

VIỆN KIỂM NGHIỆM THUỐC TRUNG ƯƠNG

ISSN 1859 - 0055

TẠP CHÍ

**KIỂM
NGHIỆM
thuốc**

JOURNAL OF DRUG QUALITY CONTROL

SỐ 4.2021

TẬP 19-SỐ 74

NATIONAL INSTITUTE OF DRUG QUALITY CONTROL

48 HAI BA TRUNG . HANOI - VIETNAM

TEL: 84.024.39363794 * FAX: 84.024.38256911 * E-MAIL: tapchiknt@nidqc.gov.vn

TẠP CHÍ KIỂM NGHIỆM THUỐC SỐ 4/2021

JOURNAL OF DRUG QUALITY CONTROL N^o 4/2021

XUẤT BẢN TỪ NĂM 2003

Tổng biên tập: PGS. TS. ĐOÀN CAO SƠN

Phó tổng biên tập: PGS. TS. TRỊNH VĂN LẬU

Thư ký biên tập: ThS. BÙI VĂN TRUNG

Trị sự: ThS. BÙI VĂN TRUNG

Hội đồng Biên tập:

- PGS. TS. ĐOÀN CAO SƠN
- TS. LÊ QUANG THẢO
- ThS. NGUYỄN ĐĂNG LÂM
- TS. TRẦN THỊ HỒNG ANH
- ThS. NGUYỄN TUẤN ANH
- ThS. BÙI VĂN TRUNG
- ThS. NGUYỄN VĂN HÀ
- ThS. TRẦN THÚY HẠNH
- ThS. LỤC THỊ THU HẰNG
- ThS. TRẦN HOÀNG
- ThS. NGUYỄN THỊ VĨNH HỒNG
- TS. NGUYỄN THỊ LIÊN
- ThS. NGUYỄN THỊ PHƯƠNG THẢO
- ThS. LÊ THỊ THU
- ThS. TRẦN THỊ BÍCH VÂN
- PGS. TS. TRẦN VIỆT HÙNG
- TS. TẠ MẠNH HÙNG
- PGS.TS. TRỊNH VĂN LẬU
- TS. LÊ THỊ HƯỜNG HOA
- TS. ĐẶNG VĂN KHÁNH
- PGS. TS. NGUYỄN THỊ KIỀU ANH
- TS. PHẠM QUỐC CHINH
- PGS. TS. LÊ THỊ HỒNG HẢO
- GS. TS. THÁI NGUYỄN HÙNG THU

In 1.000 cuốn khổ 19 x 27cm tại Công ty TNHH MTV In Tạp chí Cộng sản.

Giấy phép xuất bản số 333/GP-BTTTT ngày 23/8/2013 của Bộ Thông tin và Truyền thông.

In xong và nộp lưu chiểu tháng 01 năm 2022.

XÂY DỰNG QUY TRÌNH XÁC ĐỊNH GIỚI HẠN TẠP CHẤT LIÊN QUAN CỦA NGUYÊN LIỆU METHYL 2-METHOXY-5-SULFAMOYL BENZOAT (TẠP B CỦA SULPIRID) BẰNG PHƯƠNG PHÁP HPLC

NGUYỄN THỊ HỒNG*, NGUYỄN THỊ NGÂN

Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương

Từ khóa: Tạp chất liên quan, RP-HPLC, Methyl 2-methoxy-5-sulfamoylbenzoat

1. Đặt vấn đề

Sulpirid thuộc nhóm benzamid, có tác dụng chống rối loạn tâm thần và chống trầm cảm thông qua phong bế chọn lọc các thụ thể dopamin D2 ở não. Sulpirid được chỉ định trong điều trị tâm thần phân liệt cấp và mạn tính, trạng thái loạn thần cấp tính, điều trị rối loạn hành vi nặng ở trẻ em, đặc biệt trong hội chứng tự kỷ, là những bệnh mạn tính ngày càng phổ biến trong xã hội hiện đại [1]. Vì vậy, thời gian sử dụng thuốc tương đối kéo dài, do đó việc kiểm soát các tạp chất trong quá trình sản xuất, lưu thông trước khi đến người bệnh rất quan trọng, nhằm giảm thiểu các tác dụng phụ do các tạp chất liên quan của dược chất gây ra.

Tạp B của sulpirid là methyl 2-methoxy-5-sulfamoylbenzoat, là sản phẩm trung gian trong quá trình tổng hợp sulpirid và là một trong những tạp chất chính của sulpirid. Để kiểm soát chất lượng của nguyên liệu cũng như các chế phẩm chứa hoạt chất này, bên cạnh chất chuẩn sulpirid, Dược điển Anh, Dược điển Việt Nam và một số dược điển qui định sử dụng tạp B của sulpirid để đánh giá sự phù hợp của hệ thống sắc ký trong phép thử tạp chất liên quan của sulpirid bằng phương pháp HPLC.

Để cung cấp thêm nguồn chất chuẩn trong nước phục vụ công tác kiểm tra, giám sát chất lượng thuốc, nhóm nghiên cứu đã tiến hành tổng hợp tạp B của sulpirid từ nguyên liệu sulpirid. Trong đề tài này, chúng tôi đã xây dựng qui trình xác định tạp chất liên quan methyl 2-methoxy-5-sulfamoylbenzoat (tạp B của sulpirid) bằng kỹ thuật HPLC. Phương pháp này sẽ được sử dụng để xác định độ tinh khiết của tạp B của sulpirid để tiến tới thiết lập chuẩn tạp này.

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

Các thiết bị, dụng cụ đã được hiệu chuẩn theo quy định của ISO/IEC 17025 và GLP: Máy sắc ký lỏng hiệu năng cao Shimadzu, Cột phân tích: C8 (250 x 4,6 mm; 5 µm), Cân phân tích Mettler MS105, Cân phân tích Mettler PXE26, Cân kỹ thuật Sartorius, Máy đo pH Metrohm, Các thiết bị, dụng cụ khác: máy lắc siêu âm, các dụng cụ thủy tinh chính xác class A.

2.1.2. Hóa chất, chất chuẩn

- Hóa chất: methanol, acetonitril, kali dihydrophosphat dihydrat, natri 1-octansulfonat, acid phosphoric đạt tiêu chuẩn HPLC và PA; acid 2-methyl-5-sulfamoylbenzoic: là sản phẩm trung gian của quá trình tổng hợp tạp B của sulpirid.

- Chất chuẩn

+ Sulpirid chuẩn Viện kiểm nghiệm thuốc Trung ương, SKS: 0218285.02, hàm lượng: 99,77 % (NT)

+ Sulpiride impurity B EPRS batch 3.0

2.1.3. Đối tượng nghiên cứu

Methyl 2-methoxy-5-sulfamoylbenzoat (sulpirid tạp B), được tổng hợp và tinh chế từ nguyên liệu sulpirid.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Điều kiện sắc ký

Dựa trên các tài liệu tham khảo Dược điển Anh 2020, Dược điển Việt Nam V, CoA chuẩn tạp B của sulpirid (Mikromol)[2],[3],[5] và các trang thiết bị có sẵn, chúng tôi đã tiến hành khảo sát thành phần pha động, tỷ lệ pha

động, cột sắc ký, khảo sát bước sóng... nhóm nghiên cứu đã lựa chọn được điều kiện sắc ký như sau:

- Cột: C8 (250 x 4,6 mm; 5 μ m);
- Phát hiện: detector UV, bước sóng 240 nm;
- Tốc độ dòng: 1,5 ml/phút;
- Thể tích tiêm: 10 μ l;
- Thời gian chạy: 4 lần thời gian lưu của pic sulpirid tập B;
- Pha động: Dung dịch đệm pH 3,0 – methanol – acetonitril = 80 – 10 – 10.

(Dung dịch đệm pH 3,3: dung dịch kali dihydrophosphat 6,8 g/l và natri octansulfonat 1 g/l, điều chỉnh pH 3,3 bằng H_3PO_4 đậm đặc)

- Dung môi pha mẫu: Pha động.

2.2.2. Phương pháp xử lý mẫu

- *Dung dịch thử*: Cân chính xác khoảng 20 mg tập B của sulpirid, hòa tan trong 4 ml hỗn hợp dung môi methanol – acetonitril (1-1), thêm dung dịch đệm pH 3,3 vừa đủ 20,0 ml.

- *Dung dịch chuẩn*: Cân chính xác khoảng 5 mg chuẩn tập B của sulpirid, hòa tan trong 1 ml hỗn hợp dung môi methanol – acetonitril (1-1), thêm dung dịch đệm pH 3,3 vừa đủ 5,0 ml.

- *Dung dịch so sánh (a)*: Pha loãng 1,0 ml dung dịch thử thành 100,0 ml bằng pha động.

- *Dung dịch sulpirid*: Cân chính xác khoảng 1 mg chuẩn sulpirid, hòa tan bằng pha động vừa đủ 10,0 ml.

- *Dung dịch 2-methoxy-5-sulfomoyl benzoic acid*: Cân chính xác khoảng 1 mg 2-methoxy-5-sulfomoyl benzoic acid, hòa tan bằng pha động vừa đủ 10,0 ml.

- *Dung dịch so sánh (b)*: Cân chính xác khoảng 1 mg mỗi chất tập B của sulpirid và 2-methoxy-5-sulfomoyl benzoic acid hòa tan bằng pha động vừa đủ 10,0 ml.

- *Dung dịch Spike*: Cân chính xác khoảng 20 mg sulpirid tập B vào bình định mức 20 ml, hòa tan trong 1,6 ml hỗn hợp (methanol – acetonitril = 1-1), thêm chính xác 1,0 ml dung dịch sulpirid và 1,0 ml dung dịch 2-methoxy-5-sulfomoyl benzoic acid vào bình định mức, thêm dung dịch đệm pH 3,3 vừa đủ đến vạch.

