFPO xác định từ đường chuẩn so với nồng độ lý thuyết đều nằm trong giới hạn cho phép (80 - 120% đối với nồng độ thấp nhất, 85 - 115% đối với các nồng độ còn lại) theo quy định của phương pháp phân tích thuốc trong dịch sinh học [2],[5].

3.3. Giới hạn định lượng dưới của phương pháp

Phân tích các mẫu HT trắng và mẫu HT chứa chuẩn CEFPO có nồng độ chính xác khoảng 0,05 µg/ml (mẫu LLOQ). Xác định nồng độ CEFPO có trong các mẫu LLOQ từ các đường chuẩn tiến hành làm song song trong cùng điều kiện.

Kết quả thẩm định giới hạn định lượng dưới của phương pháp được trình bày ở Bảng 2.

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

STT	Mẫu trắng	Mẫu chuẩn (0,05 µg/ml)		
	Diện tích pic	Diện tích pic CEFPO	Nồng độ CEFPO tìm thấy (µg/ml)	Độ đúng (%)
1	0	5524	0,047	92,0
2	0	5532	0,047	92,2
3	0	5324	0,045	87,8
4	0	6350	0,056	109,4
5	0	5569	0,047	92,9
6	0	5676	0,049	95,2
TB	0		0,048	94,9
CV (%)			7,9	7,9
Đáp ứng trung bình của mẫu trắng /LLOQ			0	

Kết quả thẩm định cho thấy trong các mẫu trắng không xuất hiện pic tạp có cùng thời gian lưu của pic CEFPO trong các mẫu LLOQ. Tỷ lệ giữa nồng độ CEFPO xác định từ đường chuẩn so với nồng độ lý thuyết có trong các mẫu LLOQ nằm trong khoảng 87,8% - 109,4% (Trung bình = 94,9% và CV = 7,9%), đáp ứng yêu cầu giới hạn định lượng dưới của phương pháp phân tích thuốc trong dịch sinh học [5],[6].

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

Tiến hành thẩm định độ đúng, độ lặp lại trên 4 lô mẫu LLOQ, LQC, MQC, HQC chứa CEFPO có nồng độ tương ứng là 0,05 µg/ml; 0,15 µg/ml; 2,5 µg/ml, 4,0 µg/ml. Xác định hàm lượng CEFPO có trong các mẫu bằng đường chuẩn phân tích trong cùng điều kiện.

Độ đúng của phương pháp là tỷ lệ % giữa nồng độ xác định được so với nồng độ lý thuyết. Độ lặp lại của phương pháp được biểu thị bằng giá trị CV%.

Kết quả xác định độ đúng, độ lặp lại của phương pháp (giá trị trung bình) được trình bày ở Bảng 3.

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

Độ đúng, độ lặp lại	LLOQ (≈ 0,05 µg/ml)		LQC (≈ 0,15 µg/ml)		MQC (≈ 2,5 µg/ml)		HQC (≈ 4,0 µg/ml)	
	Độ đúng (%)	CV (%)	Độ đúng (%)	CV (%)	Độ đúng (%)	CV (%)	Độ đúng (%)	CV (%)
Trong ngày (n = 6)	94,9	7,9	99,4	2,1	101,4	2,2	99,7	0,8
Khác ngày (n = 3)	98,6	9,7	102,8	4,0	101,0	3,5	100,9	2,5

Kết quả thẩm định cho thấy ở các nồng độ thấp, trung bình và cao, phương pháp có độ đúng trong ngày và khác ngày trong xấp xỉ 100%; độ lặp lại trong ngày và khác ngày với giá trị CV nhỏ hơn 10%.

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

Tiến hành nghiên cứu độ ổn định của CEFPO trong HT trên các lô mẫu LQC và HQC. Đánh giá độ ổn định của CEFPO trong HT bằng cách so sánh nồng độ CEFPO có trong các mẫu được bảo quản và các mẫu có nồng độ tương ứng được phân tích ngay sau khi hòa tan chuẩn CEFPO vào HT trắng. Kết quả nghiên cứu độ ổn định CEFPO được trình bày trong Bảng 4.

Bảng 4. Kết quả nghiên cứu độ ổn định của CEFPO trong huyết tương

Độ ổn định	Mẫu	Nồng độ ban đầu (µg/ml; n = 6)	Nồng độ sau bảo quản (µg/ml; n = 6)	% Sai khác
Ba chu kì đông – rã đông	LQC	0,166	0,147	-11,3
	HQC	4,429	4,389	-0,9
Độ ổn định thời gian ngắn (4 giờ, nhiệt độ phòng)	LQC	0,166	0,168	0,8
	HQC	4,429	4,463	0,8
Độ ổn định trong autosampler (26 giờ/15°C)	LQC	0,160	0,163	2,6
	HQC	4,014	4,026	2,4
Độ ổn định dài ngày (-35 °C ± -5 °C, 63 ngày)	LQC	0,166	0,160	-3,6
	HQC	4,429	4,385	-1,0

4. Kết luận

Nghiên cứu đã xây dựng được phương pháp định lượng cefpodoxim trong huyết tương người bằng phương pháp HPLC. Kết quả thẩm định cho thấy, phương pháp có giá trị giới hạn định lượng dưới nhỏ (0,05 µg/ml); khoảng tuyến tính rộng (từ 0,05 µg/ml đến 5,0 µg/ml); độ đúng dao động trong khoảng 94,9% - 101,4%; độ lặp lại với giá trị CV% nhỏ (2,1% - 7,9%). thời gian phân tích ngắn (9,0 phút cho mỗi mẫu), đáp ứng yêu cầu đối với phương pháp phân tích thuốc trong dịch sinh học của US-FDA và EMA [2],[5]. Phương pháp đã xây dựng có thể ứng dụng trong các nghiên cứu đánh giá tương đương sinh học đối với chế phẩm chứa hoạt chất Cefpodoxim.

Tài liệu tham khảo

1. Bộ Y tế (2015), *Dược thư quốc gia Việt Nam*, lần xuất bản thứ 2, Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật, trang 363-365.
2. European Medicines Agency, Committee for Medicinal Products for Human Use (2011): *Guideline on Bioanalytical Method Validation*.
3. GE Qing-hua, ZHOU Zhen, ZHI Xiao-jin, DING Cun-gang, LI Xue-ning (2009), “Bioequivalence of cefpodoxime proxetil for dry syrup in healthy male volunteers”; *World Clinical Drugs*; 2009-11.
4. J-h. Zhang, S. Guo, M. Xu, L-X. Wu) (2013), “A Simply HPLC Method for Determination of Cefpodoxime in Chinese Volunteer and Pharmacokinetic Study”. *Drug Res*, 63(08): 435-438.
5. US-FDA, U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration (2013): *Guidance for Industry – Bioanalytical Method Validation*.
6. XU Wen-wei; XIA Chun-hua; ZHANG Hong; ZHANG Hui-jie; ZHANG Xin-jing (2006), “HPLC determination and pharmacokinetics study of cefpodoxime in human plasma”. *Chinese Journal of Pharmaceutical Analysis*, Volume 26, Number 4, 1, pp. 450-452.

SUMMARY

A RP-HPLC method was established for the determination of Cefpodoxime in human plasma. A C18 column was used with the mobile phase of Methanol, Phosphate buffer (pH 6.8) with suitable ratio at the detection wavelength of 235 nm. The flow rate was 1.5 ml/min. The assay was linear over the concentration range of 0.05 – 5.00 µg/ml. The LLOQ was 0.05 µg/ml. The intra-day and inter-day accuracy were within 94.9% - 102.8%. This method can be used for BE studies of Cefpodoxime preparations.

