

VIỆN KIỂM NGHIỆM THUỐC TRUNG ƯƠNG

ISSN 1859 - 0055

TẠP CHÍ

**KIỂM
NGHIỆM
thuốc**

JOURNAL OF DRUG QUALITY CONTROL

SỐ 4.2020

TẬP 18-SỐ 70

NATIONAL INSTITUTE OF DRUG QUALITY CONTROL

48 HAI BA TRUNG . HANOI - VIETNAM

TEL: 84.024.39363794 * FAX: 84.024.38256911 * E-MAIL: tapchiknt@yahoo.com.vn

XÂY DỰNG VÀ THẨM ĐỊNH QUY TRÌNH ĐỊNH LƯỢNG DICLOFENAC NATRI TRONG VIÊN ĐẠN BẰNG PHƯƠNG PHÁP HPLC

LÊ THỊ QUỲNH NGÀ, NGUYỄN THỊ HỒNG HẠNH, TRẦN THỊ HỒNG ANH

Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương

Từ khóa: Diclofenac natri, viên đạn, định lượng, HPLC.

1. Đặt vấn đề

Diclofenac natri là thuốc giảm đau, hạ sốt, chống viêm không steroid, đã được bào chế ở nhiều dạng như viên nén, viên nang... Dưới dạng bào chế viên đạn giúp giảm tác dụng phụ của thuốc trên dạ dày và tác dụng nhanh hơn so với đường uống, đồng thời tiện lợi hơn cho các bệnh nhân khó dùng theo đường uống. Tuy nhiên, trong các Dược điển Mỹ 42, Anh 2018 chưa có chuyên luận viên đạn diclofenac natri [4],[5]. Đồng thời tá dược bào chế viên đạn khác biệt so với viên nén và viên nang, và thường gây khó khăn cho việc chiết tách hoạt chất để kiểm nghiệm. Vì vậy, việc xây dựng tiêu chuẩn cho chế phẩm viên đạn diclofenac natri là cần thiết để đáp ứng nhu cầu kiểm soát chất lượng và góp phần nâng cao khả năng kiểm tra chất lượng thuốc. Trong phạm vi bài viết này chúng tôi xin trình bày việc xây dựng và thẩm định quy trình phân tích định tính, định lượng diclofenac natri trong viên đạn bằng phương pháp HPLC.

2. Thực nghiệm

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

2.1.1. Thiết bị, dụng cụ

Đã được hiệu chuẩn theo yêu cầu của ISO/IEC 17025.

- Máy sắc ký lỏng hiệu năng cao Shimadzu LC 20A với detector diod array;
- Cột phân tích: Phenomenex C8 (250 x 4,6 mm; 5 μ m);
- Cân phân tích: Mettler Toledo AG245 độ chính xác 0,01 mg;
- Máy lắc siêu âm;
- Máy ly tâm Eppendorf;
- Bộ lọc dùng cho sắc ký;
- Các dụng cụ thủy tinh: Bình định mức, pipet chính xác, ống đong,...

2.1.2. Hóa chất, chất chuẩn

- Natri dihydrophosphat monohydrat (Scharlau, loại PA);
- Methanol (Merck, loại HPLC);
- Acid phosphoric (Scharlau, loại PA);
- Cloroform (Merck, loại PA);
- Nước cất dùng cho HPLC.
- Chất chuẩn diclofenac natri của Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương; Lô: 0517047.04; Hàm lượng: 99,51% $C_{14}H_{10}Cl_2NNaO_2$ (nguyên trạng);
- Chất chuẩn diclofenac natri tạp A của Mỹ; Lô: L1M175; Hàm lượng: 0,99 mg/mg $C_{14}H_{10}Cl_2NNaO_2$ (nguyên trạng).

2.2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Đối tượng nghiên cứu

- Viên đạn DICLOVAT 50, lô sản xuất NC01, ngày sản xuất 01/03/2018 có công thức bào chế:

Diclofenac natri 50 mg, ovucire WL 3264 1600 mg và aerosil 5 mg/ 1viên.

- Mẫu placebo: Là mẫu được chuẩn bị như một lô mẫu thử nhưng không có thành phần diclofenac natri.

2.2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.2.1. Điều kiện sắc ký

Tham khảo các tài liệu [1],[4],[5], chúng tôi đã chọn điều kiện sắc ký như sau:

- Cột Phenomenex C8 (250 x 4,6 mm; 5 μ m) hoặc cột tương đương.
- Detector UV: 254 nm
- Thể tích tiêm mẫu: 20 μ l
- Tốc độ dòng: 1,0 ml/phút
- Pha động: Dung dịch đệm pH 2,5 – Methanol (34 : 66).
- Dung dịch đệm pH 2,5: Trộn đồng thể tích dung dịch acid phosphoric 0,01M và dung dịch natri

dihydrophosphat 0,01M, điều chỉnh đến pH 2,5 bằng acid phosphoric 0,01M.

2.2.2.2. Phương pháp xử lý mẫu

Viên đạn diclofenac natri trong công thức bào chế có thành phần tá dược ovucire WL 3264 là một triglycerid bán tổng hợp điều chế bằng phản ứng ester hóa giữa glycerin và acid béo có phân tử lượng lớn, tá dược này chảy lỏng ở nhiệt độ cơ thể để giải phóng hoạt chất. Do đó việc xử lý mẫu thử và mẫu placebo cần chọn mức nhiệt độ thích hợp để thành phần tá dược này chảy lỏng hoàn toàn (khoảng 40°C), nhờ vậy có thể giải phóng hoạt chất để có thể thực hiện các bước tiếp theo trong phân tích mẫu. Đối với mẫu chuẩn và mẫu đánh giá độ thích hợp của hệ thống, thực hiện các bước chuẩn bị mẫu bằng cách hòa tan và pha loãng trong pha động cụ thể như sau:

- *Dung dịch kiểm tra độ thích hợp của hệ thống:* Cân chính xác 5 mg diclofenac natri chuẩn và 5 mg diclofenac natri tạp A chuẩn vào bình định mức 50 ml, thêm pha động để hòa tan và pha loãng đến vừa đủ thể tích, trộn đều. Pha loãng 5,0 ml dung dịch thu được thành 100,0 ml bằng pha động, trộn đều. Lọc qua màng lọc 0,45 µm.

- *Dung dịch chuẩn:* Cân 0,0516 g chất chuẩn diclofenac natri vào bình định mức 100 ml, thêm 1 ml cloroform rồi lắc siêu âm 5 phút, thêm khoảng 70 ml pha động, lắc siêu âm 15 phút, để nguội về nhiệt độ phòng, thêm pha động vừa đủ đến vạch, trộn đều. Ly tâm dung dịch thu được ở 6000 vòng/phút, trong vòng 10 phút. Hút chính xác 5,0 ml dịch trong, pha loãng thành 50,0 ml bằng pha động, trộn đều. Lọc qua màng lọc 0,45 µm.

- *Dung dịch thử:* Cân 20 viên chế phẩm, xác định khối lượng trung bình viên, cắt nhỏ rồi đem đun cách thủy ở 40°C cho chảy hoàn toàn, khuấy đều. Cân 1,6474 g chế phẩm vào bình định mức 100 ml thêm 1 ml cloroform rồi lắc siêu âm 5 phút, thêm khoảng 70 ml pha động, lắc siêu âm 15 phút, để nguội về nhiệt độ phòng, thêm pha động vừa đủ đến vạch, trộn đều. Ly tâm dung dịch thu được ở tốc độ 6000 vòng/phút, trong vòng 10 phút. Hút chính xác 5,0 ml dịch trong, pha loãng thành 50,0 ml bằng pha động, trộn đều. Lọc qua màng lọc 0,45 µm.

- *Dung dịch mẫu placebo:* Cắt nhỏ viên placebo rồi đem đun cách thủy ở 40°C cho chảy hoàn toàn, khuấy đều. Cân 1,6012 g placebo chuyển vào bình định mức 100 ml thêm 1 ml cloroform rồi lắc siêu âm 5 phút, thêm khoảng 70 ml pha động, lắc siêu âm 15 phút, để nguội

về nhiệt độ phòng, thêm pha động vừa đủ đến vạch. Ly tâm dung dịch thu được ở 6000 vòng/phút, trong vòng 10 phút. Hút chính xác 5,0 ml dịch trong, pha loãng thành 50,0 ml bằng pha động, lắc đều. Lọc qua màng lọc 0,45 µm.

Tiêm lần lượt các dung dịch chuẩn, dung dịch kiểm tra độ thích hợp của hệ thống, dung dịch thử và dung dịch mẫu placebo. Xác định thứ tự rửa giải của các pic diclofenac natri và diclofenac natri tạp A.

Kiểm tra tính phù hợp của hệ thống sắc ký: Độ phân giải giữa pic diclofenac natri tạp A và diclofenac natri thu được từ sắc ký đồ của dung dịch kiểm tra độ thích hợp của hệ thống không được nhỏ hơn 6,5. Độ lệch chuẩn tương đối của diện tích pic diclofenac natri từ 6 lần tiêm lặp lại dung dịch chuẩn không được lớn hơn 2,0%.

2.2.2.3. Thẩm định phương pháp [2],[3],[5]

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

2.2.2.4. Đánh giá kết quả

- Định tính: Dựa vào hai tiêu chí:

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

+ Phổ UV-VIS: So sánh phổ UV-VIS tại thời gian lưu của pic trên sắc ký đồ thu được từ dung dịch thử và dung dịch chuẩn: 2 phổ phải tương ứng với nhau (đánh giá bằng hệ số trùng phổ match)

- Định lượng: Tính kết quả dựa vào diện tích pic thu được từ dung dịch thử với diện tích pic thu được từ dung dịch chuẩn và hàm lượng của chất chuẩn, độ pha loãng của các dung dịch.

3. Kết quả và bàn luận

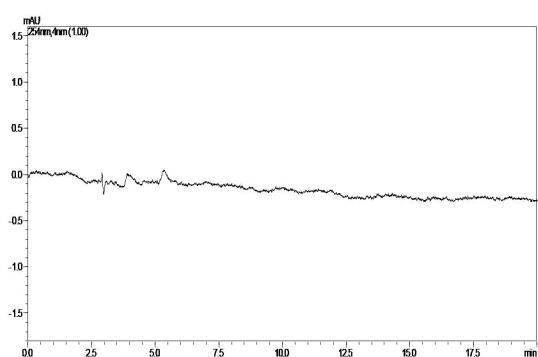
3.1. Khảo sát tính đặc hiệu

- Tiến hành sắc ký lần lượt các mẫu: Dung môi pha mẫu, dung dịch placebo, dung dịch chuẩn, dung dịch thử vào hệ thống sắc ký.

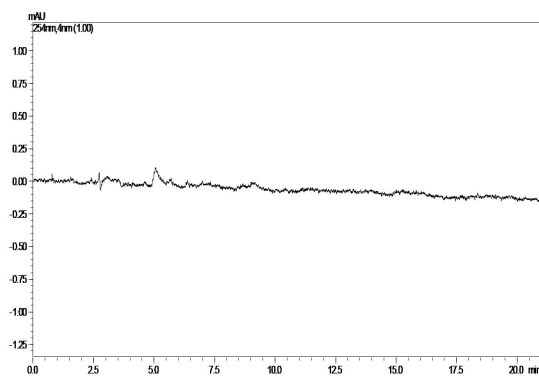
- Trên sắc ký đồ thu được, dung môi pha mẫu không cho đáp ứng pic, dung dịch placebo không xuất hiện pic nào ở thời gian lưu tương ứng với thời gian lưu của pic chính trên sắc ký đồ của dung dịch chuẩn.

- Dung dịch thử cho 1 pic chính có thời gian lưu khoảng 17,5 phút tương ứng với thời gian lưu của pic chính trên sắc ký đồ của dung dịch chuẩn.

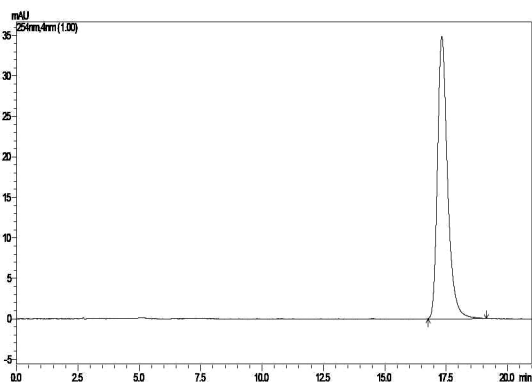
- Các pic diclofenac natri của dung dịch chuẩn và thử đều tinh khiết, hệ số tinh khiết của 2 pic đều là 1,000; hệ số trùng phổ UV-VIS của pic diclofenac natri trên sắc ký đồ thu được từ dung dịch chuẩn và dung dịch thử là 1,000. Kết quả được thể hiện ở Hình 1, Hình 2, Hình 3, Hình 4, Hình 5.



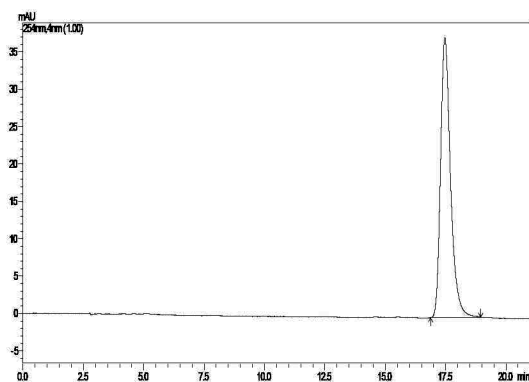
Hình 1. Sắc ký đồ của dung môi pha mẫu



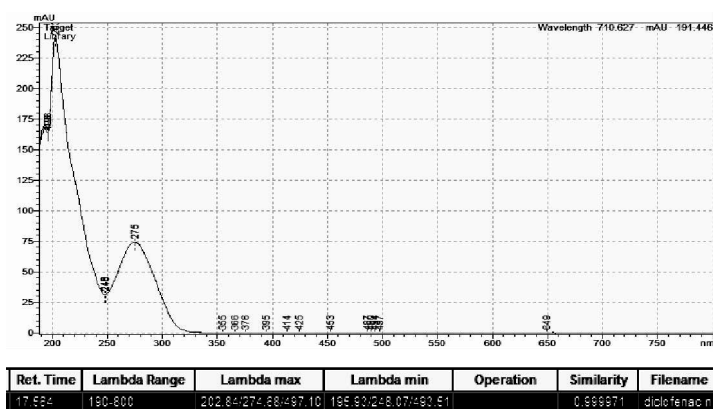
Hình 2. Sắc ký đồ của dung dịch placebo



Hình 3. Sắc ký đồ của dung dịch chuẩn



Hình 4. Sắc ký đồ của dung dịch thử



Hình 5. So sánh phổ UV-VIS pic diclofenac natri của dung dịch thử và chuẩn

Kết quả cho thấy phương pháp có độ đặc hiệu cao (hệ số trùng phổ là 1,000)

3.2. Tính thích hợp của hệ thống sắc ký

Tiến hành sắc ký dung dịch kiểm tra độ thích hợp của hệ thống, dung dịch chuẩn, ghi lại các sắc ký đồ, xác định giá trị thời gian lưu và diện tích của pic diclofenac natri.

Tiêm dung dịch kiểm tra độ thích hợp của hệ thống. Tiến hành sắc ký, ghi lại sắc ký đồ, xác định thời gian lưu, diện tích pic và độ phân giải của các pic. Kết quả thể hiện ở Bảng 1.

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

Stt	Thời gian lưu của pic diclofenac natri (phút)	Diện tích pic diclofenac natri (mAU.s)
1	17,557	1072152
2	17,529	1059157
3	17,519	1065474
4	17,468	1073067
5	17,434	1068498
6	17,529	1060574
Trung bình	17,506; n = 6; RSD = 0,26%	1066487; n = 6; RSD = 0,55%
Độ phân giải giữa pic diclofenac natri và tạp A = 14,74		

Hệ thống sắc ký và điều kiện phân tích HPLC có độ lặp lại cao, RSD của diện tích pic là 0,55% (< 2,0%); của thời gian lưu là 0,26% (< 1,0%). Độ phân giải giữa pic diclofenac natri và diclofenac natri tạp A là 14,74 (> 6,5). Như vậy, phương pháp HPLC trên là phù hợp với việc phân tích định tính, định lượng diclofenac natri.

3.3. Khảo sát khoảng tuyến tính

Khảo sát trên 5 dung dịch chuẩn có nồng độ diclofenac natri từ 25 – 75 µg/ml, lần lượt tương ứng với 50%, 75% 100%, 125% và 150% so với nồng độ định lượng. Kết quả được thể hiện trong Bảng 2, Hình 6.