- *Mẫu trắng*: Pha động

Kiểm tra tính thích hợp của hệ thống: Tiến hành sắc ký với dung dịch so sánh (b), thứ tự rửa giải của hai pic lần lượt là 2-methoxy-5-sulfomoyl benzoic acid, sulpirid tập B; hệ số phân giải giữa hai pic không được nhỏ hơn 3,0.

Tiêm 10 μ l các dung dịch chuẩn, dung dịch thử, dung dịch so sánh (a), dung dịch sulpirid, dung dịch 2-methoxy-5-sulfomoyl benzoic acid và dung dịch so sánh (b), dung dịch Spike vào hệ thống sắc ký. Ghi lại sắc ký đồ và đáp ứng của pic chính trong các dung dịch trên.

Do methyl 2-methoxy-5-sulfamoylbenzoat (tập B của sulpirid), được tổng hợp và tinh chế từ nguyên liệu sulpirid, với sản phẩm trung gian là 2-methoxy-5-sulfomoyl benzoic acid, nên chúng tôi xây dựng điều kiện kiểm tra tính thích hợp hệ thống sắc ký bằng hỗn hợp dung dịch tập B của sulpirid và 2-methoxy-5-sulfomoyl benzoic acid trong pha động với nồng độ 0,1 mg/ml mỗi chất. Yêu cầu độ phân giải giữa 2 pic $\geq 3,0$; hai pic tập B của sulpirid và 2-methoxy-5-sulfomoyl benzoic acid tách khỏi nhau hoàn toàn.

2.2.3. Giới hạn tạp chất

- Trên SKĐ thu được từ dung dịch thử, diện tích của bất kỳ pic phụ nào, ngoài pic chính, không được lớn hơn diện tích pic chính trong dung dịch so sánh (a) (1,0 %)

- Tổng diện tích của các pic phụ, ngoài pic chính, không được lớn hơn 2 lần diện tích pic chính trong dung dịch so sánh (a) (2,0 %)

2.2.3. Thẩm định phương pháp phân tích

Thẩm định phương pháp xác định giới hạn tạp chất theo hướng dẫn “validation of analytical procedures: Text and methodology Q2(R1)” của ICH 2005 với các tiêu chí: Độ đặc hiệu, độ thích hợp hệ thống, độ tuyến tính, giới hạn phát hiện, giới hạn định lượng, độ lặp lại [4].

3. Kết quả và bàn luận

3.1. Lựa chọn điều kiện sắc ký

Tiến hành sắc ký các dung dịch chuẩn, dung dịch thử, dung dịch sulpirid, dung dịch 2-methoxy-5-sulfomoyl benzoic acid, dung dịch Spike đã được xây dựng theo mục 2.2.1; sắc ký đồ thu được của các dung dịch thể hiện ở Hình 2, 3, 4, 5 và 6. Thứ tự rửa giải của 3 pic được xác định bằng cách tiêm dung dịch chuẩn đơn của từng chất, lần lượt là 2-methoxy-5-sulfomoyl benzoic acid, sulpirid tập B, sulpirid; sắc ký đồ cho thấy các pic tách rõ ràng, đối xứng, chân pic gọn. Như vậy việc lựa chọn các điều kiện sắc ký là phù hợp.

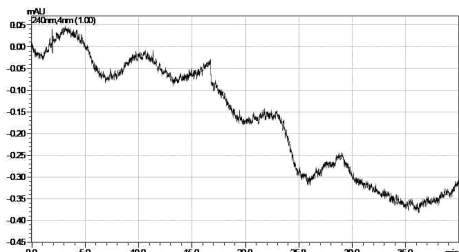
3.2. Thẩm định phương pháp

3.2.1. Độ đặc hiệu

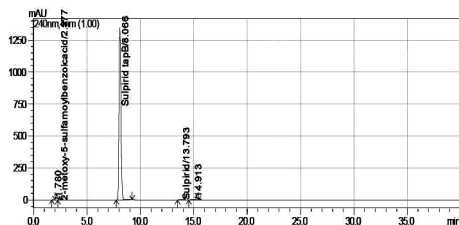
Tiêm lần lượt các dung dịch như sau: dung môi pha mẫu, dung dịch chuẩn tập B của sulpirid, dung dịch thử, dung dịch 2-methoxy-5-sulfomoyl benzoic acid, dung dịch sulpirid, dung dịch Spike vào hệ thống sắc ký. Trên sắc ký đồ thu được từ chương trình sắc ký, dung môi

pha mẫu không có pic đáp ứng, dung dịch thử tập B của sulpirid có thời gian lưu (khoảng 8,06 phút) tương ứng với pic tập B của sulpirid trong dung dịch chuẩn (khoảng 8,05 phút), pic chính trên SKĐ của dung dịch 2-methoxy-5-sulfomoyl benzoic acid có thời gian lưu 2,42 phút, pic chính trên SKĐ của dung dịch sulpirid có thời gian lưu 14,38 phút (**Hình 2, 3, 4, 5**). Các pic trong dung dịch Spike tách rõ ràng (Hệ số phân giải giữa 2 pic

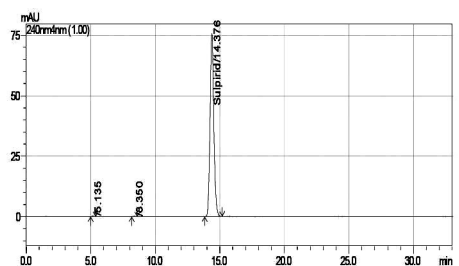
liền kề $R > 3,0$). Quét phổ hấp thụ tử ngoại khả kiến của các dung dịch chuẩn và dung dịch thử với detector UV cho thấy, quang phổ hấp thụ tử ngoại khả kiến của hoạt chất thu được từ dung dịch thử phù hợp với quang phổ hấp thụ tử ngoại khả kiến của pic chính thu được từ dung dịch chuẩn tương ứng, hệ số chồng phổ giữa chuẩn và thử đều xấp xỉ bằng 1,0 (**Hình 7**). Độ tinh khiết của pic chính trên SKĐ dung dịch thử bằng 0,999987 (**Hình 8**)



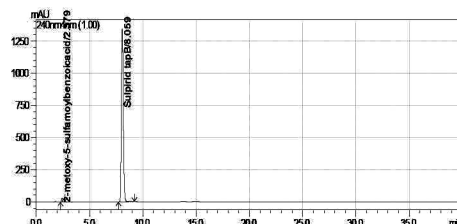
Hình 1. Sắc ký đồ dung môi pha mẫu



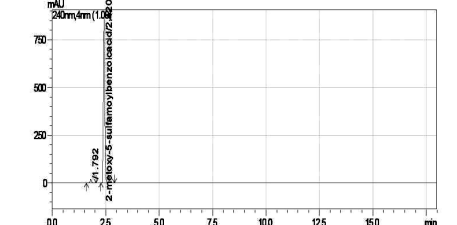
Hình 3. Sắc ký đồ dung dịch thử



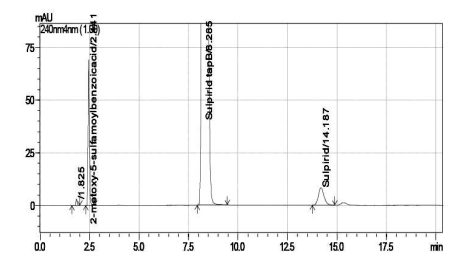
Hình 5. Sắc ký đồ dung dịch sulpirid



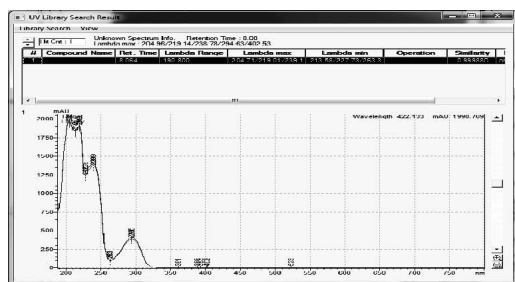
Hình 2. Sắc ký đồ dung dịch chuẩn



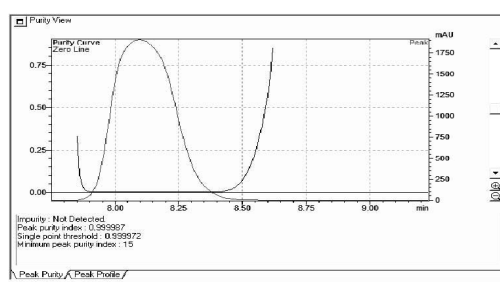
Hình 4. Sắc ký đồ dung dịch 2-methoxy-5-sulfomoyl benzoic acid



Hình 6. Sắc ký đồ dung dịch Spike



Hình 7. Hình ảnh chồng phổ UV – VIS chuẩn – thử của pic sulpirid tập B



Hình 8. Độ tinh khiết của pic sulpirid tập B trong dung dịch thử

Với các điều kiện sắc ký như trên và từ các kết quả thu được đã chứng tỏ quy trình phân tích đạt yêu cầu về độ đặc hiệu.

3.2.2. Tính thích hợp của hệ thống

Tính thích hợp của hệ thống sắc ký được xác định bằng cách tiêm lặp lại 6 lần dung dịch so sánh (a) và dung dịch so sánh (b). Ghi lại các giá trị về thời gian lưu, diện tích pic, độ cân xứng pic (T) và độ phân giải giữa 2 pic (R) trong dung dịch so sánh (b).