(Ngày nhận bài: 10/5/2018 ; Ngày phản biện: 20/8/2018 ; Ngày duyệt đăng: 02/01/2019)

TỔNG HỢP VÀ TINH CHẾ 2-AMINO-5-METHYLTHIAZOL ĐỂ LÀM TẠP CHUẨN DƯỢC ĐIỂN VIỆT NAM

NGUYỄN VĂN GIANG
Trường Đại học Dược Hà nội

LÊ THỊ THU, VŨ HÀ KHUÊ, NGUYỄN THỊ HỒNG
Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương

Từ khóa: Tổng hợp, tinh chế, 2-amino-5-methylthiazol, tạp chất chuẩn, Meloxicam

1. Đặt vấn đề

Meloxicam là một hoạt chất thuộc nhóm thuốc giảm đau chống viêm không steroid chủ yếu được chỉ định trong điều trị viêm đau xương khớp, viêm khớp dạng thấp, viêm cột sống,... [2]. Các chế phẩm chứa meloxicam thường được bào chế dưới dạng viên nén, viên nang, hỗn dịch uống hoặc dung dịch tiêm [2] được sử dụng rất rộng rãi trong điều trị ở Việt Nam, và được sản xuất bởi các công ty dược phẩm trong nước hoặc được nhập khẩu từ nước ngoài. Trong các tạp chất của meloxicam, tạp chất B có tên khoa học là 2-amino-5-methylthiazol [1],[5],[7], là sản phẩm phân

hủy của meloxicam và có độc tính đối với cơ thể. Các được diễn hiện hành đều yêu cầu phải sử dụng chuẩn tạp này để kiểm tra chất lượng nguyên liệu cũng như các dạng bào chế của meloxicam [1],[5],[6],[7]. Tuy nhiên, chuẩn 2-amino-5-methylthiazol hiện nay chủ yếu được thiết lập tại Hội đồng Dược điển Mỹ và Châu Âu với giá bán cao hơn rất nhiều so với các chuẩn hoạt chất thông thường: Meloxicam related compound B USPRS có giá 692 USD/25 mg, Meloxicam impurity B EPRS có giá là 79 EU/5 mg.

Việc thiết lập được các chuẩn tạp trong nước thường rất khó khăn do không sẵn có nguồn nguyên liệu.

Hơn nữa đặt hàng tổng hợp tinh chế các tạp chất từ các nhà sản xuất nguyên liệu nước ngoài cũng không dễ dàng do khối lượng đặt hàng ít, giá thành cao kèm theo nhiều thủ tục nhập khẩu phức tạp. Từ thực tế đó, chúng tôi định hướng nghiên cứu tổng hợp và tinh chế 2-amino-5-methylthiazol tinh khiết để thiết lập chuẩn tạp phục vụ cho việc kiểm tra chất lượng nguyên liệu và các dạng bào chế của meloxicam.

2. Thực nghiệm

2.1. Thiết bị, dụng cụ và hóa chất

2.1.1. Thiết bị và dụng cụ

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

* Thiết bị và dụng cụ tại Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương.

- Máy đo quang phổ hồng ngoại Thermo Nicolet IS 50 FT-IR;

- Máy đo nhiệt độ nóng chảy BuChi M-565;

- Máy sắc ký lỏng hiệu năng cao HPLC-UV-ECD Agilent 1260 và HPLC-Shimadzu 20A;

- Máy chuẩn độ điện thế Metrohm;

- Máy chuẩn độ nước Coulometer Metrohm 756 KF;

- Cân phân tích: Metler Toledo MS 105 độ chính xác 0,1 mg;

- Cột C18 Gemini NX (250 x 4,6 mm, 5 μ m);

- Dụng cụ thủy tinh chính xác các loại.

* Thiết bị và dụng cụ tại đơn vị khác:

- Máy sắc ký lỏng khối phổ LC-MS/MS Agilent

1290/6460 (Mỹ) của Viện Công nghệ dược phẩm quốc gia với chế độ đo ESI, dung môi methanol;

- Máy đo phổ cộng hưởng từ hạt nhân ^1H -NMR và ^{13}C -NMR: Bruker AV500 của Khoa Hóa học – Đại học Quốc gia Hà Nội;

- Máy đo nhiệt độ nóng chảy EZ-Melt của Bộ môn Công nghiệp Dược – Trường Đại học Dược Hà Nội;

- Bình cầu các loại, sinh hàn, máy khuấy từ IKA và các dụng cụ cần thiết khác sử dụng để tổng hợp hóa học của Bộ môn Công nghiệp Dược – Trường Đại học Dược Hà Nội.

2.1.2. Dung môi, hóa chất, chất chuẩn

- Chuẩn tạp Meloxicam related compound B (2-amino-5-methylthiazol) USPRS: Số lô H0K353, hàm lượng 99,0% tính theo nguyên trạng;

- Thioure của Sigma – Aldrich đạt tinh khiết phân tích;

- Propionaldehyd – Prolabo đạt tinh khiết phân tích;

- Cloroform đạt tinh khiết phân tích;

- Các hóa chất khác có nguồn gốc Merck và đạt tinh khiết phân tích.

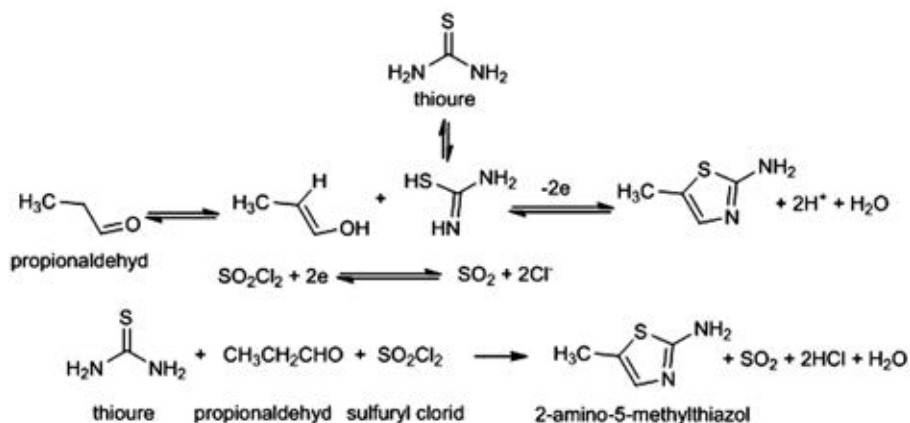
2.2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Đối tượng nghiên cứu

- Thioure tinh khiết của Sigma – Aldrich.

2.2.2. Tổng hợp 2-amino-5-methylthiazol

Sơ đồ quá trình tổng hợp 2-amino-5-methylthiazol từ thioure.



Hình 1. Sơ đồ quá trình tổng hợp 2-amino-5-methylthiazol từ thioure với tác nhân propionaldehyd và sulfuryl clorid

2.2.3. Tinh chế và thử độ tinh khiết sơ bộ

Sử dụng các kỹ thuật trong tổng hợp hữu cơ để tổng hợp và tinh chế sản phẩm bao gồm: chiết, lọc, loại tạp màu, gạn, kết tinh...

Sắc ký lớp mỏng tiến hành trên bản mỏng Kieselgel 60 F_{254} với hệ dung môi thích hợp, phát hiện vết dưới đèn tử ngoại 254 nm để theo dõi tiến trình của phản ứng và thử sơ bộ độ tinh khiết.

Phương pháp đo nhiệt độ nóng chảy.

Quá trình tổng hợp và tinh chế sản phẩm, thử sơ bộ tinh khiết được tiến hành tại phòng Tổng hợp Hóa dược – Bộ môn Công nghiệp Dược – Trường Đại học Dược Hà Nội.