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

Stt	% So với định lượng	Nồng độ diclofenac natri (mg/ml)	Diện tích pic (mAU.s)
1	50	0,0258	526759
2	75	0,0387	792045
3	100	0,0516	1051105
4	125	0,0645	1324865
5	150	0,0774	1580511
Phương trình hồi quy: $y = 20467627,9x + 1072,6$ Hệ số tương quan: $r = 1,000$			

Độ tuyến tính của Diclofenac natri

$y = 20467627,9x - 1072,6$
 $R^2 = 1,000$

Hình 6. Đồ thị biểu diễn mối tương quan tuyến tính giữa nồng độ diclofenac natri và diện tích pic

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 diclofenac natri và diện tích pic đáp ứng với hệ số tương quan $r = 1,000$.

3.4. Khảo sát độ đúng của phương pháp

- **Chuẩn bị mẫu chuẩn:** Dùng dung dịch chuẩn diclofenac natri ở phần thẩm định độ thích hợp của hệ thống.

- **Chuẩn bị 03 loại mẫu tự tạo:** Cân chính xác một lượng chuẩn diclofenac natri lần lượt là 40 mg, 50 mg, 60 mg (tương ứng với các mức nồng độ 80%, 100%, 120% so với lượng ghi trên nhãn) vào bình định mức 100 ml đã chứa sẵn 1 viên placebo, thêm 1 ml cloroform rồi lắc siêu âm 5 phút, thêm khoảng 70 ml pha động, lắc siêu âm 15 phút, để nguội về nhiệt độ phòng, thêm pha động vừa đủ đến vạch, lắc đều. Ly tâm dung dịch thu được ở 6000 vòng/phút, trong vòng 10 phút. Hút chính xác 5,0 ml dịch trong, pha loãng thành 50 ml bằng pha động. Lọc qua màng lọc 0,45 µm. Tại mỗi mức nồng độ, thực hiện 03 mẫu độc lập.

Phân tích mẫu theo qui trình phân tích (mỗi mẫu tiêm 01 lần), xác định hoạt chất thu hồi. Kết quả đánh giá độ đúng của phương pháp được thể hiện ở Bảng 3.

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

Stt	% So với nồng độ định lượng	Lượng placebo (viên)	Lượng chuẩn thêm vào mẫu (g)	Diện tích pic (mAU.s)	Lượng diclofenac natri tìm lại (g)	% Thu hồi	% Thu hồi trung bình
1	80	1	0,0406	845493	0,0407	100,76	100,24% RSD = 0,87%
2	80	1	0,0410	840979	0,0405	99,24	
3	80	1	0,0401	834854	0,0402	100,73	
4	100	1	0,0507	1054039	0,0507	100,59	100,12% RSD = 0,91%
5	100	1	0,0509	1042286	0,0502	99,07	
6	100	1	0,0508	1057342	0,0509	100,70	
7	120	1	0,0611	1259250	0,0606	99,72	100,79% RSD = 1,0%
8	120	1	0,0607	1276036	0,0614	101,71	
9	120	1	0,0612	1276887	0,0615	100,95	
% Thu hồi trung bình = 100,39%; RSD = 0,89%							

Từ kết quả thu được trong Bảng 3 cho thấy tỉ lệ thu hồi của diclofenac natri đạt từ 99,07% đến 101,71% nằm trong giới hạn từ 98,0% đến 102,0% và RSD nhỏ hơn 2,0%. Như vậy phương pháp có độ thu hồi tốt.

3.5. Khảo sát độ chính xác của phương pháp

3.5.1. Độ lặp lại

Độ lặp lại của phương pháp được đánh giá dựa trên độ lệch chuẩn tương đối của 6 mẫu thử được phân tích riêng biệt theo quy trình phân tích ở mục 2.2.2.1 và 2.2.2.2. Kết quả thể hiện ở Bảng 4.

3.5.2. Độ chính xác trung gian

Độ chính xác trung gian được đánh giá dựa trên độ lệch chuẩn tương đối của 12 mẫu thử được phân tích riêng biệt ở 2 ngày khác nhau và hai kiểm nghiệm viên khác nhau trên cùng một thiết bị. Kết quả thể hiện ở Bảng 4.

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

	Kiểm nghiệm viên 1			Kiểm nghiệm viên 2		
	Kết quả định lượng ngày: 04/04/2019 - Thiết bị: Máy HPLC Shimadzu LC - Lượng cân chuẩn: 51,6 mg - Diện tích pic trung bình chuẩn: 1066487 mAU.s - Khối lượng trung bình viên: 1,6753 g			Kết quả định lượng ngày: 05/04/2019 - Thiết bị: Máy HPLC Shimadzu LC - Lượng cân chuẩn: 50,9 mg - Diện tích pic trung bình chuẩn: 1044533 mAU.s - Khối lượng trung bình viên: 1,6681 g		
STT	Lượng cân (g)	Diện tích pic (mAU.s)	Kết quả định lượng (%)	Lượng cân (g)	Diện tích pic (mAU.s)	Kết quả định lượng (%)
1	1,6474	999735	97,90	1,6423	994181	97,93
2	1,6413	994236	97,72	1,6356	1006830	99,58
3	1,6312	996696	98,57	1,6379	1001966	98,96
4	1,6379	1002379	98,73	1,6312	1001766	99,35
5	1,6354	982127	96,88	1,6443	995183	97,91
6	1,6456	1004310	98,45	1,6323	1004159	99,52
Trung bình	98,04%; n = 6; RSD = 0,71%			98,88%; n = 6; RSD = 0,78%		
Kết quả định lượng trung bình 2 KNV= 98,46%; n = 12; RSD = 0,82%						

Với điều kiện sắc ký đã chọn, phương pháp có độ lặp lại và 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.

3.6. Khoảng xác định

Trong phần đánh giá độ đúng, độ tuyến tính suy ra khoảng xác định của diclofenac natri là từ 40 - 60 µg/ml.

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 diclofenac natri trong chế phẩm viên đạn. 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 áp dụng phương pháp định lượng đã nghiên cứu cho chế phẩm thuốc đạn Diclovat 50 và hy vọng có thể áp dụng phương pháp này đối với các viên đạn khác có chứa hoạt chất diclofenac natri.

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 (2014), *Tài liệu tập huấn chuyên gia thẩm định hồ sơ đăng ký thuốc phần tiêu chuẩn chất lượng*.
3. 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. The British Pharmacopoeia Commission (2018), *British Pharmacopoeia*, Volume III, pp. 472-473.
5. The U.S. Pharmacopoeial Convention (2019), *United states Pharmacopoeia* 42.

SUMMARY

An HPLC method for determination of Diclofenac sodium in Diclovat 50 suppository is introduced:

The chromatographic conditions are as follows:

- Column: Shimadzu Rp18 (250 x 4.6 mm; 5 µm)
- Mobile phase: Buffer solution pH 2.5 - Methanol (34 : 66)
- Detector UV: 254 nm
- Flow rate: 1.0 ml/min
- Injection volume: 20 µl

The method was validated about the specificity, system suitability, linear range, precision, accuracy and validation results proved that this method was suitable for determination of Diclofenac natri in suppository.

(Ngày nhận bài: 30/11/2019 ; Ngày phản biện: 20/02/2020 ; Ngày duyệt đăng: 17/06/2020)

XÂY DỰNG VÀ THẨM ĐỊNH QUY TRÌNH ĐỊNH TÍNH, ĐỊNH LƯỢNG NGUYÊN LIỆU DIOSGIN CHIẾT XUẤT, PHÂN LẬP TỪ CÂY BẢY LÁ MỘT HOA BẰNG KỸ THUẬT SẮC KÝ LỎNG HIỆU NĂNG CAO

THÁI NGUYỄN HÙNG THU

ĐỖ THỊ HÀ

CAO NGỌC ANH, LÊ QUANG THẢO

Trường Đại học Dược Hà Nội

Viện Dược liệu

Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương

Từ khóa: Định lượng, dioscin, sắc ký lỏng hiệu năng cao, Bảy lá một hoa.

1. Đặt vấn đề

Dioscin là Diosgenin-3-O- α -L-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)-[α -L-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)]- β -D-glucopyranosid (C₄₅H₇₂O₁₆). Dioscin có trong thành phần của cây Bảy lá một hoa (*Paris polyphylla*) [2],[8], một dược liệu được biết đến với các tác dụng dược lý như ức chế enzym tyrosinase và chống bệnh Leishmania [3], cầm máu trong bệnh

chảy máu bất thường ở tử cung, kháng khuẩn, ức chế tổn thương ở dạ dày... đặc biệt là tác dụng chống ung thư và ức chế sự phát triển của khối u [4],[9].

Phương pháp định lượng dioscin đã được đề cập đến trong một số bài báo, tuy nhiên hệ thống sắc ký lỏng siêu hiệu năng UHPLC và cột sắc ký được sử dụng (2,1 x 100 mm, 1,7 μ m) là loại hiện ít dùng trong các phòng kiểm nghiệm ở Việt Nam [5],[7]. Vì vậy nhóm tác giả đã nghiên cứu quy trình định lượng trên loại cột được sử dụng phổ biến là RP 18 (250 x 4,6 mm; 5 μ m).

2. Thực nghiệm

2.1. Thiết bị, hóa chất, chất chuẩn

2.1.1. Thiết bị, dụng cụ

Sử dụng các thiết bị phân tích của Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương đã được hiệu chuẩn, đáp ứng yêu cầu của ISO/IEC 17025 và GLP, bao gồm:

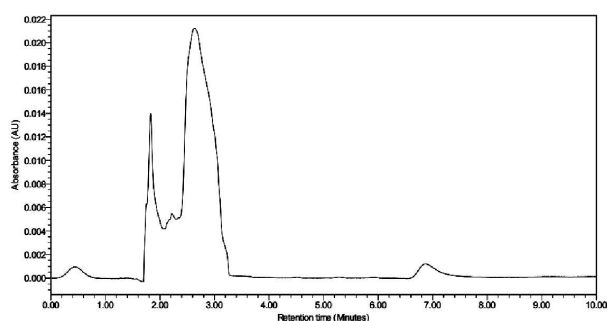
- Cân phân tích MS105 độ chính xác 0,01 mg (Mettler, Thụy Sĩ);
- Hệ thống máy sắc ký lỏng hiệu năng cao Water ARC;
- Cột Phenomenex Luna RP 18 (250 mm x 4,6 mm; 5 μ m);
- Các dụng cụ cần thiết khác trong quá trình thí nghiệm.

2.1.2. Hóa chất và dung môi

Dung môi tinh khiết HPLC: Acetonitril (Merck), methanol (Merck), nước cất hai lần.

2.1.3. Chất chuẩn

- Chất chuẩn dioscin được cung cấp bởi Chengdu Herbpurify Co., Ltd., Trung Quốc (SKS: S-048-180530; Hàm lượng: 98,03%; Độ ẩm: 1,45%);
- Chất chuẩn polyphyllin D được cung cấp bởi Chengdu Herbpurify Co., Ltd., Trung Quốc (SKS: C-036-181216; Hàm lượng: 98,72%; Độ ẩm: 1,64%).



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

2.2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Đối tượng nghiên cứu

Nguyên liệu dioscin được chiết xuất, phân lập và tinh chế từ thân rễ cây Bảy lá một hoa (*Paris polyphylla*), SKS: D.012020EC.

2.2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.2.1. Điều kiện sắc ký [1],[5],[7]

- Phương pháp phân tích: Kỹ thuật sắc ký lỏng pha đảo.
- Pha động: Acetonitril - nước (55:45)
- Cột C18: 250 x 4,6 mm; 5 μ m
- Nhiệt độ cột: 35°C
- Detector UV: 203 nm
- Tốc độ dòng: 1,0 ml/min
- Thể tích tiêm: 20 μ l

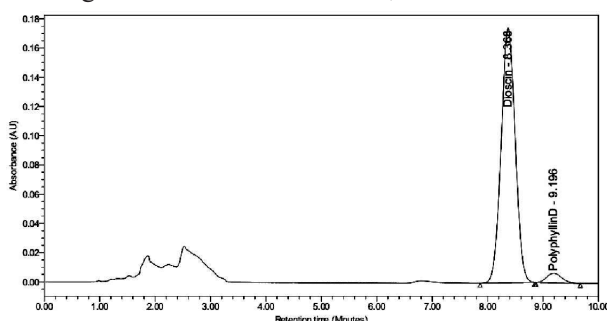
2.2.2.2. Phương pháp chuẩn bị mẫu [7]

- Dung môi pha mẫu: Methanol
- Dung dịch chuẩn: Cân và hòa tan chính xác một lượng chất chuẩn dioscin trong methanol để thu được dung dịch có nồng độ khoảng 0,5 mg/ml, trộn đều.
- Dung dịch thử: Cân và hòa tan chính xác một lượng mẫu thử dioscin trong methanol để thu được dung dịch có nồng độ khoảng 0,5 mg/ml, trộn đều.
- Dung dịch kiểm tra độ phân giải: Hòa tan một lượng chất chuẩn polyphyllin D trong dung dịch chuẩn để thu được dung dịch có nồng độ khoảng 0,5 mg dioscin/ml và 0,025 mg polyphyllin D/ml.

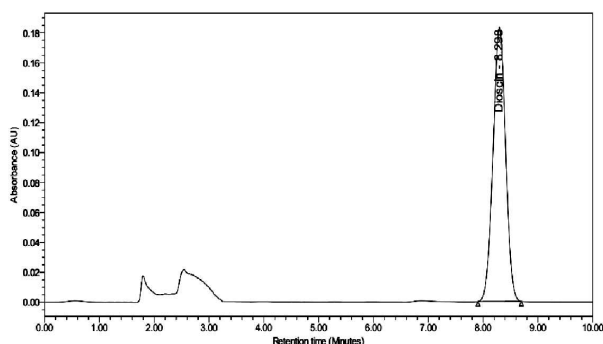
3. Kết quả và bàn luận

3.1. Lựa chọn điều kiện sắc ký

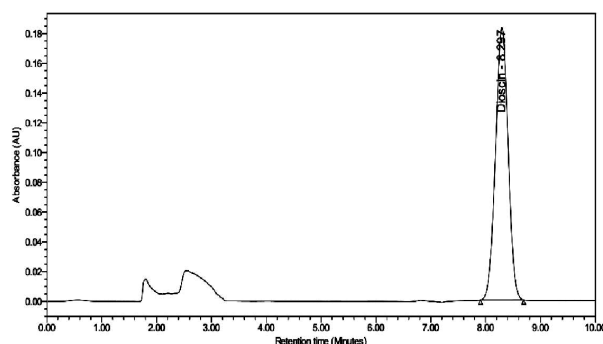
Sau khi khảo sát một số điều kiện như: thay đổi cột, tốc độ dòng, pha động, tỷ lệ pha động, chúng tôi đã lựa chọn được điều kiện sắc ký như đã nêu ở mục 2.2.2.1. Sắc ký đồ thu được từ dung dịch phân giải, dung dịch chuẩn và dung dịch thử thể hiện ở Hình 2, Hình 3 và Hình 4.



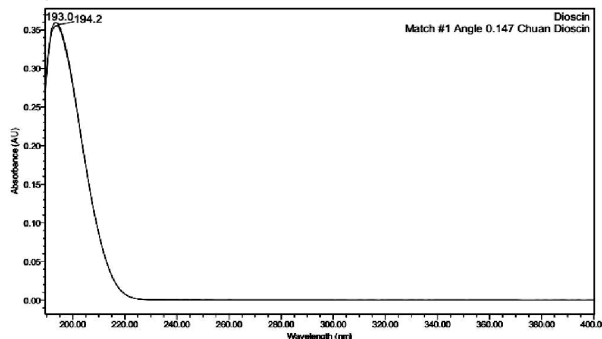
Hình 2. Sắc ký đồ dung dịch phân giải



Hình 3. Sắc ký đồ dung dịch chuẩn



Hình 4. Sắc ký đồ dung dịch thử



Hình 5. Chồng phổ UV của pic chính trên sắc ký đồ của dung dịch chuẩn và dung dịch thử.

Kết quả cho thấy pic dioscin có thời gian lưu khoảng 8,3 phút, pic nhọn, cân đối (Hình 3, Hình 4); pic polyphyllin D được tách ra hoàn toàn khỏi pic dioscin (Hình 2); Phổ UV của pic chính trên sắc ký đồ thu được từ dung dịch thử trùng với pic chính trên sắc ký đồ thu được từ dung dịch chuẩn (Hình 5).

3.2. Thẩm định phương pháp phân tích [6]

3.2.1. Độ đặc hiệu

- **Dung dịch chuẩn:** Cân 5,03 mg chất chuẩn dioscin vào bình định mức 10 ml. Hòa tan và pha loãng với methanol vừa đủ đến vạch, trộn đều.