Kết quả:

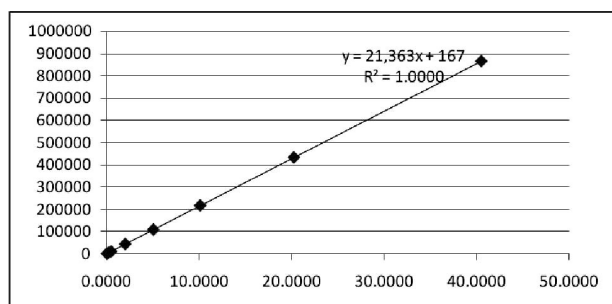
- Độ phân giải giữa 2 pic 2-methoxy-5-sulfomoyl benzoic acid và sulpirid tap B trên sắc ký đồ dung dịch so sánh (b) là $26,0 > 3,0$.

- Các số liệu thu được cho thấy giá trị RSD của thời gian lưu pic tap B của sulpirid là $0,39\% (< 1,0\%)$, RSD của diện tích pic tap B của sulpirid là $0,31\% (< 2,0\%)$, số đĩa lý thuyết $N = 11495 (> 1500)$, hệ số kéo đuôi $0,8 < T = 1,238 < 1,5$; độ phân giải $R = 26,0 > 3,0$. Quy trình phân tích đạt yêu cầu về độ thích hợp hệ thống.

3.2.3. Độ tuyến tính

Từ dung dịch chuẩn gốc tap B của sulpirid ($5,063 \text{ mg}/5,0 \text{ ml}$ pha động $\sim 1,0126 \text{ mg/ml}$), pha loãng thành các dung dịch tap B của sulpirid có các nồng độ khoảng 40; 20; 10; 5; 2; 0,5; 0,2 và $0,05 \text{ }\mu\text{g/ml}$ trong pha động. Với giới hạn cho phép của mỗi tap $\leq 1,0\%$ (tương ứng với nồng độ $10 \text{ }\mu\text{g/ml}$), giới hạn loại tap $< 0,1\%$ (tương ứng với nồng độ $1 \text{ }\mu\text{g/ml}$).

Tiến hành sắc ký các dung dịch chuẩn, ghi lại sắc ký đồ và đáp ứng của pic. Kết quả thể hiện ở hình sau:



Hình 11. Đồ thị biểu diễn mối tương quan tuyến tính giữa nồng độ tap B của Sulpirid và diện tích pic

Phương trình hồi quy: $y = 21363x + 167$

Hệ số tương quan: $r = 1,0000$

Hệ số chặn: $Y = 0,08\%$

Kết quả khảo sát cho thấy trong khoảng nồng độ từ $0,05 \text{ }\mu\text{g/ml}$ đến $40 \text{ }\mu\text{g/ml}$ (400% so với nồng độ giới

hạn tap), có sự liên quan chặt chẽ giữa nồng độ và diện tích pic, hệ số tương quan $r = 1,0000$, phần trăm hệ số chặn tại nồng độ 100% là $0,08\% < 2,0\%$

3.2.4. Giới hạn phát hiện

Từ kết quả khảo sát độ tuyến tính, tiến hành phân tích thống kê ANOVA với độ tin cậy 95% cho kết quả sau: độ lệch chuẩn số dư $\sigma = 170,1$; độ dốc đường chuẩn là **21363**, giá trị LOD và LOQ như sau:

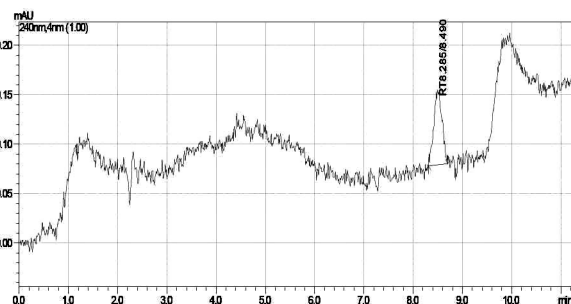
$$\text{LOD} = (3,3 \times 170,1)/21363 = 0,026 \text{ (}\mu\text{g/ml)};$$

$$\text{LOQ} = 3 \times \text{LOD} = 0,080 \text{ (}\mu\text{g/ml)}$$

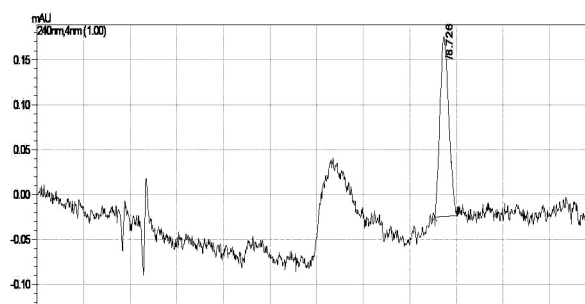
Thực nghiệm xác nhận sự phù hợp các giá trị LOD và LOQ:

- Dung dịch LOD: Cân $6,512 \text{ mg}$ chuẩn sulpirid tap B vào bình định mức 50 ml . Hòa tan và thêm vừa đủ bằng pha động. Hút $1,0 \text{ ml}$ dung dịch này pha loãng với pha động vừa đủ 100 ml . Tiếp tục hút chính xác 1 ml dung dịch thu được vào bình định mức 50 ml , thêm pha động vừa đủ đến vạch. Lắc đều, lọc qua màng $0,45 \text{ }\mu\text{m}$.

- Dung dịch LOQ: Cân $6,512 \text{ mg}$ chuẩn sulpirid tap B vào bình định mức 50 ml . Hòa tan và thêm vừa đủ bằng pha động. Hút $3,0 \text{ ml}$ dung dịch này pha loãng với pha động vừa đủ 100 ml . Tiếp tục hút chính xác 1 ml dung dịch thu được vào bình định mức 50 ml , thêm pha động vừa đủ đến vạch. Lắc đều, lọc qua màng $0,45 \text{ }\mu\text{m}$.



Hình 12. SKĐ tap B của sulpirid tại nồng độ LOD



Hình 13. SKĐ tap B của sulpirid tại nồng độ LOQ

Nhận xét: Giá trị LOD, LOQ có nồng độ rất nhỏ so với nồng độ giới hạn mỗi tap (1% ; $\approx 10 \text{ }\mu\text{g/ml}$); tỷ số

tín hiệu /nhiều (S/N) của dung dịch LOD 5,5 (>3); giá trị RSD của diện tích pic trong dung dịch LOQ là 4,15 % (< 10,0 %), tỷ số tín hiệu /nhiều (S/N) của dung dịch LOQ là 11 (> 10). Như vậy, phương pháp đạt yêu cầu về giới hạn phát hiện và giới hạn định lượng.

3.2.5. Độ lặp lại

Khảo sát trên 6 dung dịch thử, với các điều kiện sắc ký như đã chọn trong mục 2.2.1. Kết quả được ghi trong **Bảng 1**.

Bảng 1. Kết quả thẩm định độ lặp lại

Mô tả	Thử 1		Thử 2		Thử 3		Thử 4		Thử 5		Thử 6		Trung bình
Lượng cân (mg)	20,02		20,12		20,39		20,08		20,27		20,05		
TB diện tích pic dung dịch đối chiếu	195477		204676,5		209186,5		202110,5		208374		201759		
T _R tap (Phút)	S _{tap} (mAU)	% tap	S _{tap} (mAU)	% tap	S _{tap} (mAU)	% tap	S _{tap} (mAU)	% tap	S _{tap} (mAU)	% tap	S _{tap} (mAU)	% tap	
1,79	8538	0,044	8628	0,042	8957	0,043	8414	0,042	8761	0,042	8419	0,042	
2,40	119513	0,611	123342	0,603	126410	0,604	121372	0,601	126319	0,606	119828	0,594	0,603
13,85	8703	0,045	9164	0,045	9424	0,045	8824	0,044	9472	0,045	8319	0,041	0,044
14,97	24493	0,125	25312	0,124	26081	0,125	24326	0,120	24972	0,120	24020	0,119	0,122
Tổng tap	0,825		0,813		0,817		0,806		0,814		0,796		0,812

Kết quả phân tích cho thấy, lô nguyên liệu tap B của sulpirid xuất hiện 04 tap, trong đó xuất hiện 2 tap có thời gian lưu phù hợp với thời gian lưu của 2-methoxy-5-sulfomoyl benzoic acid (2,4 phút – sản phẩm trung gian của quá trình tổng hợp) và sulpirid (13,85 phút – sản phẩm đầu vào của quá trình tổng hợp). Hàm lượng mỗi tap < 1,0 %, tổng các tap < 2,0 %; % RSD của tổng tap: 1,21 % (< 5,0 %). Do đó phương pháp đạt yêu cầu về độ lặp lại.

4. Kết luận

Nghiên cứu đã xây dựng được quy trình xác định

giới hạn tap chất liên quan của nguyên liệu tap B của sulpirid bằng kỹ thuật sắc ký lỏng hiệu năng cao trên cột pha đảo với pha động đệm pH 3,3 – methanol – acetonitril (80 : 10 : 10). Phương pháp sử dụng cột PR 8 (250 x 4,6 mm, 5 µm); tốc độ dòng 1,5 ml/phút; thể tích tiêm 10 µl; detector 240 nm. Phương pháp đã được áp dụng để xác định tap chất liên quan của lô nguyên liệu tap B của sulpirid đã tổng hợp được. Kết quả đã xác định được 04 tap ≤ 0,60 %, tổng tap 0,81 %, đạt yêu cầu về giới hạn của tap chất liên quan của nguyên liệu tap B của sulpirid.