2.2.4. Xác định cấu trúc, nhận dạng chất

Sản phẩm tổng hợp được khẳng định cấu trúc bằng các phương pháp phân tích phổ hiện đại: phổ khối (MS) với chế độ ESI-MS, phổ cộng hưởng từ hạt nhân $^1\text{H-NMR}$ và $^{13}\text{C-NMR}$ với chất chuẩn nội tetramethylsilan (TMS). Tiếp theo các chất sẽ được định tính so sánh với chuẩn gốc USP bằng đo phổ hấp thụ từ ngoại và phổ hồng ngoại (viên nén KBr).

2.2.5. Kiểm tra chất lượng nguyên liệu sau tinh chế

Sản phẩm của quá trình tổng hợp và tinh chế sau khi xác định cấu trúc được kiểm tra chất lượng áp dụng các phương pháp phân tích được xây dựng và thẩm định dựa theo ĐDVN V. Chất chuẩn 2-amino-5-methylthiazol của Hội đồng Dược điển Mỹ được sử dụng để làm chuẩn gốc. Các phương pháp phân tích được áp dụng bao gồm:

- Định tính: Quang phổ UV-VIS và quang phổ hồng ngoại.
- Đo nhiệt độ nóng chảy.
- Hàm lượng nước: Chuẩn độ đo điện tích.
- Tạp chất liên quan: Phương pháp HPLC.
- Định lượng: Phương pháp HPLC.

3. Kết quả và bàn luận

3.1. Quy trình tổng hợp 2-amino-5-methylthiazol

Cho vào bình cầu dung tích 50 ml hỗn hợp gồm: thioure (4,6 g, 0,06 mol), 0,91 ml (0,03 mol) propionaldehyd và 20 ml cloroform (CHCl_3). Hỗn hợp sau đó được làm lạnh xuống 0 – 5°C và sulfuryl clorid – SO_2Cl_2 (4,45 g, 0,033 mol) được thêm từ từ vào khối phản ứng, nhiệt độ được duy trì < 20°C (phản ứng toả nhiệt mạnh và sinh khí khi thêm sulfuryl clorid). Sau khi nhỏ hết SO_2Cl_2 , hỗn hợp được khuấy thêm 30 phút và CHCl_3 được cất khỏi khối phản ứng ở áp suất thường. Phần còn lại được thêm 20 ml ethanol và đun hồi lưu trong 3 giờ. Tiếp tục loại ethanol bằng cất áp suất giảm

thu được phần dầu. Thêm vào phần dầu này 10 ml nước cất và 2,5 ml ethyl acetat, khuấy mạnh, chiết lấy pha nước. Pha nước sau đó được kiềm hoá đến pH 12 bằng dung dịch amoniac 25% và chiết lại bằng ethyl acetat. Pha ethyl acetat được rửa lại bằng nước cất và làm khan bằng Na_2SO_4 . Cất loại dung môi ở áp suất giảm thu được 1,3 g sản phẩm 2-amino-5-methylthiazol thô là chất rắn màu nâu nhạt, hiệu suất 37,96%, T_{nc} 88 – 92°C.

3.2. Quá trình tinh chế

Tiến hành tinh chế sản phẩm 2-amino-5-methylthiazol bằng cách kết tinh lại trong acetone ở điều kiện lạnh.

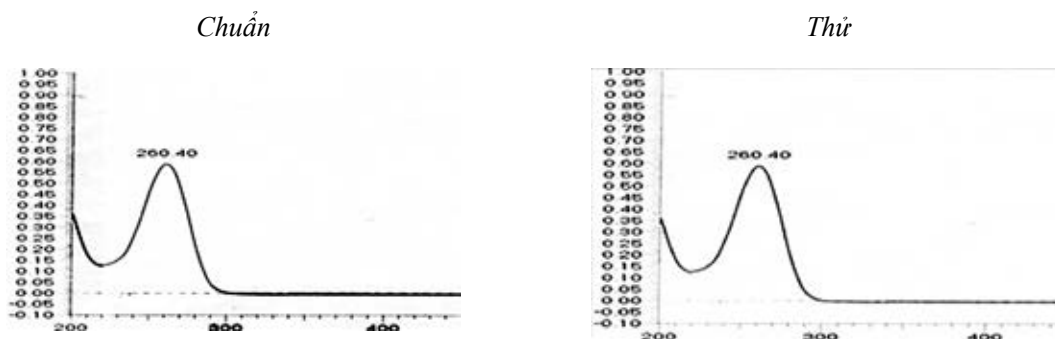
Hòa tan hết 1,3 g 2-amino-5-methylthiazol thô ở trên trong 5 ml acetone ở nhiệt độ phòng. Lọc loại bỏ phần không tan. Sau đó dung dịch được làm lạnh hỗn hợp xuống -5 °C trong 3 ngày, lọc thu tinh thể, rửa bằng acetone lạnh thu được 2-amino-5-methylthiazol tinh khiết. Sơ bộ kiểm tra sản phẩm về nhiệt độ nóng chảy nằm trong khoảng từ 94 - 95°C.

STT	Nhiệt độ nóng chảy (°C)		Hiệu suất kết tinh (%)
	Trước tinh chế	Sau tinh chế	
1	88 – 92	94 – 95	45,23
2	88 – 92	94 – 95	44,56
3	89 – 92	94 – 95	45,15
TB		94 – 95	44,98

3.3. Kết quả khẳng định cấu trúc của sản phẩm bằng phân tích phổ

3.3.1. Phổ UV-VIS

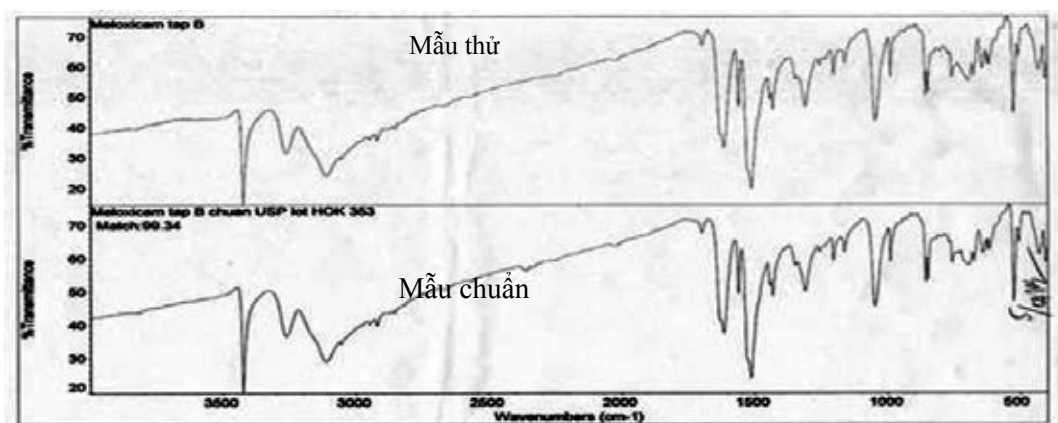
Song song tiến hành quét phổ UV – VIS của dung dịch chuẩn Mỹ 2-amino-5-methylthiazol số lô: H0K353 và dung dịch 2-amino-5-methylthiazol sau khi tinh chế với nồng độ 0,8 µg/ml trong methanol ở khoảng bước sóng từ 200 – 400 nm. Kết quả cho thấy phổ hấp thụ UV – VIS của 2-amino-5-methylthiazol chuẩn và 2-amino-5-methylthiazol sau khi tinh chế đều cho 1 cực đại hấp thụ (λ_{max}) ở bước sóng 260,4 nm.