- **Dung dịch thử:** Cân 5,02 mg mẫu thử dioscin vào bình định mức 10 ml. Hòa tan và pha loãng với methanol vừa đủ đến vạch, trộn đều.

- **Dung dịch kiểm tra độ phân giải:** Cân 5,05 mg polyphyllin D chuẩn vào bình định mức 20 ml, hòa tan và pha loãng với methanol vừa đủ đến vạch, lắc đều. Hút 0,5 ml dung dịch này vào bình định mức 5 ml, thêm dung dịch chuẩn vừa đủ, lắc đều.

Tiêm vào hệ thống sắc ký lần lượt mẫu trắng (methanol), dung dịch kiểm tra độ phân giải, 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 dioscin trên sắc ký đồ của dung dịch chuẩn (khoảng 8,3 phút - Hình 3, Hình 4).

- Phổ UV của pic chính trên sắc ký đồ của dung dịch thử phù hợp với phổ UV của pic dioscin trên sắc ký đồ của dung dịch chuẩn (Hình 5).

- Trên sắc ký đồ của dung dịch kiểm tra độ phân giải, pic polyphyllin D tách ra hoàn toàn khỏi pic dioscin (Hình 2).

- Trên sắc ký đồ của mẫu trắng (dung môi pha mẫu) không xuất hiện pic có thời gian lưu tương ứng với thời gian lưu của pic dioscin (Hình 1).

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

3.2.2. Độ thích hợp của hệ thống sắc ký

- **Dung dịch chuẩn:** Sử dụng dung dịch chuẩn ở phần độ đặc hiệu.

- **Dung dịch kiểm tra độ phân giải:** Sử dụng dung dịch kiểm tra độ phân giải ở phần độ đặc hiệu.

- **Tiêm dung dịch chuẩn lặp lại 6 lần và dung dịch kiểm tra độ phân giải, ghi lại các sắc ký đồ và xác định giá trị thời gian lưu, diện tích pic dioscin, độ phân giải (R_s), hệ số bất đối xứng (T). Kết quả được thể hiện ở Bảng 1.**

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

STT	Yêu cầu	Thời gian lưu (phút)	Diện tích pic (mAU.s)
1		8,295	2922004
2		8,295	2923136
3		8,296	2923258
4		8,296	2923067
5		8,298	2922726
6		8,298	2922429
Trung bình		8,296	2922770
RSD (%)	≤ 2,0	0,02	0,02
Số đĩa lý thuyết (N)	≥ 3000	5973	
Hệ số bất đối xứng (T)	$0,8 \leq T \leq 1,5$	1,0	
Độ phân giải (R_s)	$R_s \geq 1,5$	2,1	

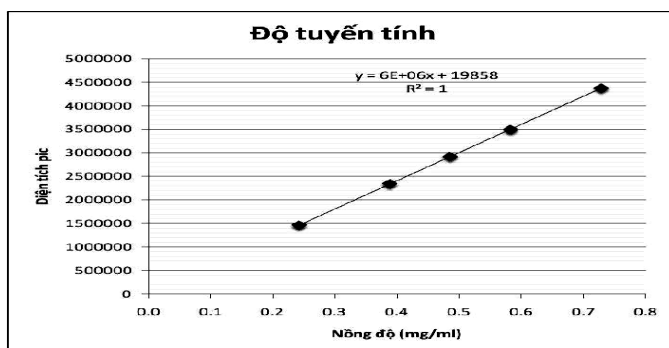
Kết quả khảo sát cho thấy giá trị RSD của thời gian lưu và diện tích pic đều bằng $0,02\% < 2,0\%$, số đĩa lý thuyết $N = 5973 > 3000$, hệ số bất đối xứng $T = 1,0$, độ phân giải $R_s = 2,1 > 1,5$. Vậy hệ thống sắc ký phù hợp để định tính, định lượng nguyên liệu dioscin.

3.2.3. Độ tuyến tính

Khảo sát trên dãy 05 dung dịch chuẩn dioscin trong dung môi pha mẫu với 05 mức nồng độ từ 50%, 80%, 100%, 120% và 150% so với nồng độ định lượng. Cách chuẩn bị các dung dịch chuẩn và kết quả được thể hiện trong Bảng 2 và Hình 6.

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

STT	% So với nồng độ định lượng	Nồng độ dung dịch chuẩn gốc (mg/ml)	Pha loãng (ml)	Nồng độ dung dịch chuẩn (mg/ml)	Diện tích pic dioscin (mAU.s)
1	50%	0,9862 mg/ml	2,5 → 10,0	0,2430	1467747
2	80%		2,0 → 5,0	0,3888	2345702
3	100%		2,5 → 5,0	0,4859	2921752
4	120%		3,0 → 5,0	0,5831	3494314
5	150%		7,5 → 10,0	0,7289	4373065
Phương trình hồi qui: $y = 5969155 x + 19858,41$; Hệ số tương quan: $r = 1,0000$ Hệ số chắn (intercept): $b = 19858,41$; % Y = 0,68% (< 2,0%)					



Hình 6. Đồ thị biểu diễn mối tương quan giữa nồng độ và diện tích pic dioscin

Kết quả cho thấy với điều kiện sắc ký đã lựa chọn, trong khoảng nồng độ đã khảo sát (từ 0,24 mg/ml đến 0,73 mg/ml) có sự tương quan tuyến tính chặt chẽ giữa nồng độ dioscin và diện tích pic đáp ứng với hệ số tương quan $r = 1,0000$.

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 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		
	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 (%)
	Thiết bị: HPLC Waters ARC Ngày phân tích: 23/8/2020 Khối lượng cân mẫu chuẩn: 5,03 mg Diện tích pic TB mẫu chuẩn: 2922770 mAU.s			Thiết bị: HPLC Waters ARC Ngày phân tích: 24/8/2020 Khối lượng cân mẫu chuẩn: 5,05 mg Diện tích pic TB mẫu chuẩn: 2252301 mAU.s		
1	4,97	2905852	97,21	5,03	2265887	97,58
2	4,95	2922458	98,16	5,01	2253933	97,45
3	4,93	2904653	97,96	4,98	2240477	97,45
4	5,02	2939888	97,37	5,01	2252455	97,39
5	4,97	2923081	97,79	4,95	2239325	97,99
6	4,93	2940697	99,17	5,01	2266021	97,97
Trung bình = 97,94%; n = 6; RSD = 0,72%				Trung bình = 97,64%; n = 6; RSD = 0,28%		
Kết quả định lượng trung bình = 97,79%; n = 12; RSD = 0,54%						

Từ Bảng 3 cho thấy độ lệch chuẩn tương đối (RSD) kết quả định lượng của mỗi kiểm nghiệm viên lần lượt là 0,72% và 0,28% đều nhỏ hơn 2,0%, của cả hai kiểm nghiệm viên là 0,54% < 2,0%. Vậy phương pháp đạt yêu cầu về độ chính xác (bao gồm độ lặp lại trong ngày và khác ngày).

3.2.5. Độ đúng của phương pháp

Dùng phương pháp thêm chuẩn vào nền mẫu (dung môi pha mẫu).

- Dung dịch chuẩn: Sử dụng dung dịch chuẩn ở mục 3.2.1. Độ đặc hiệu.

- Chuẩn bị các dung dịch chuẩn tự tạo: Cân chính xác khoảng 20 mg dioscin chuẩn vào bình định mức 20 ml,

hòa tan và pha loãng với methanol vừa đủ đến vạch, lắc đều. Hút chính xác 2,0 ml, 2,5 ml và 3,0 ml dung dịch này (tương ứng với 80, 100% và 120% so với nồng độ định lượng) vào các bình định mức 5 ml, thêm methanol vừa đủ đến vạch, lắc đều, lọc qua màng lọc 0,45 μ m. Chuẩn bị 03 mẫu độc lập cho mỗi mức nồng độ.

Khối lượng cân mẫu chuẩn: 5,03 mg; Diện tích pic trung bình mẫu chuẩn: 2922770 mAU.s.

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

Kết quả khảo sát cho thấy tỷ lệ thu hồi ở 3 mức nồng độ từ 98,29% đến 100,29 %; RSD của tỷ lệ thu hồi từ 0,68% đến 0,73% (< 2,0%). Phương pháp phân tích đạt yêu cầu về độ đúng.

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

STT	Dung dịch khảo sát	Lượng chuẩn cân (mg)	Nồng độ dung dịch chuẩn (mg/ml)	Thể tích dung dịch chuẩn thêm vào (ml)	Lượng tương ứng với $C_{45}H_{72}O_{16}$ thêm vào (mg)	Diện tích pic Dioscin (mAU.s)	Lượng $C_{45}H_{72}O_{16}$ tìm lại (mg)	Tỷ lệ thu hồi (%)
1	80%	20,28	0,980	2,0	1,959	2345239	1,950	99,51
2	80%	20,40	0,985	2,0	1,971	2345673	1,950	98,94
3	80%	20,12	0,972	2,0	1,944	2344955	1,949	100,29
	Trung bình (%)							99,58
	RSD (%)							0,68
4	100%	20,28	0,980	2,5	2,449	2920073	2,427	99,12
5	100%	20,40	0,985	2,5	2,464	2918727	2,426	98,49
6	100%	20,12	0,972	2,5	2,430	2921026	2,428	99,94
	Trung bình (%)							99,18
	RSD (%)							0,73
7	120%	20,28	0,980	3,0	2,939	3496359	2,907	98,90
8	120%	20,40	0,985	3,0	2,956	3495435	2,906	98,29
9	120%	20,12	0,972	3,0	2,916	3495953	2,906	99,68
	Trung bình (%)							98,96
	RSD (%)							0,70

4. Kết luận

Nhóm nghiên cứu đã xây dựng được quy trình định lượng nguyên liệu dioscin bằng kỹ thuật sắc ký lỏng hiệu năng cao trên cột pha đảo với pha động là hỗn hợp của acetonitril - nước (55:45). Phương pháp sử dụng cột RP 18 (250 x 4,6 mm; 5 μ m), nhiệt độ cột duy trì ở 35°C; Tốc độ dòng 1,0 ml/phút; Thể tích tiêm 20 μ l; Detector 203 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 để định tính, định lượng nguyên liệu dioscin.

Tài liệu tham khảo

- Bộ Y tế (2017), *Dược điển Việt Nam V*, Nhà xuất bản Y học, Phụ lục 5.3, trang PL-147.
- Chen C. X., Zhou J. (1981), "Studies on the saponin components of plants in Yunnan V. Steroid glycosides and β -ecdysone of *Paris polyphylla* Sm. var. *yunnanensis* (FR.) HM.", *Acta Botanica Yunnanica*, 1, p. 011.
- Devkota K. P., Khan M. T. H., Ranjit R., Meli L. A., Samreen, Iqbal C. M. (2007), "Tyrosinase inhibitory and antileishmanial constituents from the rhizomes of *Paris polyphylla*", *Natural Product Research*, 21, pp. 321-327.
- Zheng W., Yan C. M., Zhang Y. B., Li Z. H., Z. Q. Li, Li X. Y., Wang Z. W., Wang X. L., Chen W. Q., Yu X. H. (2015), "Antiparasitic efficacy of dioscin and zingiberenis saponin from *Costus speciosus* (Koen ex. Retz) Sm. against *Ichthyophthirius multifiliis*", *Parasitology*, 142(3), pp. 473-479.
- Guangyi Yang, Wei Lu, Meng Pan, Chenning Zhang, Yuan Zhou, Pei Hu, Ming Hu, Gao Song (2017), An LC-MS/MS method for simultaneous determination of nine steroidal saponins from *Paris polyphylla* var. in rat plasma and its application to pharmacokinetic study, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 145, pp. 675-681.
- ICH (2005), "Validation of analytical procedures: Text and methodology Q2(R1)", *ICH Harmonized Tripartite guidelines*, 1-13.

7. Pei Chen, Hong-yu Jin, Lei Sun, Shuang-cheng Ma (2016), Multi-component determination and chemometric analysis of *Paris polyphylla* by ultra high performance liquid chromatography with photodiode array detection, *Journal of Separation Science*, 39, pp. 3550-3557.
8. Wang Y., Gao W. Y., Yuan L. C., Liu X. Q., Wang S. J., Chen C. (2007), "Chemical constituents from rhizome of *Paris polyphylla* var. *yunnanensis*", *Chinese Traditional and Herbal Drugs*, 38, p. 17.
9. Wang Y., Zhang Y. J., Gao W. Y., Yan L. L. (2007), "Anti-tumor constituents from *Paris polyphylla* var. *yunnanensis*", *China Journal of Chinese Materia Medica*, 32(14), pp. 1425-1428.

SUMMARY

A simple HPLC method using UV-Vis detector was developed for assay of Dioscin in isolated products from *Paris polyphylla*. The chromatographic separation was done in a Phenomenex Luna C18 250 x 4.6 mm, 5 μ m column using mixture of Acetonitrile - Water (55:45) as mobile phase. Flow rate of mobile phase was maintained at 1.0 ml per minute, detection set at 203 nm, injection volume was 20 μ l. The method was fully validated and proved as suitable for intended use.

(Ngày nhận bài: 05/10/2020 ; Ngày phản biện: 24/11/2020 ; Ngày duyệt đăng: 16/12/2020)

NGHIÊN CỨU ĐỊNH LƯỢNG VILDAGLIPTIN TRONG HUYẾT TƯƠNG NGƯỜI BẰNG PHƯƠNG PHÁP LC-MS/MS

PHAN THỊ NGHĨA, TRẦN THỊ NGÀ, LÊ THỊ LA, PHẠM THANH HUYỀN,
HOÀNG VĂN ĐỨC, TẠ MẠNH HÙNG

Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương

Từ khóa: Vildagliptin, tương đương sinh học, huyết tương, định lượng, LC-MS/MS.

1. Đặt vấn đề

Vildagliptin (VDG) một chất thuộc nhóm thuốc tăng cường chức năng tiểu đảo tụy, là chất ức chế dipeptidyl-peptidase-4(DPP-4) mạnh và chọn lọc nên cải thiện được sự kiểm soát đường huyết. Vildagliptin được chỉ định phối hợp với các thuốc chống đái tháo đường khác [5]. Ở mức liều khuyến nghị sử dụng 50 mg, nồng độ tối đa trong huyết tương người khoảng 300 ng/ml [2]. Hiện nay, một số doanh nghiệp được đã và đang nghiên cứu sản xuất các chế phẩm chứa vildagliptin nên nhu cầu nghiên cứu tương đương sinh học là điều cần thiết và xuất phát từ thực tế. 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], đồng thời dựa trên nguyên lý của phương pháp sắc ký lỏng - khối phổ, chúng tôi đã tiến hành nghiên cứu định lượng vildagliptin trong huyết tương người bằng phương pháp LC-MS/MS.

2. Thực nghiệm

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

2.1.1. Thiết bị, dụng cụ

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

- Máy sắc ký lỏng khối phổ AB Sciex QTRAP 6500+ (Sciex – Mỹ);

- Cân phân tích Mettler Toledo (Thụy Sĩ, độ chính xác d = 0,1 mg);

- Tủ lạnh sâu -70 °C $\pm$ 5 °C (Panasonic – Nhật Bản);

- Máy ly tâm lạnh (Sigma 4-16K – Đức);

- Máy lọc nước;

- Bình định mức, pipet loại A, ống ly tâm,...

2.1.2. Hóa chất, chất chuẩn

- Chất chuẩn vildagliptin của TRC, Canada;
SKS: 1-MLM-173-1; hàm lượng: 99,19% (nguyên trạng);

- Chất chuẩn carbamazepin: Chuẩn làm việc của Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương SKS: WS.0115318.01; hàm lượng 99,78% (nguyên trạng); được dùng làm chuẩn nội trong phương pháp phân tích.

- Dung môi, hóa chất: Acetonitril, methanol, amoni bicarbonat, amoni hydroxyd đạt tiêu chuẩn tinh khiết dùng cho phân tích hoặc sắc ký.

- Huyết tương trắng: Không có VDG của Bệnh viện Trung ương Quân đội 108.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Điều kiện sắc ký

- Cột Hypersil Gold C8: 50 x 2,1 mm; 1,9 μ m. Bảo vệ cột: C18, 4 x 3 mm;

- Pha động: Acetonitril - amoni bicarbonat 1 mM tỷ lệ 85 : 15 (v/v);

- Tốc độ dòng: 0,4 ml/phút

- Detector: MS/MS, QTrap 6500+

- Thể tích tiêm mẫu: 1 μ l

- Nhiệt độ autosampler (buồng tiêm mẫu): Nhiệt độ phòng

2.2.2. Điều kiện khối phổ

Kiểu khối phổ hai lần (MS/MS), nguồn ion hóa ESI (+). Các thông số của thiết bị khối phổ để phát hiện VDG và chất chuẩn nội (IS) được trình bày ở Bảng 1.