Tài liệu tham khảo

1. Bộ Y tế (2015), *Dược thư quốc gia Việt nam*, Lần xuất bản thứ hai, Nhà xuất bản Y học, tr.1314 – 1316.
2. Bộ Y tế (2017), *Dược điển Việt Nam V*, Nhà xuất bản Y học.
3. The British Pharmacopeial Convention (2020), *British Pharmacopoeia*
4. International Conference on Harmonization, ICH (2005), “Validation of Analytical Procedures: Text and methodology Q2(R1)”, *International Conference on Harmonization*. Geneva, Switzerland, November.
5. <https://www.lgcstandards.com/PL/en/Methyl-2-Methoxy-5-sulphamoylbenzoate/p/MM0051.02-0025>

SUMMARY

A reversed-phase HPLC method for determination of the related substance limit in sulpirid impurity B was introduced. The chromatographic separation was done in a Phenomenex Gemini C8 (250 × 4.6 mm, 5µm) column using a mixture of 10 volumners of acetonitrile, 10 volumners of methanol, 80 volumners of a solution containing 6.8 g/L of potassium dihydrogenphosphate and 1 g/L of sodium octanesulfonate, previously adjusted to pH 3.3 with phosphoric acid as mobile phase. Flow rate was maintained at 1.5 ml/min, DAD was installed at 240 nm, and injection volume was 10 µl. The method was fully validated about specificity, system suitability, linearity, LOD, LOD and precision. The results showed that the developed method was suitable for determining the limit of related substances in sulpirid impurity B.

(Ngày nhận bài: 20/09/2021; Ngày phản biện: 22/09/2021; Ngày duyệt đăng: 16/11/2021)

ĐÁNH GIÁ ĐỘ TÍNH CẤP VÀ BÁN TRƯỜNG DIỄN CỦA THỰC PHẨM CHỨC NĂNG THẤP DIỆU NANG TÂM BÌNH

NGUYỄN THỊ LIÊN*, NGUYỄN THỊ HẰNG

Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương

Từ khóa: Thấp diệu nang Tâm Bình, độ tính cấp, độ tính bán trường diễn

1. Đặt vấn đề

Đau nhức xương khớp là tình trạng xuất hiện ở cả người lớn lẫn người trẻ tuổi, đặc biệt là khi thay đổi thời tiết. Tuy không ảnh hưởng trực tiếp tới tính mạng nhưng những cơn đau nhức lại gây ra sự khó chịu, khó khăn trong sinh hoạt ảnh hưởng đến chất lượng cuộc sống người bệnh. Việc sử dụng các thuốc giảm đau từ tân dược có thể làm giảm các cơn đau nhức nhanh, nhưng lạm dụng trong thời gian dài sẽ gây ra nhiều tác dụng phụ bất lợi cho sức khỏe. Do đó nhu cầu tìm đến các sản phẩm có nguồn gốc đông dược, dược liệu để giảm đau xương khớp ngày càng tăng. Trước thực tế này và với nguồn tài nguyên dược liệu phong phú, đa dạng, các công ty dược phẩm trong nước đã sản xuất rất nhiều các sản phẩm giảm đau xương khớp có nguồn gốc từ thảo dược. Để góp phần xây dựng nguyên tắc để đánh giá tính an toàn, hiệu quả, tạo điều kiện đánh giá thống nhất kết quả nghiên cứu, Bộ y tế đã ban hành hướng dẫn “Thử nghiệm tiền lâm sàng và lâm sàng thuốc Đông y, thuốc từ dược liệu” (ban hành kèm theo Quyết định số 141/QĐ-K2ĐT ngày 27/10/2015) [2], trong đó độ tính cấp và độ tính bán trường diễn là những chỉ tiêu cần cần đánh giá. Trong nghiên cứu này chúng tôi tiến hành đánh giá độ tính cấp và độ tính bán trường diễn của sản phẩm giảm đau xương khớp có nguồn gốc dược liệu được phân phối rộng rãi trên thị trường đó là thực

phẩm chức năng Thấp diệu nang Tâm Bình do công ty TNHH SX & TM Dược phẩm Tâm Bình sản xuất.

2. Thực nghiệm

2.1. Thiết bị, dụng cụ, hóa chất

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

2.2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Động vật thí nghiệm

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

Thỏ trưởng thành khỏe mạnh, cả 2 giống (đực và cái), cân nặng 1,8 - 2,2 kg, đạt tiêu chuẩn thí nghiệm do Viện kiểm nghiệm thuốc Trung ương cung cấp.

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

2.2.2. Thuốc nghiên cứu

Thực phẩm chức năng “Thấp diệu nang Tâm Bình” do công ty TNHH SX & TM Dược phẩm Tâm Bình sản xuất, lô sản xuất: 16042020, hạn dùng: 16/04/2023. Thành phần: Độc hoạt, đương quy, tục đoạn, cốt toái bổ, đỗ trọng, thiên niên kiện, bạch chỉ, uy linh tiên, thương truat, quế nhục, mã tiền chế, phụ liệu khác.

2.2.3. Phương pháp nghiên cứu

* Thử độc tính cấp [1], [2], [3]

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

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

Chuẩn bị mẫu thử: Cân chính xác một lượng bột thuốc trong nang. Nghiền kỹ mẫu thử trong cối sứ, cho nước cất từ từ vào, khuấy trộn thành hỗn dịch đồng nhất, sau đó thêm nước vừa đủ để thu được hỗn dịch chứa 0,2 g mẫu thử/ml nước (hỗn dịch thử).

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

Theo dõi biểu hiện của chuột (về thể trạng, hành vi, vận động, tình trạng ăn, uống, phân, nước tiểu...) sau khi uống trong 24 giờ đầu và theo dõi hoạt động của chuột trong thời gian 7 ngày sau khi uống.

* Thử độc tính bán trường diễn [2], [5], [6]

Nghiên cứu độc tính bán trường diễn được tiến hành trên 3 nhóm thỏ gồm 1 nhóm chứng và 2 nhóm thử, mỗi nhóm 7 con. Hai nhóm thử được cho uống mẫu thử với liều 0,373 viên/kg thỏ (6 ml hỗn dịch B/kg thỏ) và liều 1,118 viên/kg thỏ (6 ml hỗn dịch A/kg thỏ). Nhóm chứng: cho uống nước hàng ngày (dùng để tham chiếu). Thời gian uống liên tục 28 ngày.

Mẫu thử: Chuẩn bị 2 hỗn dịch có nồng độ khác nhau. Hỗn dịch A (nồng độ 0,186 viên/ml): Nghiền lượng bột thuốc có trong 30 viên mẫu thử trong cối sứ, cho nước cất từ từ vào, khuấy trộn thành hỗn dịch đồng nhất, sau đó thêm nước vừa đủ 161 ml hỗn dịch A. Hỗn dịch B (nồng độ 0,062 viên/ml): Lấy 40 ml hỗn dịch A thêm 80 ml nước, trộn đều thu được 120 ml hỗn dịch B.

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

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

3. Kết quả và bàn luận

3.1. Độc tính cấp

Trước tiên chúng tôi tiến hành nghiên cứu sơ bộ để tìm mức liều không làm chết chuột thí nghiệm và mức liều làm chết 100 % số chuột thí nghiệm. Qua thử nghiệm này, chúng tôi đã tìm được liều không gây chết chuột là 2,0 g mẫu thử/kg chuột, liều gây chết 100 % số chuột thử nghiệm là 6,0 g mẫu thử/kg chuột.

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

Bảng 1. Số liệu thử độc tính cấp viên Thấp diệu nang Tâm Bình

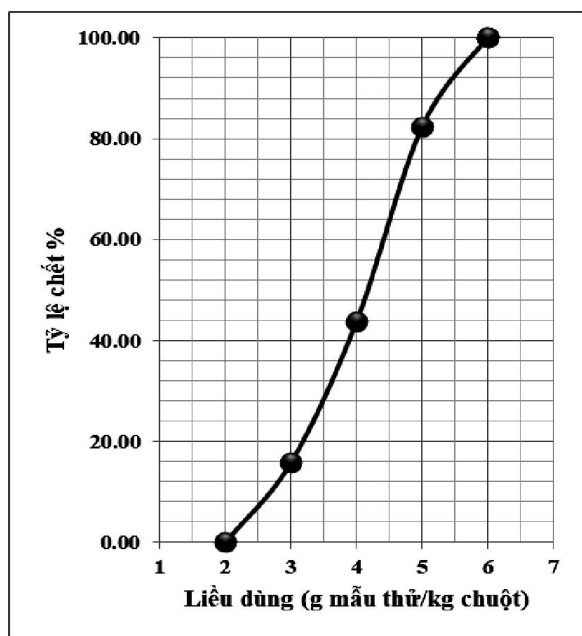
Mức liều	Liều thử (g mẫu thử/kg chuột)	Số chuột chết/ sống thực tế	Số chuột chết/ sống kỳ vọng	% Chết
1	2,0	0/10	0/26	0
2	3,0	3/7	3/16	15,79
3	4,0	4/6	7/9	43,75
4	5,0	7/3	14/3	82,35
5	6,0	10/0	24/0	100

Sau khi uống thuốc, chuột có các biểu hiện ngộ độc tùy theo mức liều uống. Ở mức liều thấp (2,0 g/kg chuột) không nhận thấy có biểu hiện ngộ độc, ở mức liều trong khoảng từ 3,0 g đến 6,0 g mẫu thử/kg chuột, chuột có biểu hiện mệt mỏi, số chuột chết có biểu hiện co giật, chuột bị chết trong khoảng thời gian từ 3 phút đến 30 phút sau khi uống hỗn dịch thử. Số chuột không chết ở các mức liều trên có biểu hiện giảm hoạt động, mệt mỏi. Sau 24 giờ, số

chuột không chết ăn uống hoạt động bình thường trở lại. Các dấu hiệu ngộ độc cấp tính trên ở chuột nhất là các dấu hiệu ngộ độc điển hình của strychnin, một hoạt chất chính của dược liệu mã tiền chế có trong thực phẩm chức năng Thấp diệu nang Tâm Bình.