Hình 2. Phổ hấp thụ từ ngoại của 5-methylthiazol-2-amin

3.3.2. Phổ IR

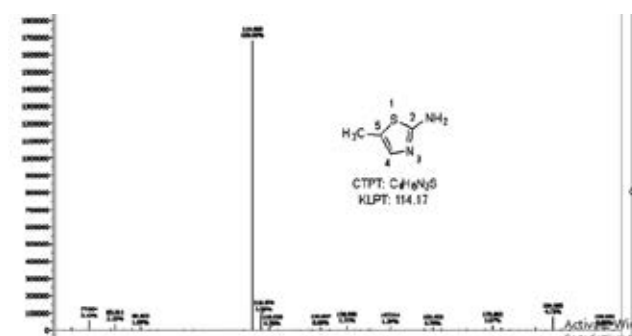
Phổ hồng ngoại của nguyên liệu 2-amino-5-methylthiazol sau tinh chế trùng với phổ hồng ngoại của 2-amino-5-methylthiazol chuẩn Mỹ số lô: H0K353 với hệ số match 99,34%.



Hình 3. Phổ IR của 2-amino-5-methylthiazol

3.3.3. Phổ khối (MS)

Dữ liệu phổ ESI-MS của 2-amino-5-methylthiazol tổng hợp được có pic ion (m/z): 114,969 $[M+H]^+$ tương ứng với khối lượng phân tử của 2-amino-5-methylthiazol (CTPT $C_4H_6N_2S$, $M = 114,17$).

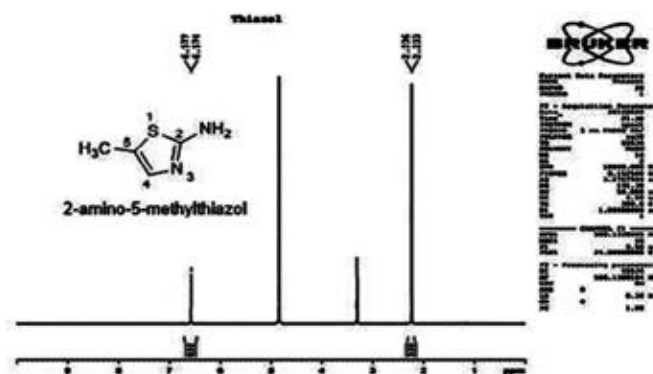


Hình 4. Phổ MS của 2-amino-5-methylthiazol

3.3.4. Phổ cộng hưởng từ hạt nhân (NMR)

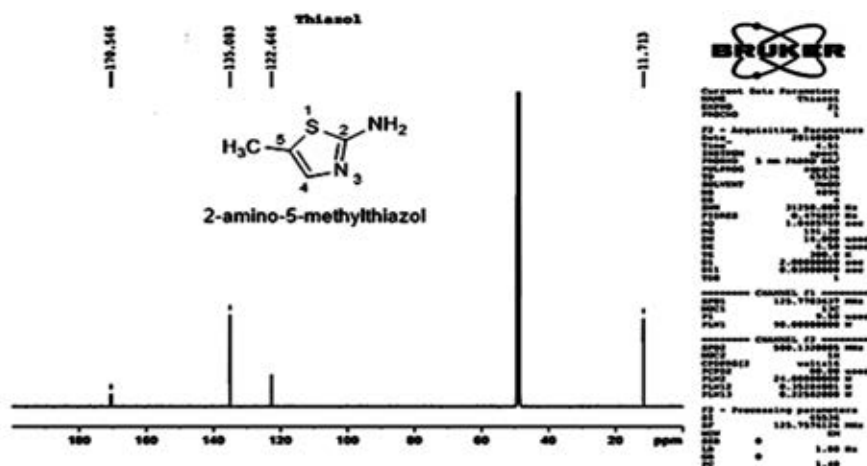
Phân tích dữ liệu phổ cộng hưởng từ 1H và ^{13}C của 2-amino-5-methylthiazol tổng hợp được cho thấy xuất hiện các tín hiệu proton và carbon phù hợp với công thức cấu tạo.

Phổ 1H -NMR (CD_3OD), δ , ppm: 2,23 (3H, s, CH_3); 6,57 (1H, s, H-4). Tín hiệu của nhóm NH_2 xuất hiện trùng với dung môi do chất được đo trong dung môi CD_3OD dẫn đến hiện tượng trao đổi proton với deuteri của CD_3OD .



Hình 5. Phổ 1H -NMR của 2-amino-5-methylthiazol

Phổ ^{13}C -NMR (CD_3OD), δ , ppm : 11,71 ($\text{C}-\text{CH}_3$) ; 122,64 ($\text{C}-5$) ; 135,08 ($\text{C}-4$) ; 170,55 ($\text{C}-2$).



Hình 6. Phổ ^{13}C -NMR của 2-amino-5-methylthiazol

Phân tích dữ liệu phổ cộng hưởng từ ^1H và ^{13}C của 2-amino-5-methylthiazol tổng hợp được cho thấy xuất hiện các tín hiệu proton và carbon phù hợp với công thức cấu tạo.

Như vậy, từ kết quả phân tích tính chất và dữ liệu phổ UV-VIS, IR, MS và NMR kết hợp so sánh với chuẩn có thể khẳng định chất sau khi tinh chế là 2-amino-5-methylthiazol.

3.4. Kết quả kiểm tra chất lượng sản phẩm sau tinh chế

3.4.1. Hàm lượng nước

Hàm lượng nước được xác định bằng phương pháp KF, kết quả như trong Bảng 1.

Bảng 1. Kết quả xác định hàm lượng nước của 2-amino-5-methylthiazol sau tinh chế

Mẫu thử	Thử 1	Thử 2	Thử 3	Thử 4	Thử 5
Lượng cân mẫu thử (g)	0,04851	0,04796	0,05052	0,05228	0,04856
Lượng thuốc thử KF (μg)	60,0	64,6	70,2	69,8	85,0
Hàm lượng nước (%)	0,12	0,13	0,14	0,13	0,18
Trung bình	0,14% (s = 0,02, n = 5)				

3.4.2. Xác định tạp chất liên quan

Sử dụng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao với điều kiện sắc ký như theo quy định của Dược điển Việt Nam V để tiến hành xác định hàm lượng tạp chất liên quan có trong nguyên liệu 2-amino-5-methylthiazol sau tinh chế. Pha động là hỗn hợp dung dịch đệm phosphat pH 6,0 và methanol theo tỉ lệ 80 : 20. Thioure được cho vào để kiểm tra độ phân tách của hệ sắc ký đồng thời xác định vị trí rửa giải của chất này trong nguyên liệu 2-amino-5-methylthiazol (nếu có).

Chuẩn bị dung dịch như sau :

Dung dịch thử: Cân chính xác khoảng 20 mg chế phẩm, hòa tan trong 5 ml methanol, thêm dung dịch đệm pH 6,0 vừa đủ 25 ml.

Dung dịch đối chiếu (1): Hút 1,0 ml dung dịch thử,

pha loãng bằng pha động vừa đủ 100 ml.

Dung dịch đối chiếu (2): Cân chính xác khoảng 20 mg thioure, hòa tan và pha loãng vừa đủ trong 25 ml methanol. Hút 1,0 dung dịch trên pha loãng bằng pha động vừa đủ 100 ml.

Dung dịch phân giải: Cân chính xác khoảng 2 mg thioure và 2 mg 2-amino-5-methylthiazol hòa tan và pha loãng trong pha động vừa đủ 25,0 ml.

Tiến hành: Tiến hành sắc ký lần lượt đối với dung dịch phân giải, dung dịch đối chiếu (1), dung dịch đối chiếu (2), dung dịch thử. Phép thử chỉ có giá trị khi hệ số phân giải giữa pic thioure và 2-amino-5-methylthiazol không được nhỏ hơn 10; hệ số đối xứng của các pic chính trong dung dịch đối chiếu (1), (2) không được lớn hơn 2,0.