Bảng 1. Các thông số của detector khối phổ dùng để định lượng VDG và carbamazepin

<i>Thông số</i>	<i>Hoạt chất</i>	<i>Vildagliptin</i>	<i>Carbamazepin (IS)</i>
Chế độ ion hóa		ESI (+)	ESI (+)
Điện thế ion hóa (V)		5000	5000
Khí phun sương (psi)		35	35
Khí tăng cường (psi)		65	65
Nhiệt độ hóa hơi (°C)		65	65
Năng lượng thế chọn lọc ion (V)		500	500
Khí thổi (psi)		100	100
Năng lượng phân mảnh (V)		21	27
Điện thế đầu ra bộ phận phân mảnh (V)		20	20
Mảnh mẹ (m/z, Dalton)		304	237
Mảnh con (m/z, Dalton)		154	194

2.2.3. Phương pháp xử lý mẫu

- Dung dịch chuẩn nội: Cân chính xác khoảng 25 mg chất chuẩn carbamazepin, hòa tan trong methanol thu được dung dịch chuẩn nội gốc có nồng độ carbamazepin khoảng 500 μ g/ml. Từ dung dịch chuẩn nội gốc, tiến hành pha loãng trong methanol - nước (1:1) để thu được dung dịch chuẩn nội làm việc có nồng độ carbamazepin khoảng 2,5 μ g/ml.

* Chuẩn bị các dung dịch chuẩn tự tạo trong dung môi:

- Dung dịch chuẩn gốc để pha đường chuẩn (CCA): Cân chính xác lượng chất chuẩn vildagliptin, hòa tan trong methanol để thu được dung dịch chuẩn gốc có nồng độ vildagliptin khoảng 240 μ g/ml.

- Dung dịch chuẩn gốc để pha mẫu kiểm tra (QCA): Cân chính xác lượng chất chuẩn vildagliptin, hòa tan trong methanol để thu được dung dịch chuẩn gốc có nồng độ vildagliptin khoảng 240 μ g/ml.

- Dung dịch chuẩn gốc làm việc (CCB, QCB): Từ dung dịch chuẩn gốc CCA, QCA, tiến hành pha loãng trong methanol - nước (1:1) để thu được dung dịch chuẩn làm việc CCB, QCB có nồng độ vildagliptin khoảng 24 μ g/ml.

* Cách chuẩn bị đường chuẩn và mẫu LLOQ trong huyết tương

- Từ dung dịch CCB, pha dung dịch chuẩn làm việc trong huyết tương WSS-CC1 và WSS-CC2 có nồng độ VDG tương ứng khoảng 600 ng/ml và 30 ng/ml.

- Mỗi đường chuẩn bao gồm: 01 mẫu huyết tương trắng (blank), 01 mẫu huyết tương trắng có pha IS (zero) và 08 mẫu huyết tương có pha chuẩn VDG và IS.

- Tóm tắt nồng độ và cách chuẩn bị các mẫu của đường chuẩn (CC) và mẫu giới hạn định lượng dưới (LLOQ) trong huyết tương được trình bày ở Bảng 2 và Bảng 3.

Bảng 2. Cách chuẩn bị đường chuẩn trong huyết tương

Mẫu	Blank	Zero	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8
Nồng độ (ng/ml)			3	6	15	30	60	180	420	600
V _{huyết tương trắng} (μl)	250	250	225	200	125	0	225	175	75	0
V _{WSS-CC1} (μl)	-	-	-	-	-	-	25	75	175	250
V _{WSS-CC2} (μl)	-	-	25	50	125	250	-	-	-	-

Bảng 3. Cách chuẩn bị mẫu LLOQ trong huyết tương

Mẫu	Nồng độ (ng/ml)	V _{huyết tương trắng} (μl)	V _{WSS-CC2} (μl)
LLOQ	3	225	25

* Cách chuẩn bị các mẫu kiểm tra trong huyết tương

- Từ dung dịch QCB, pha dung dịch chuẩn làm việc trong huyết tương (WSS-QC1 và WSS-QC2) có nồng độ VDG tương ứng khoảng 600 ng/ml và 30 ng/ml.

- Tóm tắt nồng độ và cách chuẩn bị các mẫu kiểm tra (QC) trong huyết tương được trình bày ở Bảng 4.

Bảng 4. Cách chuẩn bị mẫu QC trong huyết tương

Mẫu	Nồng độ (ng/ml) (ng/ml)	V _{WSS-QC1} (μl)	V _{WSS-QC2} (μl)	V _{huyết tương trắng} (μl)
LQC	9	-	75	175
MQC	240	100	-	150
HQC	480	200	-	50

- Xử lý mẫu huyết tương: Thêm 25 μl dung dịch chuẩn nội vào 0,25 ml mẫu huyết tương (HT) đã rẽ đông ở nhiệt độ phòng, thêm 1 ml dung dịch acetonitril. Lắc xoáy 10 giây. Ly tâm 6500 vòng/phút trong 5 phút. Lấy lớp dịch trong. Tiêm sắc ký.

2.2.4. Phương pháp tính kết quả

Xác định nồng độ VDG có trong các mẫu thử (chưa biết nồng độ) dựa vào tỷ lệ diện tích pic VDG/IS thu được từ sắc ký đồ của mẫu thử và đường chuẩn biểu thị mối tương quan giữa nồng độ VDG có trong các mẫu chuẩn với tỷ lệ diện tích pic VDG/IS của mẫu chuẩn. Tiến hành thẩm định phương pháp phân tích theo quy định của EMA và US-FDA [1],[6].

3. Kết quả và bàn luận

3.1. Độ đặc hiệu - chọn lọc của phương pháp

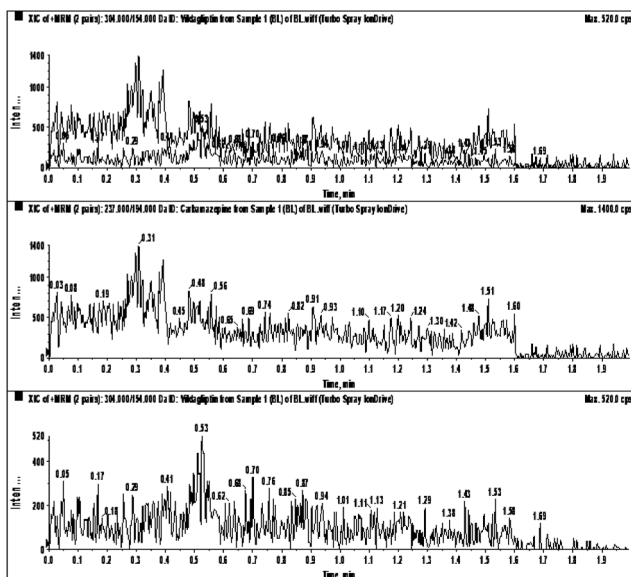
Phân tích các mẫu HT trắng, mẫu HT tự tạo chứa chuẩn nội và VDG nồng độ khoảng 3 ng/ml theo phương

pháp đã xây dựng và ghi lại sắc ký đồ (Hình 1, 2).

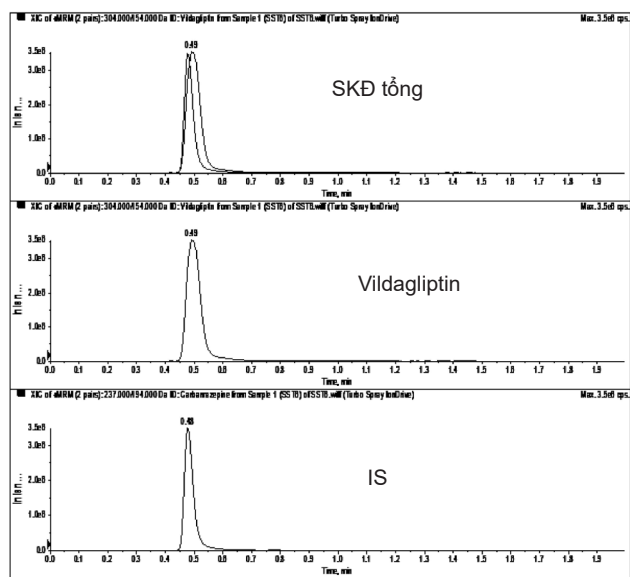
Trên SKĐ của mẫu HT trắng (Hình 1), tại thời điểm 0,49 phút và 0,48 phút trùng với thời gian lưu của VDG và IS trong mẫu chuẩn (Hình 2) không xuất hiện các pic có mảnh phổ khối m/z = 304 → 154 (đặc trưng cho VDG) và mảnh phổ khối m/z = 237 → 194 (đặc trưng cho IS). Do vậy, phương pháp phân tích có độ đặc hiệu - chọn lọc với VDG và IS theo các quy định của phương pháp phân tích thuốc trong dịch sinh học [1],[6].

3.2. Đường chuẩn và khoảng tuyến tính

Phân tích các mẫu HT chứa chuẩn nội và chuẩn VDG có nồng độ khoảng 3 ng/ml đến 600 ng/ml theo quy trình đã xây dựng. Xác định sự tương quan giữa nồng độ VDG có trong mẫu và tỉ lệ diện tích pic VDG/IS thu được trên SKĐ bằng phương pháp hồi qui tuyến tính, sử dụng hệ số tỷ trọng 1/(nồng độ)².



Hình 1. SKĐ huyết tương trắng



Hình 2. SKĐ huyết tương trắng có IS và VDG nồng độ 3 ng/ml

Kết quả xác định mối tương quan này được trình bày ở Bảng 5.

Bảng 5. Kết quả thẩm định khoảng tuyến tính của phương pháp

Mẫu chuẩn Nồng độ (ng/ml)	Độ đúng (%)				
	Đường chuẩn 1	Đường chuẩn 2	Đường chuẩn 3	Đường chuẩn 4	Đường chuẩn 5
3,00	102,0	99,3	98,4	99,7	101,7
6,01	97,0	101,9	102,1	101,0	96,9
15,01	97,9	98,4	103,7	97,2	99,3
30,03	101,2	98,6	98,2	100,4	102,1
60,06	95,3	104,1	99,6	107,2	94,8
180,18	103,3	99,3	100,9	99,9	103,2
420,42	101,5	99,1	100,4	95,4	99,6
600,60	101,9	99,3	96,7	99,1	102,4
Phương trình hồi quy ($y = ax + b$) [*]	$y = 0,0056 x - 0,0049$	$y = 0,0059 x - 0,0045$	$y = 0,0061 x - 0,0047$	$y = 0,0062 x - 0,0054$	$y = 0,0059 x - 0,0049$
Hệ số tương quan r	0,9995	0,9997	0,9997	0,9992	0,9994

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

Kết quả thẩm định cho thấy trong khoảng nồng độ từ 3 ng/ml đến 600 ng/ml có sự tương quan tuyến tính giữa nồng độ VDG và tỷ lệ diện tích pic VDG/IS với hệ số tương quan xấp xỉ bằng 1.

Nồng độ VDG xác định từ đường chuẩn so với nồng độ lý thuyết đều nằm trong giới hạn cho phép (từ 80 -120% đối với nồng độ thấp nhất, từ 85 - 115% đối với các nồng độ còn lại) theo quy định của phương pháp phân tích thuốc trong dịch sinh học [1],[6].

3.3. Giới hạn định lượng dưới của phương pháp

Phân tích các mẫu zero (mẫu HT chứa chuẩn nội) và mẫu HT chứa chuẩn nội và chuẩn VDG có nồng độ chính xác khoảng 3 ng/ml (mẫu LLOQ) trên 3 lô mẫu.

Xác định nồng độ VDG 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 6.

Bảng 6. Kết quả xác định giá trị LLOQ của phương pháp

Mẫu chuẩn (3 ng/ml)	Ngày 1	Ngày 2	Ngày 3
Diện tích mẫu zero (n = 1)	15694	7220	0
Diện tích trung bình mẫu LLOQ (n = 6)	139644	118311	125566
Tỷ lệ LLOQ/zero	8,9	16,4	-
Độ đúng (%) n = 6	103,7	108,2	105,8
CV (%) n = 6	1,7	13,6	1,8
Độ đúng (%) n = 18	105,9		
CV (%) n = 18	7,9		

Kết quả thẩm định cho thấy, tại thời điểm trùng với thời gian lưu của VDG, đáp ứng pic trung bình của mẫu LLOQ gấp hơn 5 lần đáp ứng pic của mẫu zero. Tỷ lệ giữa nồng độ VDG trung bình xác định từ đường chuẩn so với nồng độ lý thuyết có trong các mẫu LLOQ nằm trong khoảng từ 80% - 120% và CV nhỏ hơn 20%, đáp ứng yêu cầu giới hạn định lượng dưới của phương pháp phân tích thuốc trong dịch sinh học [1],[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 VDG có nồng độ tương ứng là 3 ng/ml; 9 ng/ml; 240 ng/ml và 480 ng/ml. Xác định hàm lượng VDG có trong các mẫu bằng đường chuẩn phân tích trong cùng điều kiện. Độ đúng của phương pháp là tỷ lệ % giữa nồng độ xác định được so với nồng độ lý thuyết. Độ lặp lại của phương pháp được biểu thị bằng giá trị CV%. Kết quả xác định độ đúng, độ lặp lại của phương pháp được trình bày ở Bảng 7.

Bảng 7. Kết quả thẩm định độ đúng, độ lặp lại trong ngày và khác ngày

Độ đúng, độ lặp lại	LLOQ (≈ 3 ng/ml)		LQC (≈ 9 ng/ml)		MQC (≈ 240 ng/ml)		HQC (≈ 480 ng/ml)	
	Độ đúng (%)	CV (%)	Độ đúng (%)	CV (%)	Độ đúng (%)	CV (%)	Độ đúng (%)	CV (%)
Trong ngày	103,7	1,7	106,4	4,3	107,7	3,2	107,2	2,5
Khác ngày	105,7	6,2	98,5	4,9	103,1	3,7	105,1	2,9

Kết quả thẩm định cho thấy ở các nồng độ thấp, trung bình và cao, phương pháp có độ đúng trong ngày và khác ngày xấp xỉ 100%; độ lặp lại trong ngày và khác ngày với giá trị CV nhỏ hơn 15%.

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

Tiến hành nghiên cứu độ ổn định của VDG trong HT trên các lô mẫu LQC và HQC. Đánh giá độ ổn định của VDG trong HT bằng cách so sánh nồng độ VDG có trong các mẫu được bảo quản so với nồng độ lý thuyết. Kết quả nghiên cứu độ ổn định của VDG được trình bày trong Bảng 8.

Bảng 8. Kết quả nghiên cứu độ ổn định của VDG trong huyết tương

Độ ổn định	Mẫu	Nồng độ lý thuyết (ng/ml)	Nồng độ sau bảo quản (ng/ml; n = 6)	% Sai khác
6 chu kì đông - rã	LQC	8,96	8,71	-2,8
	HQC	477,70	460,60	-3,6
Độ ổn định thời gian ngắn (5 giờ, nhiệt độ phòng)	LQC	8,96	7,99	10,8
	HQC	477,70	467,50	-2,1
Độ ổn định trong autosampler (75 giờ/nhiệt độ phòng)	LQC	8,96	9,26	-3,3
	HQC	477,70	469,29	-1,8
Độ ổn định dài ngày (-70 °C ± -5 °C, 77 ngày)	LQC	8,96	7,88	12,1
	HQC	477,70	480,65	0,6

Kết quả nghiên cứu độ ổn định cho thấy, các mẫu độ ổn định sai khác so với nồng độ lý thuyết đều nhỏ hơn 15%, đáp ứng yêu cầu độ ổn định của hoạt chất trong huyết tương của phương pháp phân tích thuốc trong dịch sinh học [1],[6].

4. Kết luận

Nghiên cứu đã xây dựng được phương pháp định lượng vildagliptin trong huyết tương người bằng kỹ thuật LC-MS/MS. Kết quả thẩm định cho thấy, phương pháp có giá trị giới hạn định lượng dưới nhỏ (3 ng/ml); khoảng tuyến tính rộng (từ 3 ng/ml đến 600 ng/ml); độ đúng dao động trong khoảng từ 98,5% - 107,7%; độ lặp lại với giá trị CV% nhỏ (1,7% - 6,2%), thời gian phân tích ngắn (2 phút cho mỗi mẫu), đáp ứng yêu cầu đối với phương pháp phân tích thuốc trong dịch sinh học của US-FDA và EMA [1],[6]. 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 vildagliptin.