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

Hình 1. Đồ thị số liệu độc tính cấp



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

Trong đó: k: Hệ số Behrens = 0,66

n: Số chuột trong mỗi nhóm,

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

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

Theo đồ thị, ta có: LD_{16} = 3,0 g mẫu thử/kg chuột, LD_{84} = 5,1 g mẫu thử/kg chuột.

Giá trị s = $(5,1 - 3,0)/2$ = 1,05 g mẫu thử/kg chuột.

Sai số chuẩn: (ES_{LD50})² = ksd / n = 0,66 x 1,05 x 1,0/10 nên S_{LD50} = 0,26 g mẫu thử/kg chuột

Vậy LD_{50} = $(4,16 \pm 0,26)$ g mẫu thử/kg chuột.

3.2. Độc tính bán trường diễn

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

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

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

Trong đó:

A: Liều gây chết a % ĐVTN

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

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

d: khoảng cách giữa các liều (g)

Dựa trên bảng số liệu ta có:

a = 43,75 %

b = 82,35 %

A = 4,0 (g/kg chuột)

d = 1,0 (g/kg chuột)

Như vậy:

$$LD_{50} = 4,0 + (50 - 43,75) \times 1,0 / (82,35 - 43,75)$$

$$LD_{50} = 4,16 \text{ g mẫu thử/kg chuột.}$$

phẩm viên Thấp diệu nang Tâm Bình dựa trên liều sử dụng tối đa trên người là 6 viên/người/ngày) và sử dụng hệ số chuyển đổi liều giữa thỏ và người là 3,1 [6] để lựa chọn 2 mức liều thử nghiệm là 0,373 viên/kg thỏ (tương ứng với mức liều dự kiến cho người là 6 viên/người 50 kg/ngày) và 1,118 viên/kg thỏ (cao gấp 3 lần liều dự kiến cho người).

3.2.1. Kết quả theo dõi cân nặng thỏ

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

Bảng 2. Số liệu cân nặng thỏ

Nhóm (n=7)	Kết quả cân nặng (kg)					P
	Trước TN (m_0)	Sau 1 tuần (m_1)	Sau 2 tuần (m_2)	Sau 3 tuần (m_3)	Sau 4 tuần (m_4)	
Chứng (C)	1,99 ± 0,17	2,10 ± 0,15	2,19 ± 0,20	2,29 ± 0,19	2,37 ± 0,12	$P_{\text{trước-sau}} < 0,05$
% so với trước thử nghiệm		105,7 %	110,3 %	115,3 %	119,5 %	
Thử 1 (T1)	1,98 ± 0,14	2,09 ± 0,11	2,20 ± 0,12	2,27 ± 0,14	2,37 ± 0,14	$P_{\text{trước-sau}} < 0,05$
% so với trước thử nghiệm		105,5 %	111,4 %	114,9 %	119,8 %	$P_{\text{trước}} (T1-C) > 0,05$ $P_{\text{sau}} (T1-C) > 0,05$
Thử 2 (T2)	2,00 ± 0,13	2,16 ± 0,11	2,27 ± 0,10	2,35 ± 0,11	2,44 ± 0,13	$P_{\text{trước-sau}} < 0,05$
% so với trước thử nghiệm		108,0 %	113,4 %	117,5 %	121,8 %	$P_{\text{trước}} (T2-C) > 0,05$ $P_{\text{sau}} (T2-C) > 0,05$

3.2.2. Kết quả theo dõi các chỉ số huyết học

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

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

Chỉ số Nhóm (n=7)		Hồng cầu (x 10^{12} / lít)	Bạch cầu (x 10^9 / lít)	Tiểu cầu (x 10^9 / lít)	Hematocrit (%)	Hemoglobin (g/dL)
Chứng	Trước TN	6,4 ± 0,6	7,2 ± 2,1	512,3 ± 80,0	43,0 ± 3,3	13,1 ± 1,1
	Giữa TN	6,0 ± 0,4	8,9 ± 1,5	493,9 ± 125,7	40,7 ± 1,6	12,5 ± 0,8
	Sau TN	6,2 ± 0,6	8,7 ± 2,9	498,0 ± 102,3	40,9 ± 3,4	13,0 ± 1,0
Thử 1	Trước TN	6,1 ± 0,2	8,3 ± 2,1	503,9 ± 96,9	40,6 ± 3,7	12,4 ± 0,8
	P_{C-T1}	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05
	Giữa TN	6,1 ± 0,7	9,3 ± 1,6	472,1 ± 89,4	40,6 ± 1,8	12,4 ± 0,9
	P_{C-T1}	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05
	Sau TN	6,1 ± 0,2	9,3 ± 2,0	490,6 ± 89,9	40,9 ± 2,0	12,9 ± 0,5
	P_{C-T1}	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05
Thử 2	Trước TN	6,2 ± 0,7	8,9 ± 2,3	518,0 ± 121,0	41,7 ± 3,7	12,6 ± 1,2
	P_{C-T2}	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05
	Giữa TN	6,0 ± 0,5	8,8 ± 0,9	486,4 ± 99,2	40,5 ± 1,8	12,5 ± 0,5
	P_{C-T2}	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05
	Sau TN	6,0 ± 0,5	9,0 ± 1,4	497,1 ± 102,4	41,0 ± 1,9	12,9 ± 0,7
	P_{C-T2}	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05

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

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

Bảng 4. Kết quả theo dõi các chỉ số sinh hóa (gan, thận) thỏ của các nhóm thử nghiệm

Chỉ số Nhóm (n = 7)		AST (U/lit)	ALT (U/lit)	Bilirubin toàn phần ($\mu\text{mol/lit}$)	Protein toàn phần (g/lit)	Cholesterol (mmol/l)	Creatinin ($\mu\text{mol/l}$)	Urea (mmol/l)
Chứng	Trước TN	24,1 $\pm$ 8,3	69,9 $\pm$ 16,2	1,6 $\pm$ 0,4	55,7 $\pm$ 4,0	1,8 $\pm$ 0,4	86,1 $\pm$ 13,1	4,8 $\pm$ 1,1
	Giữa TN	32,8 $\pm$ 15,6	68,5 $\pm$ 17,9	1,7 $\pm$ 0,5	56,9 $\pm$ 4,7	1,7 $\pm$ 0,6	90,7 $\pm$ 12,3	4,3 $\pm$ 0,8
	Sau TN	25,6 $\pm$ 10,3	71,1 $\pm$ 17,0	1,2 $\pm$ 0,3	60,7 $\pm$ 3,6	2,3 $\pm$ 0,9	93,9 $\pm$ 16,6	4,7 $\pm$ 1,1
Thử 1	Trước TN	28,1 $\pm$ 11,7	63,0 $\pm$ 14,6	1,4 $\pm$ 0,3	55,7 $\pm$ 3,0	2,0 $\pm$ 0,9	79,9 $\pm$ 10,4	4,8 $\pm$ 0,4
	P_{C-T1}	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05
	Giữa TN	38,2 $\pm$ 10,4	60,6 $\pm$ 6,7	1,7 $\pm$ 0,7	57,5 $\pm$ 3,8	2,1 $\pm$ 0,5	91,7 $\pm$ 8,4	4,1 $\pm$ 0,6
	P_{C-T1}	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05
	Sau TN	28,2 $\pm$ 10,9	63,1 $\pm$ 11,2	1,2 $\pm$ 0,2	61,1 $\pm$ 5,2	1,8 $\pm$ 0,6	95,5 $\pm$ 6,0	5,1 $\pm$ 0,3
	P_{C-T1}	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05
Thử 2	Trước TN	28,6 $\pm$ 12,1	65,0 $\pm$ 13,0	1,5 $\pm$ 0,3	55,9 $\pm$ 3,2	1,8 $\pm$ 0,5	83,0 $\pm$ 12,4	5,1 $\pm$ 0,8
	P_{C-T2}	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05
	Giữa TN	39,2 $\pm$ 13,6	73,2 $\pm$ 16,4	2,3 $\pm$ 1,0	54,6 $\pm$ 7,1	2,1 $\pm$ 0,2	89,2 $\pm$ 6,1	3,7 $\pm$ 0,5
	P_{C-T2}	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05
	Sau TN	36,6 $\pm$ 12,6	75,8 $\pm$ 18,0	1,3 $\pm$ 0,3	61,4 $\pm$ 1,5	2,1 $\pm$ 0,8	92,6 $\pm$ 7,7	4,3 $\pm$ 0,8
	P_{C-T2}	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05

3.2.4. Quan sát đại thể

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

3.2.5. Quan sát vi thể

Lấy mẫu tiêu bản gan, thận trên 3 thỏ ngẫu nhiên trong từng nhóm thí nghiệm và nhóm chứng, tiêu bản quan sát vi thể. Tiêu bản gan và thận được cố định bằng Formalin 10 %, nhuộm bằng dung dịch nhuộm Hematoxylin eosin (HE) và Perioric acid Shiff (PAS) và quan sát dưới kính hiển vi điện tử độ phóng đại 100 và 400. Các thỏ thử nghiệm đều có gan và thận không bị tổn thương, hình ảnh cấu trúc trong giới hạn bình thường. Không có các triệu chứng bất thường liên quan đến mẫu thử với 2 mức liều khác nhau so với nhóm chứng.