Tính (%) hàm lượng tạp thioure và tạp khác trong dung dịch thử theo công thức:

$$(\%) \text{ Thioure} = r_t / r_{S2}$$

$$(\%) \text{ Tạp} = r_i / r_{S1}$$

Trong đó:

r_t : diện tích của tạp thioure trong dung dịch thử.

r_i : diện tích của từng pic tạp khác.

r_{S1} : diện tích pic 2-amino-5-methylthiazol trong dung dịch đối chiếu (1).

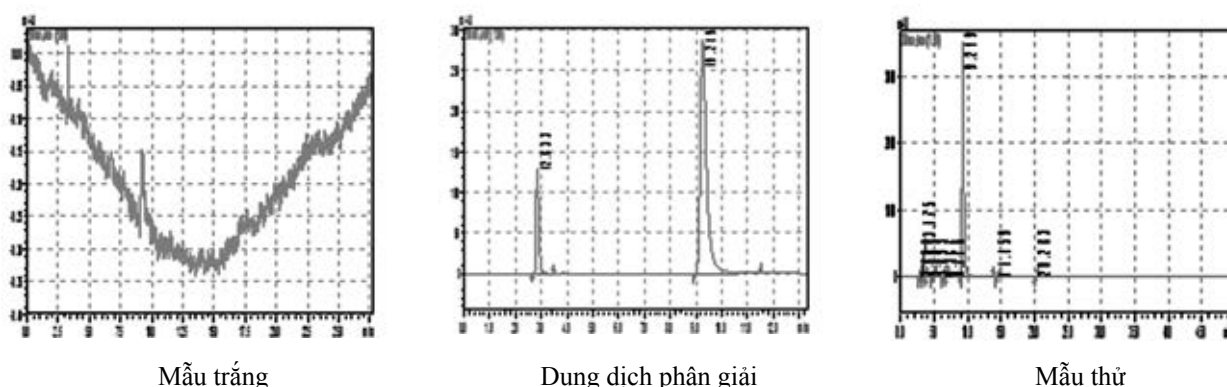
r_{S2} : diện tích pic thioure trong dung dịch đối chiếu (2).

Kết quả thu được trong Bảng 2 và Hình 9.

Bảng 2. Kết quả xác định tạp trong sản phẩm 2-amino-5-methylthiazol

<i>Thiết bị: Máy HPLC Shimadzu 20A (VKN/TT/06.21)</i>								
<i>Cột C18 Gemini NX, 250 x 4,6 mm, 5 μm, duy trì nhiệt độ ở 45 °C</i>								
<i>Thời gian lưu: $t_{R(Thioure)} = 2,8$ phút</i>								
<i>$t_{R(5\text{-methylthiazol-2-amin})} = 9,2$ phút</i>								
<i>Độ phân giải $R_{(Thioure/5\text{-methylthiazol-2-amin})} = 20,2$</i>								
<i>Hệ số bất đối: $T_{thioure} = 1,44$; $T_{2\text{-amino-5-methylthiazol}} = 1,80$</i>								
Diện tích pic dung dịch đối chiếu								
Lần tiêm		Dung dịch đối chiếu (1)				Dung dịch đối chiếu (2)		
1		500118				94762		
2		503556				94388		
3		500728				94250		
4		502313				94437		
5		503434				94543		
6		501753				94837		
Trung bình		501984				94536		
MẪU THỬ								
Pic tạp	Thời gian lưu (phút)	Thử 1 <i>Lượng cân: 20,09 mg</i>		Thử 2 <i>Lượng cân: 20,04 mg</i>		Thử 3 <i>Lượng cân: 20,03 mg</i>		Trung bình (% tạp)
		<i>Dt pic tạp (mAU.s)</i>	<i>% Tạp</i>	<i>Dt pic tạp (mAU.s)</i>	<i>% Tạp</i>	<i>Dt pic tạp (mAU.s)</i>	<i>% Tạp</i>	
Thioure	2,8	4049	0,043	3539	0,037	3777	0,040	0,04
Tạp 1	3,2	5050	0,010	4802	0,010	4859	0,010	0,01
Tạp 2	3,8	11326	0,023	11251	0,022	10639	0,021	0,02
Tạp 3	4,9	14576	0,029	14154	0,028	13854	0,028	0,03
Tạp 4	6,3	3994	0,008	5638	0,011	2720	0,005	0,01
Tạp 5	6,8	1420	0,003	2816	0,006	1709	0,003	0,01
Tạp 6	14,5	5269	0,010	6111	0,012	5319	0,011	0,01
Tạp 7	20,3	3410	0,007	4189	0,008	5356	0,011	0,01
Tổng tạp		0,13		0,13		0,13		0,13

Kết quả cho thấy nguyên liệu 2-amino-5-methylthiazol sau khi tinh chế có tổng hàm lượng tạp chất là rất nhỏ: 0,13%, đạt yêu cầu về tạp chất để thiết lập chất chuẩn tạp.



Hình 7. Sắc ký đồ xác định tạp chất liên quan trong nguyên liệu 2-amino-5-methylthiazol

3.4.3. Định lượng

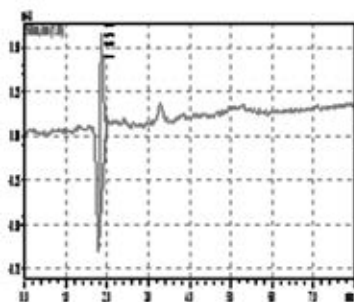
Sử dụng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao với điều kiện phân tích theo Dược điển Việt Nam V để tiến hành định lượng nguyên liệu 2-amino-5-methylthiazol sau tinh chế. Pha động là hỗn hợp dung dịch đệm phosphat pH 6,0 và methanol theo tỉ lệ 60 : 40. Dung dịch thử có chứa 2-amino-5-methylthiazol trong pha động nồng độ 0,08 mg/ml. Tiến hành song song với chuẩn Mỹ 2-amino-5-methylthiazol số lô: H0K353 có hàm lượng 99,0% tính theo nguyên trạng. Kết quả thu được trong Hình 8 và Bảng 3.

Bảng 3. Kết quả định lượng nguyên liệu 2-amino-5-methylthiazol

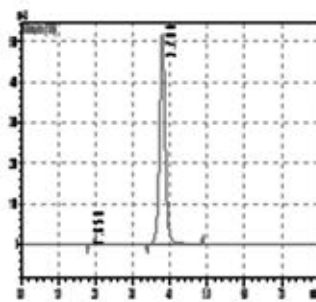
Thiết bị: Máy sắc ký lỏng Shimadzu LC – 20A (VKN/TT/06.21) Cột C18 Gemini NX: 250 x 4,6 mm, 5 μ m, duy trì nhiệt độ ở 45 °C Lượng cân chuẩn: 9,48 mg Diện tích pic trung bình của chuẩn: 6064429 mAU.s			
Mẫu thử	Lượng cân (mg)	Diện tích pic (mAU.s)	Hàm lượng (% ,khan)
Thử 1	7,86	4984340	98,28
Thử 2	8,20	5193569	98,16
Thử 3	8,26	5201121	97,58
Thử 4	8,28	5253732	98,33
Thử 5	8,32	5283385	98,41
Thử 6	8,47	5378089	98,40
Trung bình (%)			98,19
RSD (%)			0,32

Hàm lượng nguyên liệu 2-amino-5-methylthiazol thu được là 98,19% tính theo chất khan (n = 6, RSD = 0,32%).

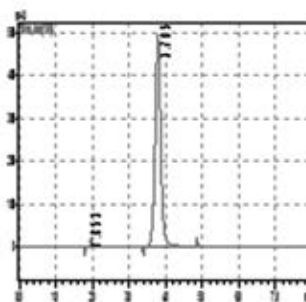
Kết quả phân tích sơ bộ trên 3 chỉ tiêu hàm lượng nước, tạp chất liên quan và định lượng cho thấy nguyên liệu 2-amino-5-methylthiazol tổng hợp và tinh chế đạt yêu cầu để sử dụng thiết lập tạp chuẩn.