Tài liệu tham khảo

1. European Medicines Agency, Committee for Medicinal Products for Human Use (2012): *Guideline on Bioanalytical Method Validation*.
2. Medicines and Healthcare products Regulatory Agency, *Public Assessment Report UKPAR Vildagliptin 50 mg tablets*, PL 39352/0395, Pages 1-14.
3. Ramzia I. El Bagary, Hassan M.E. Azzazy, Ehab F. El Kady, Faten Farouk (2016), "Simultaneous Determination of Metformin, Vildagliptin and 3-Amino-1- adamantanol in human plasma: Application to pharmacokinetic studies", *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*
4. Roberto Pontarolo, Ana Carolina Gimenez, Thais Martins Guimarães de Francisco, Rômulo Pereira Ribeiro, Flávia Lada Degaut Pontes, João Cleverson (2014), "Simultaneous determination of Metformin and Vildagliptin in human plasma by a HILIC-MS/MS method", *Journal of Chromatography B-Volume 965*, Pages 133-141.
5. Thông tin sản phẩm *Galvus® 50 mg*, Novartis Farmaceutica S.A.
6. U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration (2018): *Guidance for Industry - Bioanalytical Method Validation*.

SUMMARY

A high throughput and specific method using Ultra Performance Liquid Chromatography tandem Mass Spectrometry was developed for determination of Vildagliptin in human plasma. The Vildagliptin and internal standard were separated from human plasma by liquid - liquid extraction technique. Analytes were chromatographed on a C8 column (50 x 2.1 mm; 1.9 µm) with isocratic elution using a tandem quadrupole mass detector (QTRAP 6500+ – AB Sciex). The mobile phase consists of Acetonitrile and Ammonium bicarbonate 1 mM solution with suitable ratio. The assay was linear over the concentration range of 3 - 600 ng/ml. The LLOQ was 3 ng/ml. The intra-day and inter-day accuracy were within 98.5% - 107.7%; This method can be used for BE studies of Vildagliptin preparations.

(Ngày nhận bài: 28/04/2020 ; Ngày phản biện: 28/10/2020 ; Ngày duyệt đăng: 16/12/2020)

TỔNG HỢP VÀ TÍNH CHẾ TẠP CHẤT A CỦA DICLOFENAC ĐẠT CHẤT LƯỢNG LÀM NGUYÊN LIỆU THIẾT LẬP TẠP CHUẨN

NGUYỄN VĂN GIANG

Trường Đại học Dược Hà Nội

LÊ THỊ THU, NGUYỄN THỊ QUỲNH GIANG,
PHẠM VĂN QUANG, LÊ THỊ MỸ HOA, ĐOÀN CAO SƠN

Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương

Từ khóa: Diclofenac, tạp A của diclofenac, tổng hợp - tính chế, chất chuẩn.

1. Đặt vấn đề

Diclofenac - một dẫn chất của acid phenylacetic – là thuốc thuộc nhóm chống viêm không steroid và được dùng chủ yếu dưới dạng muối natri, kali hoặc diethylamin. Thuốc có tác dụng chống viêm, giảm đau, hạ sốt nhanh và thường được chỉ định điều trị triệu chứng lâu dài các loại viêm khớp mạn tính (như viêm đa khớp dạng thấp, viêm cột sống dính khớp, viêm khớp vẩy nến, một số thoái hóa khớp gây đau và tàn tật), điều trị triệu chứng ngăn ngừa các đợt viêm cạnh khớp, viêm khớp do gút, đau lưng, đau rễ thần kinh. Diclofenac còn được dùng để điều trị đau sau phẫu thuật, đau do chấn thương, đau bụng kinh [2]. Trên thị trường Việt Nam hiện nay đang lưu hành nhiều sản phẩm chứa diclofenac với các dạng bào chế khác nhau như viên bao tan trong ruột, thuốc tiêm, viên đạn, thuốc nhỏ mắt, gel xoa bóp [2]... do các công ty trong nước và nước ngoài sản xuất.

Theo các Dược điển hiện hành [1],[7],[8],[9], để kiểm soát chất lượng dược chất và thành phẩm chứa diclofenac cần sử dụng tạp chất A, có tên khoa học là 1-(2,6-diclorophenyl)-1,3-dihydro-2H-indol-2-on, là sản phẩm trung gian trong quá trình tổng hợp nguyên liệu đồng thời là sản phẩm phân hủy của diclofenac. Diclofenac tạp A ở dạng bột kết tinh, màu trắng hoặc hơi vàng, nhiệt độ nóng chảy khoảng 125 °C - 130 °C, không tan trong nước, hơi tan trong cloroform, ethanol, methanol, tan trong toluen. Hiện tại, nguồn cung cấp chính chất chuẩn tạp này cho các phòng kiểm nghiệm trong nước là các Hội đồng Dược điển nước ngoài như Hội đồng Dược điển Mỹ, Hội đồng Dược điển Châu Âu, Hội đồng Dược điển Anh hay một số hãng hóa chất lớn như Merck, Sigma-Aldrich,... với giá thành rất cao. Diclofenac for system suitability EPCRS (chứa diclofenac tạp A) 1 mg: 79 EUR; diclofenac impurity A BPCRS 25 mg: 97£; diclofenac related compound A USPRS 25 mg: 730 USD; diclofenac related compound A Merck 25 mg: 2051 SGD. Nguyên liệu 1-(2,6-diclorophenyl)-1,3-dihydro-2H-indol-2-on tinh

kiết đạt yêu cầu sử dụng cho thiết lập chuẩn của hãng TRC - Canada cũng có giá tới 450 USD/ 1 g, chưa kể thuế nhập khẩu và phí vận chuyển. Từ thực tế đó, chúng tôi đã tiến hành nghiên cứu tổng hợp tính chế tạp A của diclofenac đạt độ tinh khiết cao để thiết lập chuẩn tạp, nhằm tạo ra nguồn tạp chuẩn có sẵn trong nước với chi phí thấp, đáp ứng nhu cầu sử dụng trong kiểm tra nguyên liệu và các dạng bào chế của diclofenac tại Việt Nam.

2. Thực nghiệm

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

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-Shimadzu 20A;

- Máy chuẩn độ nước Coulometer Metrohm 756 KF;

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

- Cột C8 Luna, 250 x 4,6 mm, 5 µm của hãng Phenomenex;

- 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) Viện Công nghệ dược phẩm quốc gia với chế độ đo ESI.

- Máy đo phổ cộng hưởng từ hạt nhân ¹H-NMR và ¹³C-NMR: Bruker AV500 khoa Hóa học – Trường Đại học Quốc gia Hà Nội.

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

- Lò vi sóng Sharp R-205VN(S) - 20L – 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 hoá học – Bộ môn Công nghiệp Dược – Trường Đại học Dược Hà Nội.

2.1.2. Dung môi, hóa chất, chất chuẩn

- Chuẩn tạp Diclofenac related compound A (1-(2,6-diclorophenyl)-1,3-dihydro-2H-indol-2-on) USPRS: Số lô K0I100, hàm lượng 100,0% tính theo nguyên trạng.

- Diclofenac natri hàm lượng 99,59% - Trung Quốc, dạng dược dụng.

- Dicloromethan – Merck, đạt tinh khiết phân tích.

- Acid hydrochloric – Prolabo, đạt tinh khiết phân tích.

- Kali hydroxyd – Merck, đạt tinh khiết phân tích.

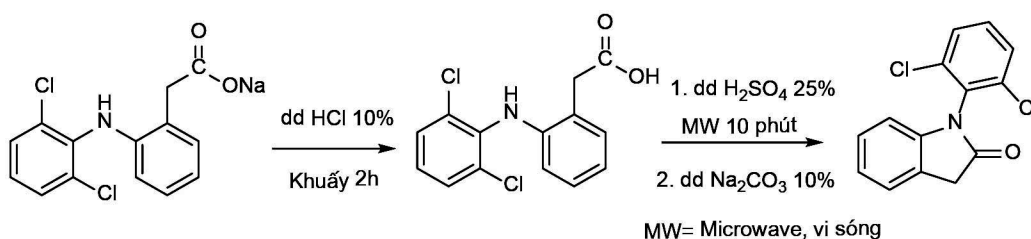
- Ethanol tuyệt đối – Prolabo, đạt tinh khiết phân tích.

- 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

- Diclofenac natri.



Hình 1. Sơ đồ tổng hợp 1-(2,6-diclorophenyl)-1,3-dihydro-2H-indol-2-on bằng phương pháp sử dụng năng lượng vi sóng

2.2.2.2. Phương pháp 2 [5]: Không dùng vi sóng

Bước 1: Tổng hợp acid diclofenac

Acid diclofenac trong phương pháp này được tổng hợp như phương pháp 1.

Bước 2: Tổng hợp 1-(2,6-diclorophenyl)-1,3-dihydro-2H-indol-2-on

Hòa tan 0,33 g (1,1 mmol) acid diclofenac và 1-ethyl-3-[3-dimethylaminopropyl]carbodiimid hydroclorid (EDC, 226 mg, 1,2 mmol) trong 20 ml dicloromethan và khuấy trong 30 phút ở nhiệt độ phòng. Sau đó khi phản ứng kết thúc, hỗn hợp phản ứng được pha loãng

2.2.2. Tổng hợp 1-(2,6-diclorophenyl)-1,3-dihydro-2H-indol-2-on.

Qua các phương pháp đã được công bố [5],[6], 1-(2,6-diclorophenyl)-1,3-dihydro-2H-indol-2-on (tạp A của Diclofenac) được tổng hợp từ diclofenac natri chủ yếu bằng hai phương pháp sau:

2.2.2.1. Phương pháp 1 [6]: Phương pháp sử dụng hỗ trợ của năng lượng vi sóng, qua hai bước:

Bước 1: Tổng hợp acid diclofenac

Cho 5,0 g diclofenac natri vào bình cầu có dung tích 250 ml, thêm 50 ml acid hydrochloric 10%. Hỗn hợp được khuấy trong 2 giờ, sau đó trung hòa bằng dung dịch Na_2CO_3 loãng về pH 3, xuất hiện tủa. Lọc tủa, rửa tủa bằng nước cất thu được chất rắn màu trắng là acid diclofenac.

Bước 2: Tổng hợp 1-(2,6-diclorophenyl)-1,3-dihydro-2H-indol-2-on

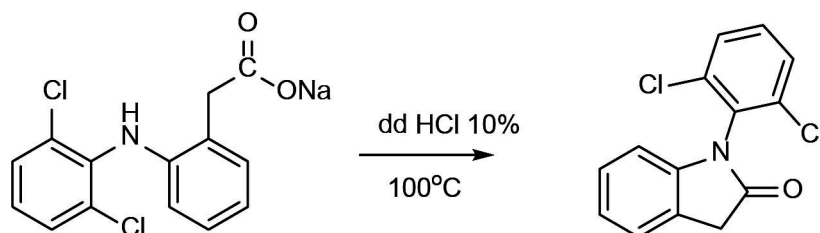
Cho 3,0 g acid diclofenac vào bình nón dung tích 250 ml, thêm tiếp 50 ml acid sulfuric 25%. Đặt hỗn hợp phản ứng vào lò vi sóng trong 10 phút. Để nguội hỗn hợp phản ứng về nhiệt độ phòng sau đó trung hòa bằng dung dịch Na_2CO_3 10% đến pH 8. Chiết dung dịch thu được với cloroform (4 x 10 ml). Tập trung các dịch chiết cloroform, rửa bằng nước cất và làm khan bằng Na_2SO_4 khan, cất loại dung môi ở áp suất giảm thu được sản phẩm 1-(2,6-diclorophenyl)-1,3-dihydro-2H-indol-2-on.

với dicloromethan (50 ml). Dịch thu được rửa bằng dung dịch NaHCO_3 bão hòa (3 x 20 ml) sau đó bằng nước cất (3 x 20 ml) thu pha hữu cơ. Làm khan pha hữu cơ bằng Na_2SO_4 khan sau đó cất loại dung môi hữu cơ thu được 1-(2,6-diclorophenyl)-1,3-dihydro-2H-indol-2-on có màu đỏ.

Chúng tôi đã thực hiện cả 2 phương pháp trên để so sánh kết quả và nhận thấy:

Phương pháp 1: Hiệu suất tổng hợp 1-(2,6-diclorophenyl)-1,3-dihydro-2H-indol-2-on rất thấp (khoảng 6%) và sản phẩm có nhiệt độ nóng chảy khoảng 110,8 - 114,0 °C.

Phương pháp 2: Hiệu suất tổng hợp 1-(2,6-diclorophenyl)-1,3-dihydro-2*H*-indol-2-on đạt khoảng 91%. Tuy nhiên phương pháp này có nhược điểm là sản phẩm tạo ra có màu đỏ trong khi tạp chuẩn nhập từ nước ngoài có màu trắng và EDC là nguyên liệu khá đắt tiền nên chi phí để tổng hợp tạp chuẩn sẽ cao.



Hình 2. Sơ đồ phản ứng tổng hợp 1-(2,6-diclorophenyl)-1,3-dihydro-2*H*-indol-2-on

Trong môi trường acid mạnh, diclofenac natri sẽ chuyển thành acid diclofenac, sau đó trong môi trường acid hydrocloric và nhiệt độ, phân tử acid diclofenac đóng vòng nội phân tử tạo sản phẩm. Tuy nhiên, acid diclofenac và 1-(2,6-diclorophenyl)-1,3-dihydro-2*H*-indol-2-on sau khi tạo thành đều không tan trong nước và tạo thành kết tủa khiến phản ứng xảy ra khó khăn. Vì vậy cần tối ưu hóa quá trình tổng hợp để đạt hiệu suất cao.

2.2.3. Tinh chế và thử độ tinh khiết sơ bộ

Quá trình tinh chế sản phẩm được thực hiện bằng quá trình kết tinh phân đoạn, có sử dụng than hoạt tính để hấp phụ tạp màu. Sản phẩm sau khi tẩy màu bằng than hoạt tiếp tục được loại tạp màu bằng dung dịch natri metabisulfit 0,2%. Thử sơ bộ tiến trình phản ứng bằng sắc ký lớp mỏng và độ tinh khiết bằng 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 (NMR) được đo trong dung môi DMSO- d_6 với chất chuẩn nội tetramethylsilan (TMS); sau đó được định tính so sánh với chuẩn gốc USP bằng đo phổ hấp thụ tử ngoại và phổ hồng ngoại (nén viên KBr).

2.2.5. Kiểm tra chất lượng sản phẩm 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

Để khắc phục các nhược điểm trên, chúng tôi đã nghiên cứu cải tiến phương pháp tổng hợp 1-(2,6-diclorophenyl)-1,3-dihydro-2*H*-indol-2-on để đạt hiệu suất cao, dễ thực hiện từ các nguyên liệu có giá thành rẻ hơn. Phương pháp tổng hợp được tiến hành theo sơ đồ như sau:

phương pháp phân tích được xây dựng và thẩm định dựa theo Dược điển Mỹ - USP 40. Chất chuẩn diclofenac related compound A (1-(2,6-diclorophenyl)-1,3-dihydro-2*H*-indol-2-on) 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.
- Tạp chất liên quan: Phương pháp HPLC.
- Định lượng: Phương pháp HPLC.

3. Kết quả và bàn luận

3.1. Kết quả

3.1.1. Quy trình tổng hợp 1-(2,6-diclorophenyl)-1,3-dihydro-2*H*-indol-2-on

Cho 100 ml HCl 10% vào bình cầu 2 cổ dung tích 1000 ml, đun cách dầu đến khi dầu đạt nhiệt độ 110 - 115 °C. Hòa tan 10,0 g diclofenac natri vào trong 400 ml nước, sau đó nhỏ từ từ vào bình phản ứng. Sau khi nhỏ xong, tiếp tục đun khô phản ứng trong 6 giờ (sử dụng sắc ký lớp mỏng để theo dõi tiến trình phản ứng). Sau khi kết thúc phản ứng, làm nguội khối phản ứng về nhiệt độ phòng, thêm 100 ml dicloromethan, khuấy trộn trong 5 phút. Pha dicloromethan được tách ra bằng bình gạn, rửa bằng dung dịch KOH 1M (2 x 100 ml), sau đó rửa bằng nước cất (2 x 100 ml). Dịch dicloromethan được làm khan bằng 5 g Na₂SO₄ khan, sau đó cất loại dung môi, sấy ở 60 °C trong 30 phút thu được 7,87 g 1-(2,6-diclorophenyl)-1,3-dihydro-2*H*-indol-2-on thô, tinh thể màu trắng ngà, hiệu suất 90,0%, t_{nc} 125,8 - 128,0 °C (tài liệu [6] 126 - 127 °C).