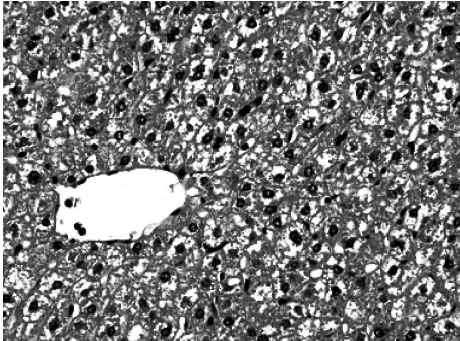
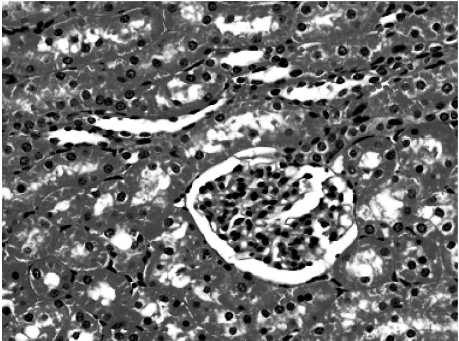
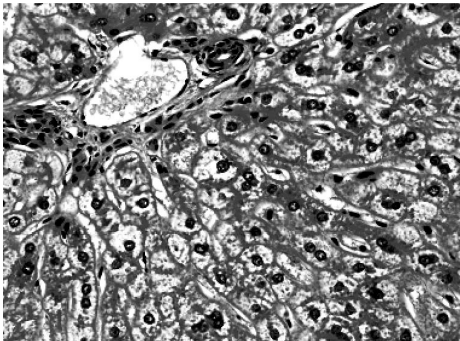
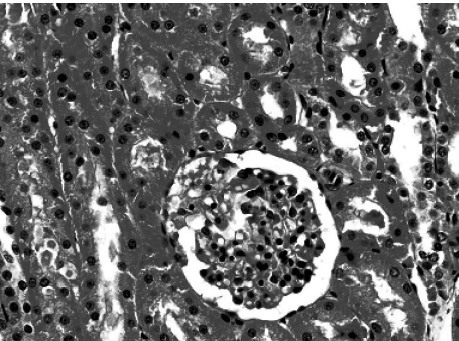
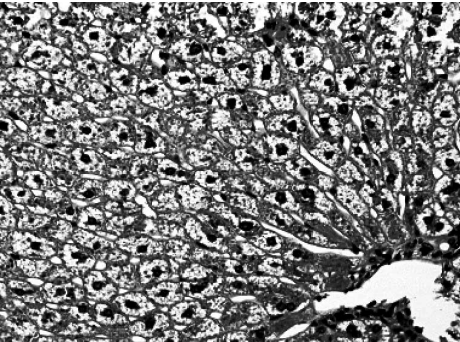
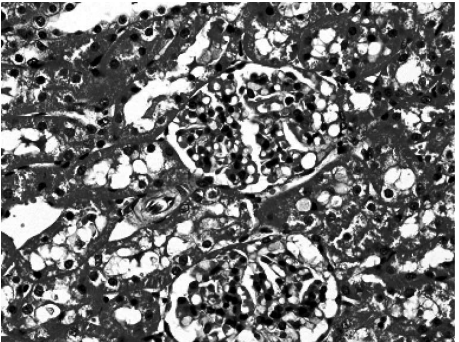
Cấu trúc gan không bị đảo lộn, nhận rõ các tiểu thùy với tĩnh mạch trung tâm và các bè gan xấp xếp hướng tâm. Các tế bào gan hình tròn hay đa diện, có nhân nhỏ, đều nhau, không thấy hoại tử, không thấy xâm nhập viêm. Một

số tế bào gan thoái hóa có khả năng hồi phục (bao gồm thoái hóa nước và thoái hóa hạt), một số tế bào lắng đọng glycogen trong bào tương. Các khoảng cửa không tăng sinh xơ, không tăng sinh ống mật, không thấy xâm nhập tế bào viêm (Bảng 7, 8).

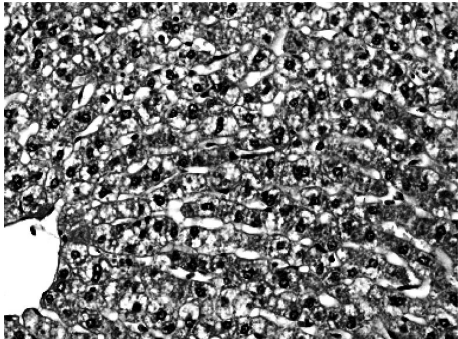
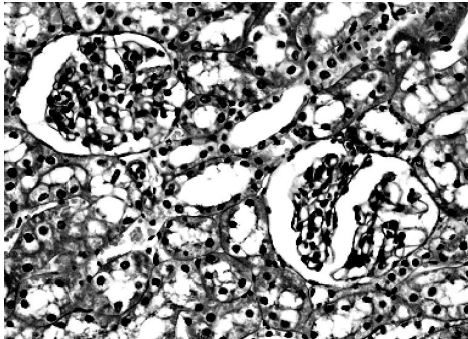
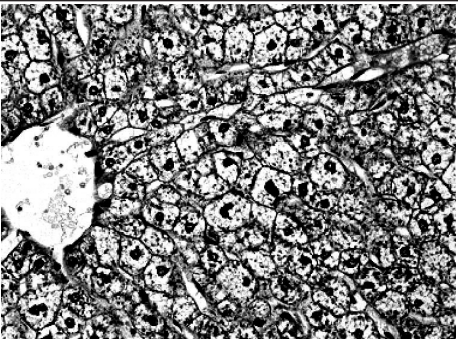
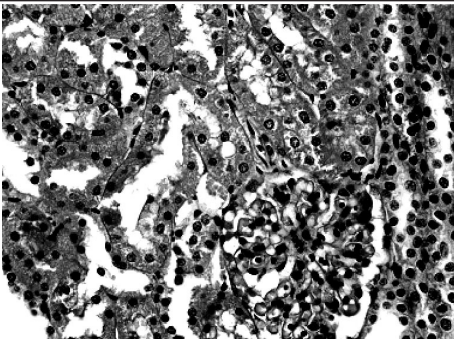
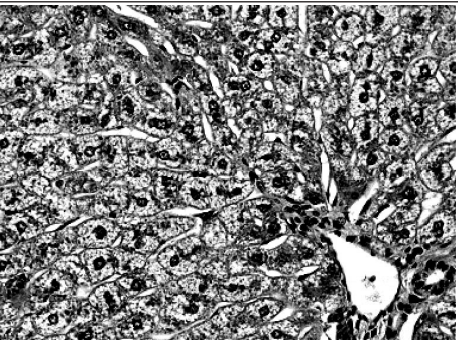
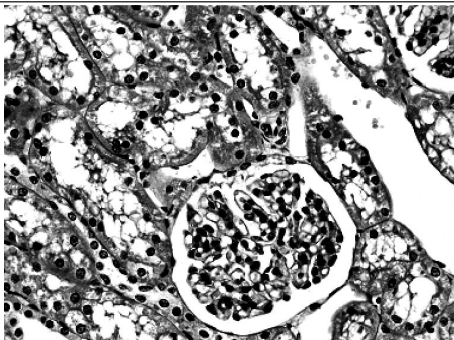
Các cầu thận và ống thận có hình thái, cấu trúc trong giới hạn bình thường. Cầu thận không bị xơ hóa, không

tăng sinh các tế bào cuộn mạch, tế bào có chân; khoang Bowman rõ, màng đáy cầu thận không dày. Các tế bào ống thận không thoái hóa, không hoại tử. Mô kẽ không tăng sinh xơ, không xâm nhập viêm. Các tế bào ống thận không lắng đọng glycogen, màng đáy ống thận không dày (Bảng 5, 6).

Bảng 5. Hình ảnh giải phẫu mô bệnh học gan và thận
(Hình ảnh nhuộm HE, Độ phóng đại 400 lần)

STT	Nhóm	Hình ảnh mô gan	Hình ảnh mô thận
1	Chứng	 Mô gan bình thường, không thấy tổn thương.	 Mô thận bình thường, không thấy tổn thương.
2	Thử 1 (liều thấp)	 Mô gan bình thường, không thấy tổn thương.	 Mô thận bình thường, không thấy tổn thương.
3	Thử 2 (liều cao)	 Mô gan bình thường, không thấy tổn thương.	 Mô thận bình thường, không thấy tổn thương.

Bảng 6. Hình ảnh giải phẫu mô bệnh học gan và thận
(Hình ảnh nhuộm PAS, Độ phóng đại 400 lần)

STT	Nhóm	Hình ảnh mô gan	Hình ảnh mô thận
1	Chứng	 Mô gan bình thường, không thấy tổn thương.	 Mô thận bình thường, không thấy tổn thương.
2	Thử 1 (liều thấp)	 Mô gan bình thường, không thấy tổn thương.	 Mô thận bình thường, không thấy tổn thương.
3	Thử 2 (liều cao)	 Mô gan bình thường, không thấy tổn thương.	 Mô thận bình thường, không thấy tổn thương.

Từ kết quả đánh giá độc tính bán trường diễn của thực phẩm chức năng Thấp diệu nang Tâm Bình với các thành phần: độc hoạt, đương quy, tục đoạn, cốt toái bồ, đỗ trọng, thiên niên kiện, bạch chỉ, uy linh tiên, thương truật, quế nhục, mã tiền chế và các phụ liệu khác cho thấy sản phẩm có tính an toàn cao khi sử dụng theo đúng liều hướng dẫn. Mặc dù ở thử nghiệm độc tính cấp sản phẩm có tính độc điển hình của mã tiền khi dùng liều cao, tuy nhiên ở liều thử lâm sàng và liều cao gấp 3 lần liều lâm sàng dùng

hàng ngày trong 28 ngày, sản phẩm không gây ảnh hưởng xấu tới các chỉ số sinh hóa, các chỉ số huyết học cũng như mô gan thận của động vật thí nghiệm.