Dung dịch phân giải



Mẫu chuẩn



Mẫu thử

Hình 8. Sắc ký đồ định lượng nguyên liệu 2-amino-5-methylthiazol

4. Kết luận

Như vậy, chúng tôi đã tổng hợp và tinh chế được 2-amino-5-methylthiazol đạt độ tinh khiết cao (98,19%) đáp ứng yêu cầu làm nguyên liệu thiết lập chất chuẩn tạp dùng trong kiểm nghiệm nguyên liệu và các dạng bào chế của meloxicam. Tạp chất này đang tiếp tục được nghiên cứu độ ổn định để sử dụng làm chất chuẩn.

Tài liệu tham khảo

1. Bộ Y tế (2017), *Dược Điển Việt Nam V*, Nhà xuất bản Y học, Hà Nội.
2. Bộ Y tế (2015), *Dược thư quốc gia Việt nam*, xuất bản lần thứ 2, tr. 940-941.
3. Martindale: *The Complete Drug Reference* 36 (2009).
4. *The Merck index* (2009).
5. *The British Pharmacopoeia* (2016).
6. *The Japanese Pharmacopoeia*, Sixteenth Edition (2014).
7. *The United State Pharmacopoeia* 38 (2015).

SUMMARY

2-Amino-5-methylthiazol (presented in USP as meloxicam related compound B, and in BP as meloxicam impurity B) was synthesized and purified in order to establish impurity standard. Thioure was used as the main starting material for synthesis. Purification process was performed by recrystallization in acetone under the cold condition with the temperature of about -5 °C. The structure of synthesized 2-amino-5-methylthiazol is determined by UV, IR, NMR spectroscopy and ESI-MS. The purified 2-amino-5-methylthiazol contains 98.19 percent (on as is basis) by HPLC analysis comparing with meloxicam related compound B USPRS.

(Ngày nhận bài: 22/11/2017 ; Ngày phản biện: 24/8/2018 ; Ngày duyệt đăng: 02/01/2019)

THÔNG TIN KHOA HỌC - TIN TỨC

DANH MỤC THUỐC KHÔNG ĐẠT CHẤT LƯỢNG ĐÃ ĐƯỢC BỘ Y TẾ XỬ LÝ TỪ 01/06/2018 ĐẾN 30/11/2018

HÀ THỊ MINH CHÁU

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 01/06/2018 đến 30/11/2018 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: 31 thuốc bị đình chỉ và thu hồi, rút số đăng ký của 26 thuốc và phát hiện 01 thuốc giả.

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

Danh mục đình chỉ lưu hành thuốc từ ngày 01/06/2018 đến ngày 30/11/2018

STT	Tên thuốc	Số lô	Ngày xuất xứ	Hạn dùng	Số đăng ký	Tên cơ sở sản xuất	Tên cơ sở nhập khẩu	Chỉ tiêu không đạt	Văn bản xử lý	Hành động xử lý
1	Viên nén Cravit Tab 250	CTBNF02		13/06/2021	VN-17415-13	Interthal Pharmaceutical Manufacturing Ltd. Thailand	Công ty TNHH Thương mại và Dược phẩm Sang	Định lượng	Công văn: số 10366/QLD-CL ngày 05/06/2018	Đình chỉ lưu hành và thu hồi toàn quốc
2	Viên nang cứng Berberin	032018	24/4/2018	24/4/2021	VD-14104-11	Công ty Cổ phần Amephaico - Xứ nghiệp Dược phẩm 120		Độ đồng đều khối lượng	Công văn: số 10797/QLD-CL ngày 11/06/2018	Đình chỉ lưu hành và thu hồi toàn quốc
3	Thuốc bột đông khô pha tiêm Vintypsin (Alphachymotrypsin 5000 đơn vị USP)	030118	4/1/2018	04/01/2021	VD-25833-16	Công ty Cổ phần Dược phẩm Vĩnh Phúc		Nội độc tố vi khuẩn đối với lo dùng mới	Công văn: số 11244/QLD-CL ngày 14/06/2018	Đình chỉ lưu hành và thu hồi toàn quốc
		010118	27/2/2018	02/01/2022						
4	Viên nén Mebendazol	010118	08/01/2018	08/01/2020	VD-26802-17	Công ty Cổ phần Dược phẩm Hà Nội		Độ hòa tan	Công văn: số 11699/QLD-CL ngày 25/06/2018	Đình chỉ lưu hành và thu hồi toàn quốc
5	Viên nang cứng Agifamcin 300	00318	08/01/2018	08/11/2021	VD-14223-11	Công ty Cổ phần Dược phẩm Agimexpharm		Độ hòa tan	Công văn: số 11864/QLD-CL ngày 26/06/2018	Đình chỉ lưu hành và thu hồi toàn quốc
6	Viên nén bao phim Unioct	LIJINE 1703		02/2020	VN-18786-15	Bai Pharma Ltd. India	Công ty Cổ phần Dược phẩm Codupha	Độ hòa tan	Công văn: số 12898/QLD-CL ngày 5/7/2018	Đình chỉ lưu hành và thu hồi trên địa bàn thành phố Hồ Chí Minh
7	Viên nén Pasapil (Enalapril maleat 5mg)	41	11/2016	01/11/2019	VN-15829-12	S.C.Arena Group S.A. Romania	Công ty TNHH MTV Dược Sài Gòn (Sapharoc)	Định lượng	Công văn: số 14037/QLD-CL ngày 23/7/2018	Đình chỉ lưu hành và thu hồi trên địa bàn tỉnh Quảng Ngãi
8	Thuốc Tam thất bột Phúc Hưng	041117		21/11/19	VD-24513-16	Công ty TNHH đồng dược Phúc Hưng		Độ nhiễm khuẩn	Công văn: số 14424/QLD-CL ngày 26/7/2018	Đình chỉ lưu hành và thu hồi trên địa bàn thành phố Hà Nội
9	Viên nang cứng Fenbrat 200M (Fenofibrat 200mg)	0118		01/02/2021	VD-27136-17	Công ty Cổ phần Dược phẩm và sinh học y tế		Độ hòa tan	Công văn: số 14542/QLD-CL ngày 27/7/2018	Đình chỉ lưu hành và thu hồi trên địa bàn thành phố Hồ Chí Minh
10	Thuốc cầm Rovag® 0,75 (Spiramycin 0,75M IU)	051117		03/11/2020	VD-22798-15	Công ty Cổ phần Dược phẩm Agimexpharm		Định lượng	Công văn: số 14545/QLD-CL ngày 27/7/2018	Đình chỉ lưu hành và thu hồi trên địa bàn thành phố Cần Thơ
11	Viên nén bao phim Unioct	LIJINE 1703		02/2020	VN-18786-15	Bai Pharma Ltd. India	Công ty Cổ phần Dược phẩm Codupha	Độ hòa tan	Công văn: số 15356/QLD-CL ngày 3/8/2018	Đình chỉ lưu hành và thu hồi trên toàn quốc