3.1.2. Quá trình tinh chế

Hòa tan 5,0 g sản phẩm tổng hợp trong 30 ml ethanol tuyệt đối ở 75 °C. Thêm 0,3 g than hoạt, đun cách thủy có khuấy trộn trong 30 phút để tẩy màu. Lọc nóng bằng phễu lọc Buchner, sau đó làm lạnh dịch lọc xuống 0 °C trong 2 giờ. Lọc, rửa bằng ethanol lạnh thu được tủa. Tủa

thu được tẩy màu bằng dung dịch natri metabisulfite như sau: hòa tan tủa thu được trong 50 ml ethanol tuyệt đối, nhỏ từ từ vào 50 ml dung dịch natri metabisulfite 0,2% có khuấy trộn trong 30 phút. Lọc lấy tủa, rửa tủa bằng nước cất thu được sản phẩm 1-(2,6-diclorophenyl)-1,3-dihydro-2H-indol-2-on tinh khiết có màu trắng.

Bảng 1. Nhiệt độ nóng chảy và hiệu suất quá trình tinh chế

STT	Nhiệt độ nóng chảy (°C)		Hiệu suất tinh chế (%)
	Trước tinh chế	Sau tinh chế	
1	125,8 - 128,0	126,3 - 127,7	92,5
2	125,8 - 128,0	126,3 - 127,7	91,4
3	125,8 - 128,0	126,3 - 127,7	92,2
Trung bình		126,3 - 127,7	92,0

Kết quả thử tinh khiết sơ bộ của 1-(2,6-diclorophenyl)-1,3-dihydro-2H-indol-2-on tổng hợp và tinh chế được:

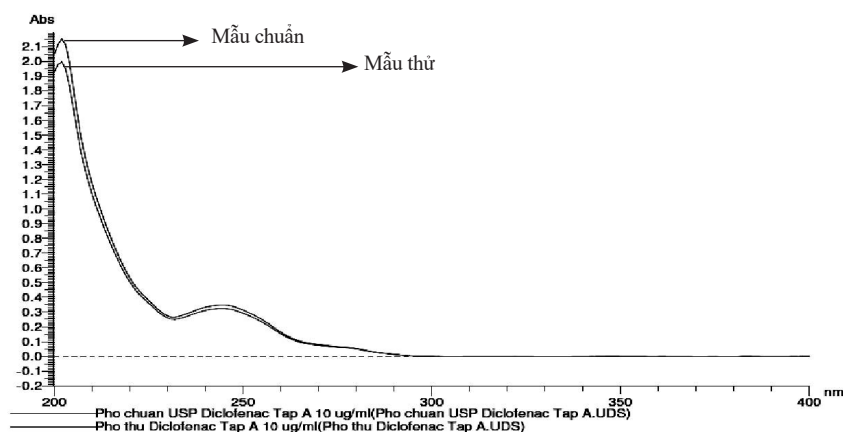
- Cảm quan: màu trắng
- T_{nc} : 126,3 - 127,7 °C

- Sắc ký lớp mỏng: Tiến hành với 2 hệ dung môi (dicloromethan – methanol = 9 : 1) và dicloromethan cho thấy sản phẩm có một vết chính duy nhất có R_f lần lượt là 0,83 và 0,7. Tiến hành chấm chồng vết của 1-(2,6-diclorophenyl)-1,3-dihydro-2H-indol-2-on và diclofenac acid với hệ dung môi (dicloromethan – methanol = 9 : 1) cho thấy 2 vết tách nhau khá rõ và sản phẩm không thấy vết diclofenac acid ở nồng độ chấm.

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

3.1.3.1. Phổ UV-VIS

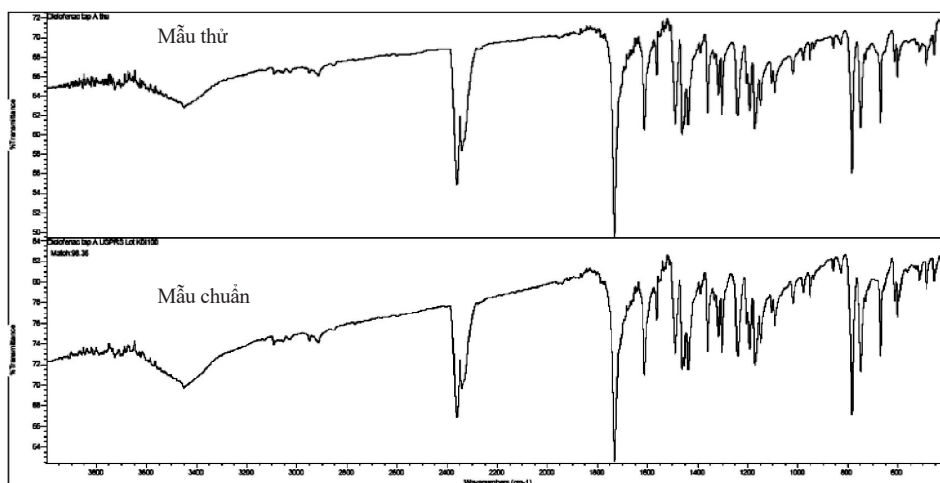
Song song tiến hành quét phổ UV – VIS của dung dịch chuẩn Mỹ diclofenac related compound A số lô: KOI100 và dung dịch 1-(2,6-diclorophenyl)-1,3-dihydro-2H-indol-2-on sau khi tinh chế với nồng độ 10 µg/ml trong methanol ở khoảng bước sóng từ 200 – 400 nm. Kết quả cho thấy phổ hấp thụ UV – VIS của 2-amino-5-methylthiazol chuẩn Mỹ và 2-amino-5-methylthiazol sau khi tinh chế đều cho 1 cực đại hấp thụ (λ_{max}) ở bước sóng 244,0 nm.



Hình 3. Chồng phổ hấp thụ tử ngoại của chuẩn và thử

3.1.3.2. Phổ IR

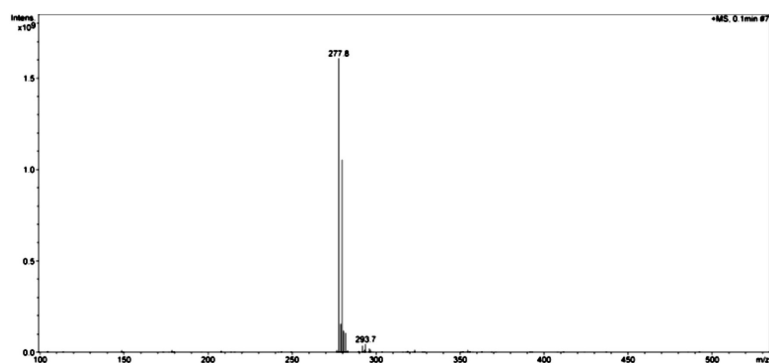
Phổ hồng ngoại của sản phẩm 1-(2,6-diclorophenyl)-1,3-dihydro-2H-indol-2-on sau tinh chế phù hợp với phổ hồng ngoại của diclofenac related compound A chuẩn Mỹ số lô: KOI100 với hệ số match 98,35%.



Hình 4. Phổ IR của 1-(2,6-diclorophenyl)-1,3-dihydro-2H-indol-2-on

3.1.3.3. Phổ khối (MS)

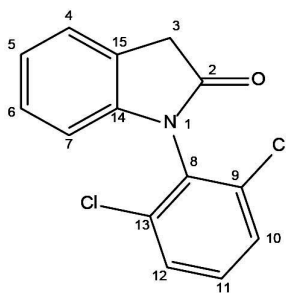
Dữ liệu phổ ESI-MS của 1-(2,6-diclorophenyl)-1,3-dihydro-2H-indol-2-on tổng hợp được có pic ion (m/z): 277,8 $[M+H]^+$ tương ứng với khối lượng phân tử của 1-(2,6-diclorophenyl)-1,3-dihydro-2H-indol-2-on (CTPT $C_{14}H_9Cl_2NO$, $M = 278,13$).



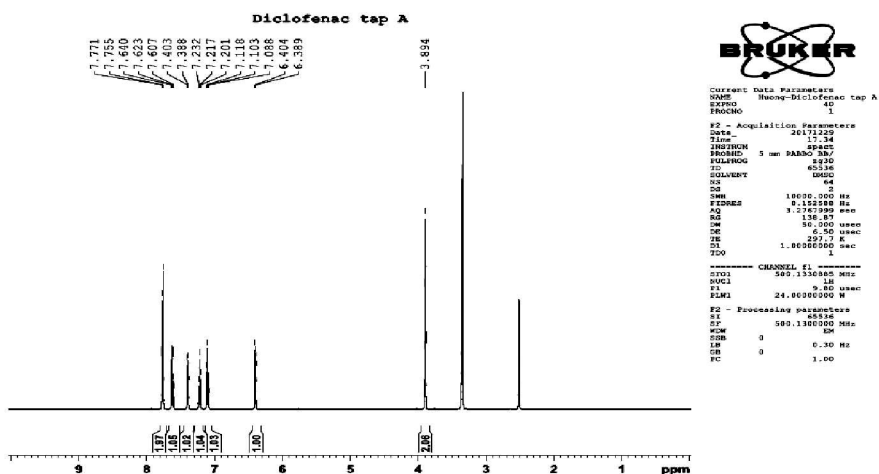
Hình 5. Phổ MS của 1-(2,6-diclorophenyl)-1,3-dihydro-2H-indol-2-on

3.1.3.4. Phổ cộng hưởng từ hạt nhân (NMR)

Phân tích dữ liệu phổ cộng hưởng từ 1H và ^{13}C của 1-(2,6-diclorophenyl)-1,3-dihydro-2H-indol-2-on tổng hợp được cho thấy xuất hiện các tín hiệu proton và carbon phù hợp với công thức cấu tạo.

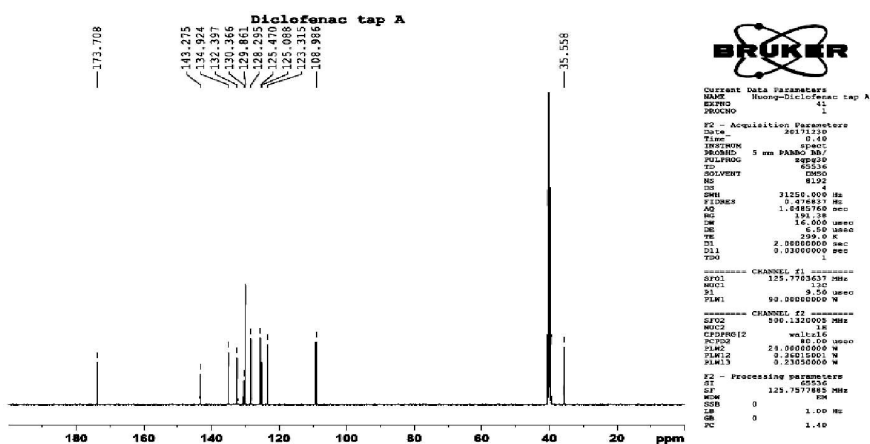


Phổ 1H -NMR ($DMSO-d_6$, 500 MHz), δ (ppm): 3,89 (s, 2H, H-3), 6,38 (d, 1H, $J=7,5$ Hz, H-4), 7,09 (dt, 1H, $J_1=7,5$ Hz, $J_2=7,5$ Hz, H-5), 7,20 (dt, 1H, $J_1=7,5$ Hz, $J_2=7,5$ Hz, H-6), 7,39 (d, 1H, $J=7,5$ Hz, H-7), 7,61 (dd, 1H, $J_1=8,0$ Hz, $J_2=8,0$ Hz, H-11), 7,6 (d, 2H, $J=8,0$ Hz, H-10, H-12).



Hình 6. Phổ ^1H -NMR của 1-(2,6-dichlorophenyl)-1,3-dihydro-2H-indol-2-on

Phổ ^{13}C -NMR (DMSO- d_6), δ (ppm): 35,59 (C-3); 108,99 (C-7); 123,32 (C-5); 125,09 (C-11); 125,47 (C-14); 128,30 (C-6); 129,86 (C-4); 130,37 (C-10; C-12); 132,40 (C-9; C-13); 134,92 (C-15); 143,28 (C-8); 173,71 (C-2)..



Hình 7. Phổ ^{13}C -NMR của 1-(2,6-dichlorophenyl)-1,3-dihydro-2H-indol-2-on

Phân tích dữ liệu phổ cộng hưởng từ ^1H và ^{13}C của sản phẩm sau tinh chế cho thấy xuất hiện các tín hiệu proton và carbon phù hợp với công thức cấu tạo của 1-(2,6-dichlorophenyl)-1,3-dihydro-2H-indol-2-on.

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 1-(2,6-dichlorophenyl)-1,3-dihydro-2H-indol-2-on.

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

3.1.4.1. Xác định tạp chất liên quan

Sử dụng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao với điều kiện phân tích theo Dược điển Mỹ - USP 40 (Chuyên luận nguyên liệu diclofenac natri) để tiến hành xác định hàm lượng tạp chất liên quan có trong sản phẩm sau tinh chế. Pha động là hỗn hợp của 70 thể tích methanol và 30 thể tích của hỗn hợp acid phosphoric 0,01 M và natri dihydrophosphat 0,01 M tỉ lệ (1 : 1) đã được điều chỉnh về pH $2,5 \pm 0,2$. Chất chuẩn diclofenac natri, tạp A của diclofenac USPRS và diethyl phthalat được cho vào để xác định độ phân tách của hệ sắc ký đồng thời xác định vị trí rửa giải của các chất này trong sản phẩm sau tinh chế (nếu có).

Chuẩn bị các dung dịch như sau:

Dung dịch thử: Hòa tan 10,0 mg chế phẩm trong methanol và pha loãng thành 10,0 ml bằng cùng dung môi.

Dung dịch đối chiếu (1): Hút 1,0 ml dung dịch thử, pha loãng bằng methanol thành 100 ml dung dịch.

Dung dịch đối chiếu (2): Dung dịch có chứa diethyl phthalat, chuẩn diclofenac natri và chuẩn tạp A của diclofenac trong methanol có cùng nồng độ 0,1 mg/ml.

Tiến hành: Tiến hành sắc ký lần lượt đối với mẫu trắng, dung dịch đối chiếu (1), dung dịch đối chiếu (2),

dung dịch thử. Hệ số phân giải giữa pic tạp A và diclofenac không được nhỏ hơn 6,5.

Tính (%) hàm lượng mỗi tạp trong dung dịch thử theo công thức:

$$(\%) \text{ Mỗi tạp} = r_i / r_{S1}$$

Trong đó: r_i : diện tích của mỗi pic tạp trên SKĐ của dung dịch thử

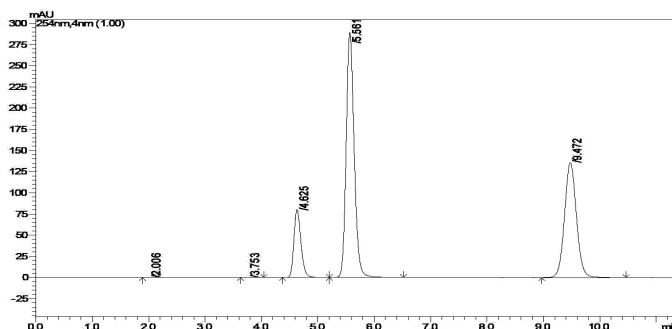
r_{S1} : diện tích pic chính trên SKĐ của dung dịch đối chiếu (1)

Kết quả thu được trong Bảng 2 và Hình 8, 9, 10.