Kết luận

Kết quả thu được trong nghiên cứu này cho thấy mẫu thử viên Thấp diệu nang Tâm Bình có $LD_{50} = (4,16 \pm 0,26)$ g mẫu thử/kg chuột. Theo phân loại độc tính của GHS [3], mẫu thử viên viên Thấp diệu nang Tâm Bình thuộc nhóm có độc tính thấp (Category 5).

Khi cho thỏ uống mẫu thử với 2 mức liều là 0,373 viên/kg thỏ/ngày (tương ứng với mức liều tối đa dùng cho người là 6 viên/người/ngày) và mức liều 1,118 viên/kg thỏ/ngày (cao gấp 3 lần so với liều tối đa dùng cho người), trong 28 ngày không, màu sắc của các tổ chức tim, gan, thận, phổi và hệ tiêu hóa khi quan sát đại thể cũng như cấu trúc của gan, thận khi quan sát vi thể của thỏ giữa nhóm chứng và 2 nhóm thử.

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

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Đỗ Trung Đàm (2014), *Phương pháp xác định độc tính cấp của thuốc*, Nhà xuất bản Y học, Hà Nội, tr.40-48.
2. Hướng dẫn thử nghiệm tiền lâm sàng thuốc Đông y, thuốc từ dược liệu (Ban hành kèm theo Quyết định số 141/QĐ-K2ĐT ngày 27/10/2015 của Bộ Y tế), tr.1-20.
3. Behrens B. and Kaber G. (1983), *Mathematics for Naturalists and Agriculturalists*, PWN, Warszawa, p.218.
4. The United Nations Economic Commission for Europe (UNECE), GHS 9th Edition (2021), *Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS)*, p.115
5. Organization for Economic Cooperation and Development, OECD 407 (2008), *OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4: Health Effects, Test No. 407: Repeated dose 28 - days Oral Toxicity study in Rodents*, p.1-13.
6. Sharma V. and McNeill J. H. (2009), To scale or not to scale: The principles of dose extrapolation, *British Journal of Pharmacology*, 157, p.907-921.

SUMMARY

“Thập diệp nang Tâm Bình” capsules manufactured by Tâm Bình Pharmaceutical Trading Production Company Limited, was evaluated for acute and subchronic toxicity in mice and rabbits, respectively. The acute toxicity results indicated that LD_{50} of “Thập diệp nang Tâm Bình” in mice according to the method of Behrens is (4.16 ± 0.26) g/kg body weight for single dose oral administration, classified as low acute toxicity by GHS. In the repeated - dose toxicity study, rabbits were administered “Thập diệp nang Tâm Bình” with the doses of 0.373 capsules and 1.118 capsules/kg/day for 28 days (equivalent to the dose using on human and the dose of 3 times more than one using on human). Blood sample were taken on day 0, day 14 and day 28 of experiment for hematological, biochemical exams. Liver and kidney samples were taken on day 28 for histopathological determinations. After 14 and 28 days, blood and tissue samples were taken for hematological, biochemical and histopathological determinations. The repeated dose toxicity results revealed that there were no significant differences in hematological and serum biochemical values between control and treatment animals. Furthermore, no histopathological changes in the liver and kidney of rabbits treated with “Thập diệp nang Tâm Bình” were observed.

(Ngày nhận bài: 30/11/2021; Ngày phản biện: 24/12/2021; Ngày duyệt đăng: 30/12/2021)

NGHIÊN CỨU XÂY DỰNG QUY TRÌNH XÁC ĐỊNH KIM LOẠI NẶNG TRONG MỸ PHẨM BẰNG KHỐI PHỔ PLASMA CẢM ỨNG (ICP-MS)

TRẦN ĐỨC LAI*, NGUYỄN VĂN HÀ, ĐOÀN CAO SƠN
Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương

Từ khóa: Kim loại nặng, phổ khối plasma cảm ứng, ICP-MS

1. Đặt vấn đề

Theo các quy định về quản lý mỹ phẩm trong Thông tư 06/2011/TT-BYT [1] và của Asean [2], các kim loại nặng như chì (Pb), Cadmi (Cd), thủy ngân (Hg) và arsen (As) có thể có trong mỹ phẩm ở một giới hạn rất nhỏ và

được quy định rõ ràng. Vì vậy, để kiểm soát chất lượng mỹ phẩm về mặt giới hạn kim loại nặng đòi hỏi các phòng thử nghiệm phải xây dựng được các quy trình phân tích có độ chính xác cao và giới hạn phát hiện đủ thấp để xác định các kim loại nặng trong mẫu.

Phương pháp phổ khối plasma cảm ứng (ICP-MS) có nhiều ưu điểm như: giới hạn phát hiện thấp, đo đồng thời các nguyên tố nên giảm thời gian đo, giảm chi phí khi đo nhiều nguyên tố hoặc nhiều mẫu trên một lần bật máy, giảm ảnh hưởng của nền mẫu nhờ nhiệt độ cao của nguồn ICP [3], nên đang được sử dụng rộng rãi để xác định các kim loại trong các nền mẫu khác nhau. Để góp phần phục vụ công tác kiểm tra chất lượng mỹ phẩm nhanh chóng, kịp thời, chính xác..., trong bài báo này chúng tôi giới thiệu kết quả nghiên cứu xây dựng phương pháp xác định kim loại nặng (As, Cd, Hg, Pb) trong mẫu mỹ phẩm bằng ICP-MS.

2. Nguyên vật liệu và phương pháp nghiên cứu

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

2.1.1. Thiết bị, dụng cụ

Thiết bị và dụng cụ phân tích được hiệu chuẩn theo quy định của ISO/IEC 17025 và GLP gồm: máy ICP-MS Agilent 7900, cân phân tích Mettler Toledo có độ chính xác 0,1 mg, thiết bị vô cơ hóa mẫu bằng vi sóng Anton Paar, các dụng cụ thủy tinh có độ chính xác phù hợp.

2.1.2. Hóa chất, chất chuẩn

* **Chất chuẩn:** Các chuẩn nguyên tố được sử dụng như đưa ra trong Bảng 1.

Bảng 1. Các chuẩn nguyên tố được sử dụng trong nghiên cứu

Chuẩn nguyên tố	Nguồn gốc	Lô
As 1000 mg/l	Inorganic Venture	N ₂ -AS669249
Cd 1000 mg/l	Inorganic Venture	N ₂ -CD665483
Hg 1000 mg/l	Inorganic Venture	N ₂ -HG669550
Pb 1000 mg/l	Inorganic Venture	N ₂ -PB666052
Chuẩn nội hỗn hợp (100 µg/l: Bi, Ge, In, Li ⁶ , Lu, Rh, Sc, Tb)	Agilent	54-080CRY2

* **Dung môi, hóa chất:** acid nitric (Merck), acid hydrochloric (Merck), nước oxy già 30 % (Merck), nước khử ion (điện trở suất $\geq 18,3$ M Ω .cm) đạt độ tinh khiết dùng cho ICP-MS.

2.2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

2.2.1. *Đối tượng nghiên cứu:* Các mẫu kem, phấn, son và dầu gội đầu..

2.2.2. Phương pháp nghiên cứu

- Khảo sát đưa ra hỗn hợp thuốc thử và chương trình vô cơ hóa mẫu phù hợp bằng lò vi sóng.
- Khảo sát đưa ra quy trình phân tích Pb, As, Hg và Cd trong các nền mẫu mỹ phẩm bằng ICP-MS.
- Thẩm định quy trình phân tích trên các tiêu chí: sự phù hợp của hệ thống, tính đặc hiệu, độ chính xác, độ tuyến tính và khoảng xác định, độ đúng, giới hạn phát hiện và giới hạn định lượng.
- Các kết quả thực nghiệm được tính toán và xử lý thống kê trên Microsoft Excel 2016.

3. Kết quả và bàn luận

3.1. Khảo sát xây dựng quy trình

3.1.1. Lựa chọn hỗn hợp thuốc thử vô cơ hóa mẫu

Tham khảo các tài liệu [4] cho thấy khi đo các kim loại nặng bằng AAS, hỗn hợp acid nitric và nước oxy già thường được sử dụng để vô cơ hóa mẫu. Tuy nhiên khi phân tích bằng ICP-MS, đối với thủy ngân ở ngưỡng nồng độ thấp, để ổn định tín hiệu đo, cần thêm chất ổn định thích hợp [5] và acid hydrochloric ở mức nồng độ 0,5 – 1 % thường được lựa chọn [6][7][8].

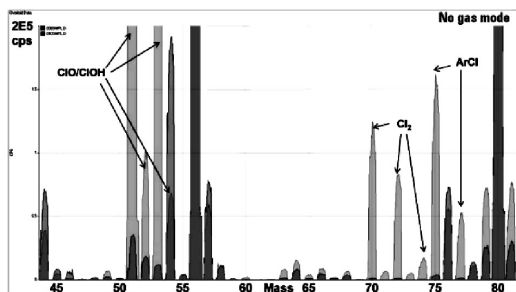
Qua khảo sát cho thấy khi sử dụng hỗn hợp acid nitric: acid hydrochloric : nước oxy già (5:1:1), phá mẫu trong lò vi sóng, mẫu thu được được vô cơ hóa hoàn toàn, cho dung dịch trong sau khi lọc, cho tín hiệu đo thủy ngân ổn

định. Vì vậy lựa chọn hỗn hợp acid nitric : acid hydrocloric : nước oxy già (5:1:1) là thuốc thử vô cơ hóa, phá mẫu trong lò vi sóng với chương trình nhiệt độ như chỉ ra trong Bảng 2.