12	Viên nén bao phim Telgate 120 (Fexonadin hydroclorid 120 mg)	711019	13/11/2017	13/11/2020	VD-27498-17	Công ty TNHH Dược phẩm USA-NIC			Định lượng	Công văn: số 16028/QLD-CL ngày 15/8/2018	Đình chỉ lưu hành và thu hồi trên địa bàn tỉnh Yên Bái
13	Dung dịch thuốc tiêm Koreamin	160378	19/09/2016	18/09/2019	VN-14104-11	Yuyu INC., Korea	Công ty Cổ phần Dược phẩm Vĩnh Phúc		Định lượng	Công văn: số 16029/QLD-CL ngày 15/8/2018	Đình chỉ lưu hành và thu hồi trên địa bàn thành phố Hà Nội
14	Viên nén Cophamlox (Meloxicam 7,5mg)	360N7	26/10/2017	26/04/2020	VD-19756-13	Chi nhánh Công ty Cổ phần Armephaco - Xi ngiệp 150		Tính chất		Công văn: số 16521/QLD-CL ngày 23/8/2018	Đình chỉ lưu hành và thu hồi trên địa bàn tỉnh Cà Mau
15	Viên nén bao phim trong ruột Urazo 20 (Rabeprazole Sodium 20mg)	UTZ1707001	17/07/2017	16/07/2019	VN-20353-17	Acme Fortulation Pvt, Ltd. India	Công ty Cổ phần tập đoan Dược phẩm & Thương mại Sohaco	Độ hòa tan Định lượng		Công văn: số 16636/QLD-CL ngày 29/8/2018	Đình chỉ lưu hành và thu hồi trên địa bàn tỉnh Thái Bình
16	Dung dịch nhỏ mắt, nhỏ mũi, nhỏ tai Collydextra	170318	06/03/2018	06/03/2020	VD-26800-17	Công ty Cổ phần Dược phẩm Hà Nội		Định lượng		Công văn: số 16637/QLD-CL ngày 29/8/2018	Đình chỉ lưu hành và thu hồi trên địa bàn thành phố Hà Nội
17	Dung dịch thuốc tiêm Koreamin	160378	19/09/2016	18/09/2019	VN-14104-11	Yuyu INC., Korea	Công ty Cổ phần Dược phẩm Vĩnh Phúc	Định lượng		Công văn: số 17572/QLD-CL ngày 13/9/2018	Đình chỉ lưu hành và thu hồi toàn quốc
18	Viên nén bao phim Eurocapro (Ciprofloxacin 500mg)	07	02/11/16	01/11/19	VN-14998-12	Globe Pharmaceuticals Ltd. Bangladesh	Công ty Cổ phần Codupha	Độ hòa tan		Công văn: số 17573/QLD-CL ngày 13/9/2018	Đình chỉ lưu hành và thu hồi trên địa bàn tỉnh Vĩnh Phúc
19	Viên nén PASAPIL (Enalapril maleat 5mg)	14	04/2017	01/14/2020	VN-15829-12	S.C.Arena Group S.A, Romania	Công ty TNHH MTV Dược Sài Gòn (Sapharco)	Định lượng		Công văn: số 17930/QLD-CL ngày 20/9/2018	Đình chỉ lưu hành và thu hồi trên địa bàn tỉnh Quảng Ngãi
20	Viên nang mềm Bluetec (Cetirizin dưới dạng Cetirizin dihydroclorid 10mg)	021217		04/12/20	VD-22179-15	Công ty Cổ phần Dược phẩm Me Di Sun		Độ hòa tan		Công văn: số 18729/ QLD-CL ngày 02/10/2018	Đình chỉ lưu hành và thu hồi trên địa bàn tỉnh Hải Dương
21	Viên nén bao phim Dorabep (Piracetam 800mg)	712807		24.11.2020	VD-17141-12	Công ty Cổ phần sản xuất - thương mại Dược phẩm Đồng Nam		Độ hòa tan		Công văn: số 19157/ QLD-CL ngày 10/10/2018	Đình chỉ lưu hành và thu hồi trên địa bàn tỉnh Quảng Nam
22	Viên nang cứng Acetylcystein 200mg	010117		12/01/2020	VD-13874-11	Công ty Cổ phần Dược phẩm Tiphaco		Tính chất Định lượng		Công văn: số 19159/ QLD-CL ngày 10/10/2018	Đình chỉ lưu hành và thu hồi trên địa bàn tỉnh Quảng Nam

23	Bột pha hỗn dịch uống Batimin 125 (Cefdinir 125 mg)	0417	08/11/2017	08/11/2020	VD-25824-16	Công ty Cổ phần Dược phẩm và sinh học y tế		Tính chất Định lượng	Công văn: số 19362/ QLD-CL ngày 11/10/2018	Đình chỉ lưu hành và thu hồi toàn quốc
24	Thuốc bột pha tiêm Valacin 500	175018		17/10/2019	VN-18788-15	Laboratorio Reig Jofre, S.A (Spain)	Công ty Cổ phần Dược phẩm Trung ương CPC1 - Chi nhánh Tp. Hồ Chí Minh	Tính chất	Công văn: số 19528/ QLD-CL ngày 15/10/2018	Đình chỉ lưu hành và thu hồi trên địa bàn thành phố Hồ Chí Minh
25	Viên nén PASAPIL (Enalapril maleat 5mg)	14	04/2017	01/14/2020	VN-15829-12	S.C.Arena Group S.A, Romania	Công ty TNHH MTV dược Sài Gòn (Sapharco)	Định lượng	Công văn: số 19529/ QLD-CL ngày 15/10/2018	Đình chỉ lưu hành và thu hồi toàn quốc
26	Viên nén bao phim Peridom-M (Domperidone 10mg)	7D73	04/2017	03/2020	VN-16046-12	Medopharm (India)	Công ty Cổ phần Dược phẩm Tenamyd	Định lượng	Công văn: số 20592/ QLD-CL ngày 29/10/2018	Đình chỉ lưu hành và thu hồi trên địa bàn thành phố Hà Nội
27	Viên nén MOOV 7.5 (Meloxicam 7.5 mg)	FQ90L701		22/11/2020	VN-14514-12	Zim Laboratories Ltd. (India)	Công ty Cổ phần Xuất nhập khẩu Y tế Tp. Hồ Chí Minh	Độ cứng	Công văn: số 20606/ QLD-CL ngày 30/10/2018	Đình chỉ lưu hành và thu hồi trên địa bàn tỉnh Đồng Tháp
28	Viên bao đường Hilpoten (Mốc hoa trắng 500mg)	010318	29/03/2018	29/3/2021	VD-19547-13	Công ty Cổ phần Dược, Vật tư y tế Hải Dương		Định lượng	Công văn: số 21113/ QLD-CL ngày 06/11/2018	Đình chỉ lưu hành và thu hồi trên địa bàn thành phố Hà Nội
29	Viên nang Poriac (Omeprazole 20mg)	D70369	20/5/2017	19/05/2019	VN-15535-12	Medley Pharmaceuticals Ltd. (India)	Công ty Cổ phần Dược - thiết bị y tế Đà Nẵng	Tính chất	Công văn: số 21115/ QLD-CL ngày 06/11/2018	Đình chỉ lưu hành và thu hồi trên địa bàn tỉnh Gia Lai
30	Viên nang Arpizol (Omeprazole 20mg)	G43A6003	19/01/2016	18/01/2019	VN-13366-11	RPG Life Sciences Limited (India)	Công ty Cổ phần Xuất nhập khẩu Y tế Tp. Hồ Chí Minh	Tính chất	Công văn: số 21461/ QLD-CL ngày 12/11/2018	Đình chỉ lưu hành và thu hồi trên địa bàn thành phố Đà Nẵng
31	Kem bôi da Acyclovir (Acyclovir 50mg)	427706	30/03/2017	29/03/2020	VN-13200-11	Sinil Pharmaceutical Co. Ltd, Korea	Công ty TNHH Đại Bắc	Định lượng	Công văn: số 22144/ QLD-CL ngày 30/11/2018	Đình chỉ lưu hành và thu hồi trên địa bàn thành phố Hà Nội