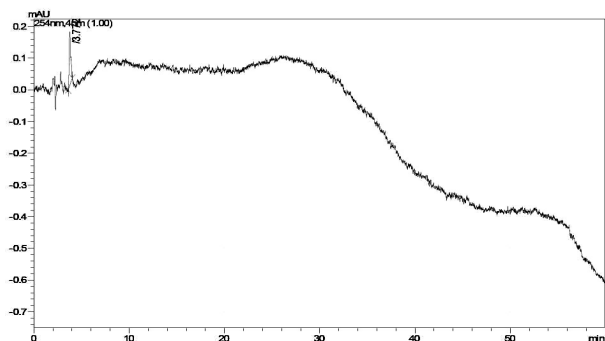
Bảng 2. Kết quả xác định tạp trong sản phẩm tinh chế

Thiết bị: Shimadzu LC – 20A (VKN/TT/06.21); Cột C8,Luna, 250 x 4,6 mm, 5μm, duy trì nhiệt độ ở 30 °C								
Thời gian lưu: $t_{R(Diethyl\ phthalat)} = 4,6\ \text{phút}$				Độ phân giải: $R_{(Diethyl\ phthalat - \text{tạp A})} = 3,7$				
$t_{R(Tap\ A)} = 5,7\ \text{phút}$				$R_{(Diclofenac\ natri - \text{tạp A})} = 11,9$				
$t_{R(Diclofenac\ natri)} = 9,5\ \text{phút}$								
Diện tích pic chính trong dung dịch đối chiếu (1) (mAU.s)								
Lần tiêm		Pha loãng từ thử (1)		Pha loãng từ thử (2)		Pha loãng từ thử (3)		
1		275571		308001		295714		
2		276584		306873		295459		
3		274885		308468		295283		
Trung bình		275680,0		307780,7		295485,3		
MẪU THỬ								
Pic tạp	Thời gian lưu (phút)	Thử 1		Thử 2		Thử 3		Trung bình (%)
		Lượng cân: 10,007 mg		Lượng cân: 10,418 mg		Lượng cân: 10,001 mg		
		Dt pic tạp (mAU.s)	% Tạp	Dt pic tạp (mAU.s)	% Tạp	Dt pic tạp (mAU.s)	% Tạp	
Tạp 1	2,0	1136	0,004	792	0,003	1151	0,004	0,004
Tạp 2	7,2	5379	0,020	5501	0,018	5492	0,019	0,019
Tạp 3	10,8	8523	0,031	9087	0,030	8591	0,029	0,030
Tổng tạp		0,055		0,051		0,052		0,053

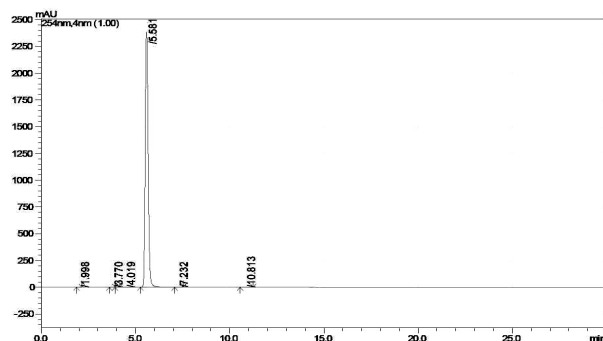
Kết quả cho thấy sản phẩm sau tinh chế không có các tạp diethyl phthalat và diclofenac nhưng có 3 pic tạp khác có hàm lượng rất nhỏ; tổng hàm lượng tạp là 0,053%, đạt yêu cầu để thiết lập chất chuẩn.



Hình 8. Sắc ký đồ dung dịch đối chiếu (2)



Hình 9. Sắc ký đồ mẫu trắng



Hình 10. Sắc ký đồ mẫu thử

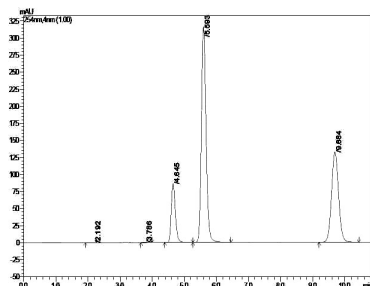
1.1.4.2. Định lượng

Sử dụng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao với điều kiện phân tích theo Dược điển Mỹ 40 để tiến hành định lượng sản phẩm tạp A của diclofenac sau tinh chế. Pha động là hỗn hợp của 70 thể tích methanol và 30 thể tích của hỗn hợp acid phosphoric 0,01 M và natri dihydrophosphat 0,01 M tỉ lệ (1 : 1) đã được điều chỉnh về pH $2,5 \pm 0,2$. Dung dịch thử có chứa 1-(2,6-diclorophenyl)-1,3-dihydro-2H-indol-2-on trong methanol nồng độ 0,1 mg/ml. Tiến hành song song với chất chuẩn tạp A của diclofenac lô K01100 (Mỹ) có hàm lượng 1,00 mg/mg tính theo nguyên trạng. Kết quả thu được trong Bảng 3 và Hình 11.

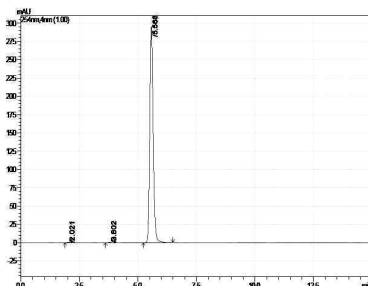
Bảng 3. Kết quả định lượng nguyên liệu tạp A của diclofenac

- Thiết bị: Máy HPLC Shimadzu LC – 20A (VKN/TT/06.21); - Cột C8,Luna, 250 x 4,6 mm, 5μm, duy trì nhiệt độ ở 30 °C; - Lượng cân chuẩn (mg): Chuẩn 1: 10,056 mg ($S = 2939427$ mAU.s); Chuẩn 2: 10,514 mg ($S = 3069864$ mAU.s); - Độ phân giải: $R_{(\text{Diethyl phthalat} - \text{tạp A})} = 3,7$; $R_{(\text{Diclofenac natri} - \text{tạp A})} = 12,1$			
Mẫu thử	Lượng cân (mg)	Diện tích pic (mAU.s)	Hàm lượng (%) nguyên trạng
Thử 1	10,318	2981875	98,87
Thử 2	10,148	2946901	99,35
Thử 3	9,955	2898922	99,62
Thử 4	9,693	2823426	99,65
Thử 5	10,077	2934141	99,61
Thử 6	9,818	2851574	99,36
Hàm lượng trung bình = 99,41%; n = 6; RSD = 0,43%			

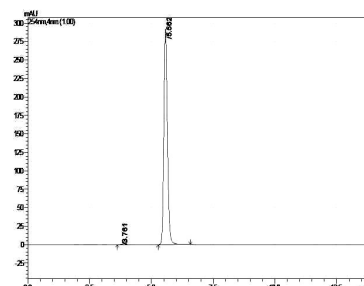
Hàm lượng tạp A của diclofenac sau tinh chế là 99,41% tính theo nguyên trạng (n = 6; RSD = 0,43%).



Dung dịch phân giải



Mẫu thử



Mẫu chuẩn

Hình 11. Sắc ký đồ định lượng nguyên liệu tạp A của diclofenac

Nhận xét: Kết quả phân tích sơ bộ trên 2 chỉ tiêu tạp chất liên quan và định lượng cho thấy sản phẩm tổng hợp và tinh chế tạp A của diclofenac đạt yêu cầu sử dụng làm nguyên liệu thiết lập tạp chuẩn.

3.2. Bàn luận

3.2.1. Về tổng hợp hóa học

Chúng tôi đã khắc phục được nhược điểm của các phương pháp tổng hợp hiện nay để tổng hợp thành công 1-(2,6-diclorophenyl)-1,3-dihydro-2H-indol-2-on từ diclofenac natri với chi phí thấp và hiệu suất cao, tác nhân sử dụng ở đây là acid hydrocloric. Phản ứng tổng hợp có đặc điểm là cả diclofenac acid và 1-(2,6-diclorophenyl)-1,3-dihydro-2H-indol-2-on đều không tan trong nước làm cho phản ứng xảy ra khó khăn, nhưng chúng tôi đã khắc phục được điều này bằng cách nhỏ từ từ dung dịch natri diclofenac vào dung dịch HCl 10%, hiệu suất tổng hợp lên đến 90% và sản phẩm ít tạp, dễ tinh chế.

3.2.2. Về quá trình tinh chế sản phẩm

Quá trình tinh chế có hiệu suất cao (92,0%). Về cảm quan, sản phẩm sau tinh chế có màu trắng giống với màu

của tạp chuẩn nhập từ Mỹ và EU.

3.2.3. Về quá trình xác định cấu trúc sản phẩm

Từ kết quả phân tích tính chất và dữ liệu phổ IR, MS và NMR kết hợp so sánh với chuẩn có thể khẳng định chất sau khi tinh chế là 1-(2,6-diclorophenyl)-1,3-dihydro-2H-indol-2-on.

3.2.4. Về kết quả kiểm tra chất lượng sản phẩm

Kết quả phân tích sơ bộ trên 2 chỉ tiêu tạp chất liên quan và định lượng cho thấy sản phẩm 1-(2,6-diclorophenyl)-1,3-dihydro-2H-indol-2-on sau tổng hợp và tinh chế đạt yêu cầu làm tạp chuẩn với hàm lượng 99,41% và lượng tổng tạp chất là 0,053%.

4. Kết luận

Như vậy, chúng tôi đã tổng hợp và tinh chế được tạp A của diclofenac đạt yêu cầu chất lượng để làm nguyên liệu thiết lập chất chuẩn dùng trong kiểm nghiệm nguyên liệu và các dạng bào chế của diclofenac. Sản phẩm này đang tiếp tục được nghiên cứu độ ổn định để sử dụng làm nguyên liệu thiết lập chất chuẩn tạp.

Tài liệu tham khảo

1. Bộ Y tế (2017), *Dược điển Việt Nam*, Lần xuất bản thứ năm, Nhà xuất bản Y học, Hà Nội.
2. Bộ Y tế (2015), *Dược thư quốc gia Việt Nam*, Lần xuất bản thứ hai, Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật, tr. 515-518.
3. Đàm Thanh Thủy (2013), “Nghiên cứu bào chế viên nén natri diclofenac 12,5 mg giải phóng nhanh theo cơ chế tự nhũ hóa”, *Khóa luận tốt nghiệp dược sĩ*, Trường Đại học Dược Hà Nội.
4. Alsante K. M, et al (2001), “Isolation and identification of process related impurities and degradation products from pharmaceutical drug candidates. Part 1”, *American Pharmaceutical Review*, vol. 4(1), pp.70-78.
5. Man Chin Chun, Jean Leandro dos Santos, et al (2009), “Synthesis, ex Vivo and in Vitro Hydrolysis Study of an Indoline Derivative Designed as an Anti-Inflammatory with Reduced Gastric Ulceration Properties”, *Molecules.*, 14, 3187-3197.
6. P.L. Somashekar, P. N. Sanjay Pai and Gopalkrishna Rao (2013), “Synthesis and Characterization of Specified Impurities of Aceclofenac”, *Chemical Science Transactions.*, 2(3), 813-820.
7. The British Pharmacopoeia Commission (2017), *British Pharmacopoeia*.
8. *The European Pharmacopoeia*, Ninth Edition.
9. The U.S Pharmacopoeial Convention (2017), *United states Pharmacopoeia 40*.

SUMMARY

Controlling the pharmaceutical impurities is a significant issue to the pharmaceutical industry. Diclofenac is a nonsteroidal anti-inflammatory drug (NSAID). Diclofenac is used to treat mild to moderate pain, or signs and symptoms of osteoarthritis or rheumatoid arthritis. For controlling diclofenac material and its products, it's essential to evaluate 1-(2,6-dichlorophenyl)-1,3-dihydro-2H-indol-2-one impurity. In this work, we have synthesized and purified it to establish 1-(2,6-dichlorophenyl)-1,3-dihydro-2H-indol-2-one impurity standard. The structure of synthesized product was determined by IR, NMR and MS. The purified product contained 99.41% (on as is basis) by HPLC analysis, comparing with USP reference standard.

(Ngày nhận bài: 06/11/2018 ; Ngày phản biện: 01/03/2020 ; Ngày duyệt đăng: 17/06/2020)

THUỐC KHÔNG ĐẠT CHẤT LƯỢNG ĐÃ ĐƯỢC BỘ Y TẾ XỬ LÝ
TỪ 01/06/2020 ĐẾN 30/11/2020

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 01/06/2020 đến 30/11/2020 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: 27 thuốc bị đình chỉ và thu hồi, 1 thuốc giả, rút số đăng ký của 36 thuốc và 1 công ty rút giấy đăng ký lưu hành trong 24 tháng.

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

Danh mục đình chỉ lưu hành và thu hồi thuốc từ ngày 01/06/2020 đến ngày 30/11/2020

STT	Tên thuốc	Số lô	Ngày sản xuất	Hạn dùng	Số đăng ký	Tên cơ sở sản xuất	Tên cơ sở đơn vị nhập khẩu	Chỉ tiêu không đạt	Văn bản xử lý	Hình thức xử lý
1	Viên nén bao phim Ibuprofen (Ibuprofen 400mg)	050320	23/03/2020	23/03/2023	VD-28797-18	Công ty Cổ phần Dược Hà Tĩnh		Tạp chất liên quan	Công văn: số 10908/QLD-CL ngày 21/07/2020	Đình chỉ lưu hành và thu hồi trên địa bàn tỉnh Đắk Lắk và các cơ sở kinh doanh đã mua lô thuốc do Công ty Cổ phần Dược - Vật tư Y tế Đắk Lắk cung cấp
2	Viên nang cứng Doxycyclin 100mg	022020	090320	090323	VD-30121-18	Công ty TNHH MTV 120 Armepharco		Nước	Công văn: số 10912/QLD-CL ngày 21/07/2020	Đình chỉ lưu hành và thu hồi trên địa bàn tỉnh Thanh Hóa và các cơ sở đã mua thuốc do Chi nhánh Công ty Dược phẩm Nga Sơn cung cấp
3	Thuốc bột Aspirin 100 (Aspirin 100mg)	1843	30/11/2018	30/11/2020	VD-15453-11	Công ty Cổ phần Dược phẩm Trường Thọ		- Giới hạn acid salicylic tự do; - Định lượng	Công văn: số 10913/QLD-CL ngày 21/07/2020	Đình chỉ lưu hành và thu hồi trên địa bàn tỉnh Kon Tum và các cơ sở kinh doanh đã mua thuốc do Khoa Dược, Bệnh viện đa khoa tỉnh Kon Tum cung cấp
4	Viên nén Acetylcystein 200mg (Acetylcystein 200mg)	010618	18/6/2018	17/6/2021	VD-30156-16	Chi nhánh Công ty TNHH SX-TM Dược phẩm Thành Nam		- Tính chất; - Định lượng	Công văn: số 10914/QLD-CL ngày 21/07/2020	Đình chỉ lưu hành và thu hồi trên địa bàn tỉnh Thanh Hóa và các cơ sở đã mua thuốc do Chi nhánh Dược phẩm Yên Định thuộc Công ty Cổ phần Dược Vật tư Y tế Thanh Hóa cung cấp
5	Thuốc bột pha hỗn dịch uống Eudoxime 100 (Cefpodoxim 100mg)	010618	19/06/2018	18/06/2021	VD-20656-14	Công ty cổ phần Dược phẩm Am Vi		- Tính chất; - Nước	Công văn: số 11167/QLD-CL ngày 21/07/2020	Đình chỉ lưu hành và thu hồi trên địa bàn tỉnh Thanh Hóa và các cơ sở kinh doanh đã mua thuốc do Khoa thuốc - Chi nhánh Dược phẩm Quan Sơn cung cấp

6	Viên nén BivantoX (Acid alpha lipoic 600mg)	19001	29/01/2019	28/01/2022	VD-20831-14	Công ty Cổ phần Dược phẩm Trung ương I - Pharbaco		- Độ hòa tan; - Định lượng	Công văn: số 11170/QLD-CL ngày 21/07/2020 và Công văn: số 17166 ngày 19/11/2020	Hủy mẫu thuốc do Công ty TNHH Thương mại Dược phẩm Hưng Thịnh thu hồi
7	Viên nén bao phim Sedtyl (Desloratadin 5mg)	03M19	25/11/2019	25/11/2022	VD-25077-16	Công ty TNHH BRV Healthcare		Tạp chất liên quan	Công văn: số 11186/QLD-CL ngày 22/07/2020	Đình chỉ lưu hành và thu hồi trên địa bản Tp. Hồ Chí Minh và các cơ sở kinh doanh đã mua thuốc do Công ty TNHH Dược phẩm Việt Thái cung cấp
8	Hỗn dịch uống Trimakit (Sulfamethoxazol 200mg)	061118	02/11/18	02/11/21	VD-19809-13	Công ty Cổ phần Dược Hà Tĩnh		Định lượng	Công văn: số 11184/QLD-CL ngày 22/07/2020	Đình chỉ lưu hành và thu hồi trên địa bản tỉnh Vĩnh Phúc
9	Viên nén Navacarzol 5mg (Carbamazole 5mg)	180513/2	11/2018	10/2021	VN-17813-14	Industria Farmaceutica Nova Argentina S.p.A, Italy	Công ty Cổ phần Dược phẩm Thiên Thảo	- Độ dày; - Độ cứng; - Độ hòa tan; - Định lượng	Công văn: số 11444/QLD-CL ngày 24/07/2020	Đình chỉ lưu hành và thu hồi toàn quốc
10	Genpharmason	022020	02/6/2020	02/6/2023	VD-16741-12	Công ty TNHH MTV 120 Armepharco		- Định tính Betamethason dipropionat; - Định lượng Betamethason dipropionat và Clotrimazol	Công văn: số 11924/QLD-CL ngày 30/07/2020	Đình chỉ lưu hành và thu hồi toàn quốc
11	Viên bao đường Hoạt huyết dưỡng não	5419	09/03/2019	08/03/2022	V1610-H12-10	Công ty Cổ phần Dược Phúc Vinh		Định tính Cao Bạch quả (Theo ĐBVN V)	Công văn: số 11961/QLD-CL ngày 31/07/2020	Thu hồi tự nguyện trên toàn quốc
12	Viên nén bao đường Detracyl 250 (Mephenesin 250mg)	61100718	100718	100721	VD-20186-13	Công ty Cổ phần Dược phẩm Cửu Long		Tính chất	Công văn: số 12222/QLD-CL ngày 04/08/2020	Đình chỉ lưu hành và thu hồi toàn quốc
13	Viên nén bao phim Bãi Thạch Trường Phúc	010719	19/7/2019	19/7/2022	VD-32590-19	Công ty TNHH Dược thảo Hoàng Thành		Giới hạn độ nhiễm khuẩn	Công văn: số 14325/QLD-CL ngày 28/08/2020	Đình chỉ lưu hành và thu hồi trên địa bản tỉnh Thanh Hóa
14	Hỗn dịch uống Sucrate gel (Sucralfate 1g/5ml)	9028	10/2019	10/2022	VN-13767-11	Laboratorio Italiano Biochimico Farmaceutico Lisapharma S.p.A., Ý	Công ty Cổ phần Dược phẩm Trung ương Coduphar	pH	Công văn: số 14917/QLD-CL ngày 15/09/2020	Đình chỉ lưu hành và thu hồi trên địa bàn Hà Nội các cơ sở đã mua thuốc do Công ty Cổ phần Đầu tư và thương mại Pharma Việt Nam cung cấp

15	Kem bôi da Sikemeron	161219	25/12/2019	25/12/2022	VD-23695-15	Công ty Cổ phần Dược phẩm Trung ương VIDIPHA		Định lượng Clotrimazol	Công văn: số 14918/QLD-CL ngày 15/09/2020	Định chỉ lưu hành và thu hồi trên địa bàn Hà Nội các cơ sở đã mua thuốc do Chi nhánh Công ty Cổ phần Dược phẩm Trung ương Vidiphar tại Hà Nội cung cấp
16	Viên nang mềm Dacodex	030220	26/02/2020	26/02/2023	VD-11224-10	Công ty Cổ phần Dược - Vật tư Y tế Hải Dương		Tính chất	Công văn: số 14919/QLD-CL ngày 15/09/2020	Định chỉ lưu hành và thu hồi trên địa bàn Hà Nội các cơ sở đã mua thuốc do Công ty Cổ phần Thương mại dịch vụ Đầu tư phát triển GP cung cấp
17	Dung dịch uống Dismolan (Acetylcysteine 200mg/10ml)	011219	19/12/2019	18/12/2021	VD-21505-14	Công ty Cổ phần Dược phẩm CPC1 Hà Nội		Định lượng	Công văn: số 15058/QLD-CL ngày 18/09/2020	Định chỉ lưu hành và thu hồi trên địa bàn tỉnh Vĩnh Phúc
18	Viên nén Agichymo (Chymotrypsin 4,2mg)	081219	06/12/2019	06/12/2021	VD-24701-16	Chi nhánh Công ty Cổ phần Dược phẩm Agimexpharm		Định lượng	Công văn: số 15188/QLD-CL ngày 22/09/2020	Định chỉ lưu hành và thu hồi trên địa bàn Hải Phòng các cơ sở đã mua thuốc do Công ty TNHH Dược phẩm Việt Dũng cung cấp
19	Viên bao đường Nystatin 500.000IU	20004HN	03/04/2020	03/04/2023	VD-16090-11	Công ty Cổ phần Hóa dược phẩm Mekophar		Định lượng	Công văn: số 15297/QLD-CL ngày 24/9/2020	Định chỉ lưu hành và thu hồi trên địa bàn tỉnh Quảng Ngãi và các cơ sở đã mua thuốc do Công ty TNHH Dược phẩm Tài Thịnh cung cấp
20	Viên nang Virazom (Omeprazol 20mg)	1161915	07/10/2019	06/10/2022	VN-17500-13	Zim Laboratories Ltd., India	Công ty Cổ phần Dược Thiết bị Y tế Đa Năng - Dapharco	Tạp chất liên quan (Tạp C)	Công văn: số 15817/QLD-CL ngày 14/10/2020	Định chỉ lưu hành và thu hồi trên địa bàn Tp. Hồ Chí Minh các cơ sở đã mua thuốc do Chi nhánh Công ty Cổ phần Dược Thiết bị Y tế Đa Năng (299/22 Lý Thường Kiệt, Tp. Hồ Chí Minh) cung cấp
21	Viên nang mềm Dacodex	030220	26/02/2020	26/02/2023	VD-11224-10	Công ty Cổ phần Dược - Vật tư Y tế Hải Dương		Tính chất	Công văn: số 16984/QLD-CL ngày 17/11/2020	Định chỉ lưu hành và thu hồi trên địa bàn toàn quốc
22	Viên nang cứng Xoang Vạn Xuân	010919	14/09/2019	14/19/2021	V1508-H12-10	Công ty TNHH Vạn Xuân		Mất khối lượng do làm khô	Công văn: số 17245/QLD-CL ngày 20/11/2020	Định chỉ lưu hành và thu hồi trên địa bàn tỉnh Thái Bình
23	Viên nang mềm Naphar With Amino Acids	18118	27/06/2018	27/06/2021	VD-16181-12	Công ty Cổ phần Dược phẩm Nam Hà		- Tính chất; - Độ rắn; - Định tính; - Định lượng	Công văn: số 17246/QLD-CL ngày 20/11/2020	Định chỉ lưu hành và thu hồi trên địa bàn tỉnh Yên Bái và các cơ sở kinh doanh đã mua thuốc do Công ty TNHH Thương mại Dược phẩm Cường Mùi cung cấp
24	Viên nang mềm Bronzoni	915101	28/05/2019	28/05/2020	VD-19598-13	Công ty Cổ phần Sản xuất - Thương mại Dược phẩm Đông Nam		Định tính tinh dầu Tann	Công văn: số 17247/QLD-CL ngày 20/11/2020	Định chỉ lưu hành và thu hồi trên địa bàn Tp. Hà Nội và các cơ sở kinh doanh, khám chữa bệnh đã mua thuốc do Công ty Cổ phần VIC Pharma Hà Nội cung cấp

25	Viên nén bao đường Hoạt huyết dưỡng não	040620	21/06/2020	21/06/2023	VD-18440-13	Công ty Cổ phần Dược Vật tư Y tế Hải Dương		Định lượng	Công văn: số 17250/QLD-CL ngày 20/11/2020	Đình chỉ lưu hành và thu hồi trên địa bàn Tp. Hà Nội và các cơ sở kinh doanh, khám chữa bệnh đã mua thuốc do Chi nhánh Công ty Cổ phần Dược Vật tư Y tế Hải Dương tại Hà Nội cung cấp
26	Dung dịch đậm đặc để pha tiêm truyền Atibutrex	2020001	10/4/2020	9/4/2022	VD-26752-17	Công ty Cổ phần Dược phẩm An Thiên		Tính chất	Công văn: số 17330/QLD-CL ngày 20/11/2020	Đình chỉ lưu hành và thu hồi trên địa bàn toàn quốc
27	Viên nén bao phim Sedyl (Desloratadin 5mg)	03M19	25/11/2019	25/11/2022	VD-25077-16	Công ty TNHH BRV Healthcare		Tạp chất liên quan	Công văn: số 17463/QLD-CL ngày 25/11/2020	Đình chỉ lưu hành và thu hồi trên địa bàn toàn quốc

Danh mục thuốc bị rút số đăng ký từ ngày 01/06/2020 đến ngày 30/11/2020

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	Sebemin	VN-14320-11	Crown Pharm. Co., Ltd., Korea	Pharmix Corporation, Korea	Quyết định số 275/QĐ-QLD ngày 16/06/2020	Thu hồi giấy đăng ký lưu hành
2	Young II Captopril	VN-20970-18	Young II Pharm. Co. Ltd, Korea	Công ty TNHH Dược phẩm Nam Hân	Như trên	Như trên
3	Accupril	VN-19302-15	Pfizer Manufacturing Deutschland GmbH	Pfizer (Thailand) Ltd.	Quyết định số 281/QĐ-QLD ngày 18/06/2020	Thu hồi giấy đăng ký lưu hành
4	Forane	VN-20123-16	Aesica Queenborough Limited, United Kingdom	AbbVie Biopharmaceuticals GmbH, Germany	Như trên	Như trên
5	Fumafer B9 Corbiere daily use	VD-25769-16	Công ty Cổ phần Dược phẩm Sanofi-Synthelabo Việt Nam	Công ty Cổ phần Dược phẩm Sanofi-Synthelabo Việt Nam	Như trên	Như trên
6	Stilnox	VN-21959-19	Sanofi Winthrop Industrie - Tours	Sanofi-Aventis Singapore Pte Ltd.	Như trên	Như trên
7	Pharmaton	VN-19023-15	Swiss Caps AG, Switzerland	Như trên	Như trên	Như trên
8	Tavanic	VN-19904-16	Sanofi-Aventis Deutschland GmbH, Germany	Như trên	Như trên	Như trên
9	Adalat retard	VN-20387-17	Bayer Pharma AG, Germany	Bayer (South East Asia) Pte., Ltd., Singapore	Như trên	Như trên
10	Maxidex	VN-19382-15	s.a. Alcon-Couvreur N.V, Belgium	Novartis Pharma Services AG, Switzerland	Như trên	Như trên
11	Perigard-2	VN-18317-14	Glenmark Pharmaceuticals Ltd., India	Glenmark Pharmaceuticals Ltd., India	Như trên	Như trên
12	Biocetum	VN-16858-13	Pharmaceutical Works Polpharma S.A., Poland	Pharmaceutical Works Polpharma S.A., Poland	Như trên	Như trên
13	Enarenal	VN-16859-13	Pharmaceutical Works Polpharma S.A., Poland	Pharmaceutical Works Polpharma S.A., Poland	Như trên	Như trên
14	Poltram 100	VN-17128-13	Như trên	Như trên	Như trên	Như trên
15	Poltram 50	VN-17129-13	Như trên	Như trên	Như trên	Như trên

16	Tất cả các số đăng ký được sản xuất bởi Công ty Maxtar Bio-Genics (India)				Quyết định số 286/QĐ-QLD ngày 19/06/2020	Thu hồi giấy đăng ký lưu hành trong 24 tháng
17	Telmotens	VN-19427-15	Alembic Pharmaceuticals Limited, India	Alvogen (Thailand) Limited	Quyết định số 597/QĐ-QLD ngày 27/11/2020	Thu hồi giấy đăng ký lưu hành
18	Co- Alvoprel	VN-19883-16	Genepharm S.A., Greece	Như trên	Như trên	Như trên
19	Co- Alvoprel	VN-19884-16	Như trên	Như trên	Như trên	Như trên
20	Alvostat	VN-19433-15	Zaklad Farmaceutyczny Adamed Pharma S.A., Ba Lan	Như trên	Như trên	Như trên
21	Alvostat	VN-19434-15	Như trên	Như trên	Như trên	Như trên
22	Lactacyd FH	VD-27025-17	Công ty Cổ phần Dược phẩm Sanofi-Synthelabo Việt Nam	Công ty Cổ phần Dược phẩm Sanofi-Synthelabo Việt Nam	Như trên	Như trên
23	Gesdonyl	VN3-138-19	Haupt Pharma Munster GmbH, Germany	Siragen Pharma SA, Switzerland	Như trên	Như trên
24	Moliavex	VN3-130-19	Corden Pharma Latina, Italy	Như trên	Như trên	Như trên
25	Moliavex	VN3-131-19	Như trên	Như trên	Như trên	Như trên
26	Moliavex	VN3-208-19	Như trên	Như trên	Như trên	Như trên
27	Singulair	VN-19260-15	Merck Sharp & Dohme Ltd., United Kingdom	Merck Sharp & Dohme (Asia) Ltd., Hong Kong	Như trên	Như trên
28	Remeron Soltab	VN-18938-15	Anesta LLC, USA	Như trên	Như trên	Như trên
29	Januvia 25mg	VN-19258-15	Merck Sharp & Dohme Ltd., United Kingdom	Như trên	Như trên	Như trên
30	Singulair	VN-18939-15	Patheon Manufacturing Services LLC, USA	Như trên	Như trên	Như trên
31	Adalat 10mg	VN-20389-17	Catalent Germany Eberbach GmbH, Germany	Bayer (South East Asia) Pte., Ltd., Singapore	Như trên	Như trên
32	Climen	VN-21682-19	Delpharm Lille SAS, France	Như trên	Như trên	Như trên
33	Angeliq	VN-19015-15	Bayer Weimar GmbH und Co., Germany	Như trên	Như trên	Như trên
34	Enbrel	VN-18950-15	Boehringer Ingelheim Pharma GmbH & Co. KG, Germany	Pfizer (Thailand) Ltd., Thailand	Như trên	Như trên
35	Anzatax 300mg/50ml	VN-21436-18	Hospira Australia Pty Ltd., Australia	Như trên	Như trên	Như trên
36	Bionimu	VN-22493-20	Axon Drugs Private Ltd., India	Axon Drugs Pvt. Ltd., India	Quyết định số 598/QĐ-QLD ngày 30/11/2020	Thu hồi giấy đăng ký lưu hành

(*): Số đăng ký đã hết hiệu lực

Danh mục thuốc giả từ ngày 01/06/2020 đến ngày 30/11/2020

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	Văn bản xử lý
1	Tetracyclin TW3 (Tetracyclin 250mg) thuốc đóng gói dạng lọ				VD-28109-17	Công ty Cổ phần Dược phẩm TW 3	Công văn: số 11152/QLD-CL ngày 21/07/2020

MỤC LỤC

Trang

- **Nghiên cứu khoa học**
- Xây dựng và thẩm định quy trình định lượng Diclofenac natri trong viên đạn bằng phương pháp HPLC. 1
LÊ THỊ QUỲNH NGÀ, NGUYỄN THỊ HỒNG HẠNH, TRẦN THỊ HỒNG ANH
- Xây dựng và thẩm định quy trình định tính, định lượng nguyên liệu Dioscin chiết xuất, phân lập từ cây Bảy lá một hoa bằng kỹ thuật sắc ký lỏng hiệu năng cao. 6
CAO NGỌC ANH, LÊ QUANG THẢO, ĐỖ THỊ HÀ, THÁI NGUYỄN HÙNG THU
- Nghiên cứu định lượng Vildagliptin trong huyết tương người bằng phương pháp LC-MS/MS. 12
PHAN THỊ NGHĨA, TRẦN THỊ NGÀ, LÊ THỊ LA, PHẠM THANH HUYỀN, HOÀNG VĂN ĐỨC, TẠ MẠNH HÙNG
- Tổng hợp và tinh chế tạp chất A của Diclofenac đạt chất lượng làm nguyên liệu thiết lập tạp chuẩn. 18
LÊ THỊ THU, NGUYỄN THỊ QUỲNH GIANG, PHẠM VĂN QUANG, LÊ THỊ MỸ HOA, NGUYỄN VĂN GIANG, ĐOÀN CAO SƠN
- **Thông tin khoa học - Tin tức**
- Thuốc không đạt chất lượng đã được Bộ Y tế xử lý từ tháng 6/2020 đến tháng 11/2020. 27
HÀ THỊ MINH CHÂU

CONTENTS

Page

- **Scientific researches**
- Development and validation of the procedure for determination of Diclofenac sodium in suppository by HPLC method. 1
LÊ THỊ QUỲNH NGÀ, NGUYỄN THỊ HỒNG HẠNH, TRẦN THỊ HỒNG ANH
- Development and validation of High Performance Liquid Chromatography technique for identification and determination process of Dioscin raw materials, extracted, isolated from “Bảy lá một hoa - *Paris polyphylla* var. *Chinensis* Smith.” plant. 6
CAO NGỌC ANH, LÊ QUANG THẢO, ĐỖ THỊ HÀ, THÁI NGUYỄN HÙNG THU
- Study on determination of Vildagliptin in human plasma by LC-MS/MS method. 12
PHAN THỊ NGHĨA, TRẦN THỊ NGÀ, LÊ THỊ LA, PHẠM THANH HUYỀN, HOÀNG VĂN ĐỨC, TẠ MẠNH HÙNG
- Synthesis and purification of Diclofenac impurity A meet the quality as raw materials to establish impurity standard. 18
LÊ THỊ THU, NGUYỄN THỊ QUỲNH GIANG, PHẠM VĂN QUANG, LÊ THỊ MỸ HOA, NGUYỄN VĂN GIANG, ĐOÀN CAO SƠN
- **Technical information – News**
- Substandard pharmaceuticals recalled from June 2020 to November 2020 on decision of Ministry of Health. 27
HÀ THỊ MINH CHÂU