Danh mục thuốc bị rút số đăng ký từ ngày 01/06/2018 đến ngày 30/11/2018

STT	Tên thuốc	Số đăng ký	Tên cơ sở sản xuất	Tên cơ sở đăng ký	Văn bản xử lý	Hình thức xử lý
1	Oplatin	GC-289-18	Công ty Cổ phần Dược phẩm Trung ương 1 - Pharbaco	Công ty TNHH Reliv pharma	Quyết định số 393/QĐ-QLD ngày 21/06/2018	Rút SDK tự nguyện
2	Rustatin	VD-27296-17	Công ty Cổ phần Korea United Pharm. Int'l	Công ty Cổ phần Korea United Pharm. Int'l	Như trên	Như trên
3	Medphatobra 40	VN-19866-16	Weimer Pharma GmbH	Công ty TNHH Dược phẩm Phương Đài	Như trên	Như trên

4	Copegus	VN-19153-15	Patheon Inc.		F. Hoffmann - La Roche Ltd	Như trên	Như trên
5	Bondronat	VN-17430-13	Productos Roche S.A de CV		Như trên	Như trên	Như trên
6	Loperamide GSK 2mg	VD-27653-17	Công ty Cổ phần Dược phẩm SaVi		Glaxosmithkline Pte. Ltd	Như trên	Như trên
7	Combitalin	VN-16809-13	Jin Yang Pharma Co., Ltd.		Kukje pharma Inc.	Như trên	Như trên
8	Aldromax	VN-17494-13	Như trên		Như trên	Như trên	Như trên
9	Bondaxil	VN-17942-13	Huteks Korea Pharmaceutical Co., Ltd.		Như trên	Như trên	Như trên
10	No-Lapin	VN-18718-15	Như trên		Như trên	Như trên	Như trên
11	Antirizin	VN-18344-14	Như trên		Như trên	Như trên	Như trên
12	Sarium	VN-18918-15	Như trên		Như trên	Như trên	Như trên
13	Osteum	VN-17493-13	Như trên		Như trên	Như trên	Như trên
14	Hutevir	VN-17082-13	Như trên		Như trên	Như trên	Như trên
15	Trebulos	VN-19490-15	Samik Pharmaceutical Co., Ltd.		Như trên	Như trên	Như trên
16	Yonetil	VN-18347-14	Yoo Young Pharmaceutical Co., Ltd.		Như trên	Như trên	Như trên
17	Sona-Tium	VN-18000-14	Samik Pharmaceutical Co., Ltd.		Như trên	Như trên	Như trên
18	Huloba Tab.	VN-17499-13	Như trên		Như trên	Như trên	Như trên
19	Senratin	VN-17731-14	Như trên		Như trên	Như trên	Như trên
20	Beecouracin	VN-18550-14	Như trên		Như trên	Như trên	Như trên
21	Beejedroxil	VN-17083-13	Như trên		Như trên	Như trên	Như trên
22	Beecefton Inj.	VN-18607-15	Như trên		Như trên	Như trên	Như trên
23	Acigmenfin 312,5	VD-21217-14	Công ty Cổ phần Dược Minh Hải		Công ty Cổ phần Dược Minh Hải	Quyết định số 395/QĐ-QLD ngày 21/06/2018	Rút SDK, thu hồi và đình chỉ lưu hành toàn quốc
24	Vesanoid	VN-19646-16	Catalent Germany Eberbach GmbH		F. Hoffmann - La Roche Ltd	Quyết định số 399/QĐ-QLD ngày 26/06/2018	Rút SDK tự nguyện
25	Cathy-K	VN-20681-17	Eirgen Pharma Limited		Công ty Cổ phần Fulink Việt nam	Như trên	Như trên
26	Pegasys	QLSP-958-16	F. Hoffmann - La Roche Ltd		F. Hoffmann - La Roche Ltd	Quyết định số 459/QĐ-QLD ngày 18/07/2018	Rút SDK tự nguyện

Danh mục thuốc giả từ ngày 01/06/2018 đến ngày 30/11/2018

STT	Tên thuốc	Số lô	Ngày sản xuất	Hạn dùng	Số đăng ký GP nhập khẩu	Tên cơ sở sản xuất và đơn vị nhập khẩu ghi trên nhãn	Vấn bản xử lý
1	Thuốc viên nang Agifamcin 300	00916		22/3/2019	VD-14223-11	Công ty Cổ phần Dược phẩm Agimexpharm	Công văn: số 13232/QLD-CL ngày 11/7/2018

MỤC LỤC

	Trang
● Nghiên cứu khoa học	
- Nghiên cứu định lượng nguyên liệu Sorafenib tosylat bằng phương pháp HPLC. <i>LÊ ĐÌNH KHÁNH, NGUYỄN THỊ HOA, TRẦN THỊ BÍCH VÂN</i>	1
- Định lượng Natri hyaluronat trong thuốc nhỏ mắt Eskar tears bằng phương pháp HPLC với detector DAD. <i>NGUYỄN MAI QUYÊN, BÙI VIỆT PHƯƠNG, NGUYỄN THỊ HỒNG VINH, TRẦN THÚY HẠNH, NGUYỄN THỊ KIỀU ANH</i>	5
- Định lượng đồng thời bốn thành phần: Paracetamol, Guaifenesin, Natri benzoat và Oxomemazin trong viên nang bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao. <i>LÊ THỊ HUẾ, NGUYỄN THỊ HỒNG YẾN, NGUYỄN HỒNG HẠNH, TRẦN THỊ HỒNG ANH</i>	9
- Nghiên cứu định lượng Cefpodoxim trong huyết tương người bằng phương pháp HPLC. <i>CAO NGỌC CƯỜNG, PHAN THỊ NGHĨA, TẠ MẠNH HÙNG</i>	17
- Tổng hợp và tinh chế 2- Amino-5-methylthiazol để làm tạp chuẩn Dược điển Việt Nam. <i>LÊ THỊ THU, VŨ HÀ KHUÊ, NGUYỄN THỊ HỒNG, NGUYỄN VĂN GIANG</i>	20
● Thông tin khoa học - Tin tức	
- Danh mục thuốc không đạt chất lượng đã được Bộ Y tế xử lý từ tháng 6/2018 đến tháng 11/2018. <i>HÀ THỊ MINH CHÂU</i>	27

CONTENTS

	Page
● Scientific researches	
- Study on determination of Sorafenib tosylate by HPLC method. <i>LÊ ĐÌNH KHÁNH, NGUYỄN THỊ HOA, TRẦN THỊ BÍCH VÂN</i>	1
- Assay of Sodium hyalunate in Eskar tears eye drops by HPLC method with DAD detector. <i>NGUYỄN MAI QUYÊN, BÙI VIỆT PHƯƠNG, NGUYỄN THỊ HỒNG VINH, TRẦN THÚY HẠNH, NGUYỄN THỊ KIỀU ANH</i>	5
- Simultaneous assay of four components: Paracetamol, Guaifenesin, Sodium benzoate and Oxomemazine in capsules by HPLC method. <i>LÊ THỊ HUẾ, NGUYỄN THỊ HỒNG YẾN, NGUYỄN HỒNG HẠNH, TRẦN THỊ HỒNG ANH</i>	9
- Study on determination of Cefpodoxime in human plasma by HPLC method. <i>CAO NGỌC CƯỜNG, PHAN THỊ NGHĨA, TẠ MẠNH HÙNG</i>	17
- Synthesis and purification of 2-Amino-5-methylthiazole as the Vietnamese Pharmacopoeia impurity reference substance. <i>LÊ THỊ THU, VŨ HÀ KHUÊ, NGUYỄN THỊ HỒNG, NGUYỄN VĂN GIANG</i>	20
● Technical information - News	
- Substandard pharmaceuticals recalled from June 2018 to December 2018 on decision of Ministry of Health. <i>HÀ THỊ MINH CHÂU</i>	27