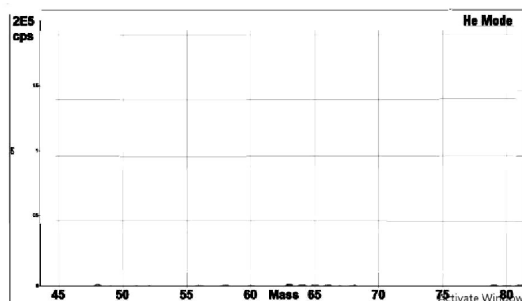
3.1.2. Khảo sát lựa chọn chế độ đo

Khi có mặt Cl^- , tạo thành ArCl^- gây ra nhiễu đa nguyên tử với As [7]. Để loại bỏ ảnh hưởng của ion Cl^- , tiến hành khảo sát chế độ đo No Gas và He mode, kết quả như được trình bày trong Hình 1.

Hình 1a cho thấy trong nền HCl khi sử dụng chế độ đo No Gas, xuất hiện các tín hiệu của nhiễu đa nguyên tử của Cl^- như Cl_2 , ArCl ...; Hình 1b cho thấy khi sử dụng chế độ đo He mode phần lớn các nhiễu đa nguyên tử từ Cl^- đã được loại bỏ. Do vậy lựa chọn chế độ đo He Mode cho những bước tiếp theo.



a. Chế độ No Gas



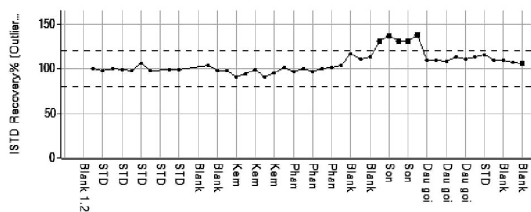
b. Chế độ He mode

Hình 1. So sánh ảnh hưởng nhiễu đa nguyên tử từ nền HCl trong 2 chế độ đo khác nhau

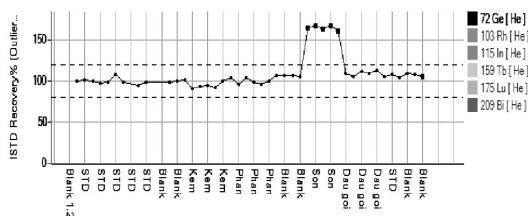
3.1.3. Khảo sát lựa chọn chuẩn nội

Lựa chọn các nguyên tố không có trong nền mẫu, tín hiệu đáp ứng ổn định trong khoảng 80 đến 120 % so với giá trị ban đầu trong nền mẫu trắng. Các nguyên tố lựa chọn khảo sát để làm chuẩn nội: Ge (72), Rh (103), In (105), Tb (159), Lu (175), Bi (209) ở mức nồng độ 20 ng/ml.

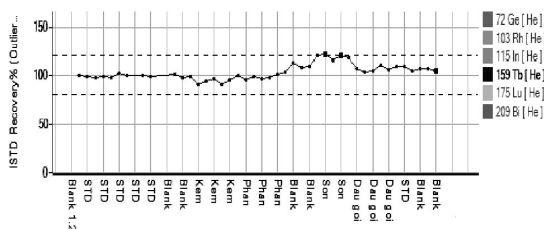
Kết quả thu được như ở Hình 2: Hình 2a, Hình 2b, Hình 2c cho thấy tín hiệu chuẩn Bi, Ge, Tb trong nền mẫu thử vượt quá 120 % so với trong nền mẫu trắng ban đầu. Hình 2d cho thấy 3 nguyên tố Rh (103), In (115), Lu (175) cho tín hiệu đáp ứng ổn định đáp ứng yêu cầu làm nội chuẩn. Tham khảo tài liệu, chọn Rh (103) làm nội chuẩn cho những nghiên cứu tiếp theo.



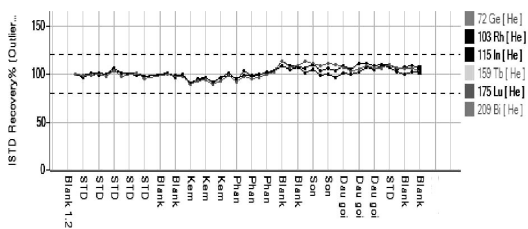
a. Độ thu hồi Bi trong các nền mẫu



b. Độ thu hồi của Ge trong các nền mẫu



c. Độ thu hồi Tb trong các nền mẫu



d. Độ thu hồi Rh, In, Lu trong các nền mẫu

Hình 2. Độ thu hồi các chuẩn nội khảo sát trong 4 nền mẫu

3.2. Quy trình phân tích

Theo quy định trong thông tư số 06/2011/TT-BYT của Bộ Y Tế, và của Asean, giới hạn cho phép của các kim loại nặng trong mỹ phẩm: $As \leq 5 \text{ ppm}$, $Cd \leq 5 \text{ ppm}$, $Hg \leq 1 \text{ ppm}$, $Pb \leq 20 \text{ ppm}$ [1], [2]. Từ kết quả khảo sát, tham khảo tài liệu, chúng tôi đưa ra quy trình thử như sau:

3.2.1. Chuẩn bị mẫu thử

Cân chính xác khoảng 0,2 g mẫu vào cốc phá mẫu. Thêm 5 ml acid nitric đặc, 1 ml acid hydrochloric, 1 ml nước oxy già 30 %. Cài đặt và chạy chương trình phá mẫu trong lò vi sóng như trong Bảng 2:

Bảng 2. Chương trình vô cơ hóa mẫu trong lò vi sóng

Giai đoạn	Thời gian (Phút)	Nhiệt độ (°C)	Công suất (W)	Áp suất (bar)
1	10	120	1000	20
2	5	120 - 150	1000	30
3	10	150	1000	30
4	10	150 - 200	1000	30
5	5	200	1000	30

Khi quá trình vô cơ hóa mẫu kết thúc, để nguội về nhiệt độ phòng. Chuyển dung dịch mẫu ra bình định mức 50 ml, tráng rửa 3 lần với nước khử ion. Thêm nước khử ion đến vạch, lắc đều. Lọc dung dịch mẫu qua màng lọc 0,45 µm vào vial đựng mẫu của máy ICP-MS.

3.2.2. Chuẩn bị mẫu chuẩn hỗn hợp

- Dung dịch pha loãng: Trong bình định mức 500 ml, trộn 250 ml nước khử ion, 50 ml acid nitric đặc, 10 ml acid hydrochloric đặc, 10 ml nước oxy già đặc, vừa đủ thể tích bằng nước khử ion.

- Pha loãng và phối hợp các chuẩn gốc nguyên tố bằng dung dịch pha loãng để được các chuẩn làm việc có nồng độ như Bảng 3:

Bảng 3. Nồng độ chuẩn làm việc

Dung dịch	Nồng độ các nguyên tố
Chuẩn 1	5,0 µg/l As; 5,0 µg/l Cd; 1,0 µg/l Hg; 20,0 µg/l Pb
Chuẩn 2	10,0 µg/l As; 10,0 µg/l Cd; 2,0 µg/l Hg; 40,0 µg/l Pb
Chuẩn 3	20,0 µg/l As; 20,0 µg/l Cd; 4,0 µg/l Hg; 80,0 µg/l Pb
Chuẩn 4	40,0 µg/l As; 40,0 µg/l Cd; 8,0 µg/l Hg; 160,0 µg/l Pb
Chuẩn 5	50,0 µg/l As; 50,0 µg/l Cd; 10,0 µg/l Hg; 200,0 µg/l Pb

3.2.3. Chuẩn bị chuẩn nội

Dùng dung dịch chứa 20 ng/ml Rh pha trong dung dịch pha loãng làm chuẩn nội.

3.2.4. Điều kiện phân tích

- Tiến hành tối ưu hóa các thông số của thiết bị trước mỗi lần phân tích. Chọn số khối: As (75), Cadimi (111/114), thủy ngân (201/202), chì (206/207/208).

- Cài đặt các thông số đo, lựa chọn số khối và chế độ đo như trong Bảng 4.

Bảng 4. Điều kiện lựa chọn và cài đặt cho thiết bị phân tích

Thông số	Cài đặt
Calibration method	External Calibration
Plasma mode	General Purpose
Buồng phun	Làm lạnh hai lần bằng nước
Nhiệt độ buồng phun (°C) (S/C temp)	2
Điểm thời gian tích phân/ms (Peak pattern)	3
Điểm trên pic	3
Lần lặp lại	3
Chuẩn nội	Rh (103)
Chế độ đo	He Mode

Đo phổ khối plasma của các dung dịch chuẩn, dung dịch thử. Nồng độ các kim loại nặng trong dung dịch thử được ngoại suy từ đường chuẩn.

3.3. Đánh giá quy trình

3.3.1. Tính đặc hiệu

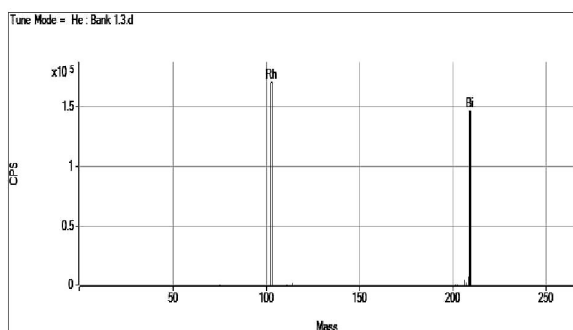
Tiến hành đo phổ khối theo điều kiện đã chọn các mẫu sau:

- Mẫu trắng là dung dịch pha loãng
- Dung dịch mẫu nền (placebo) là mẫu nền mẫu phân, son môi, kem, dầu gội đầu (đã được kiểm tra xác định là không chứa Pb, Cd, Hg, As) được xử lý theo mục 3.2.1.
- Mẫu chuẩn hỗn hợp các nguyên tố: 20 ppb As, 20 ppb Cd, 4 ppb Hg, 80 ppb Pb.
- Các mẫu tự tạo: thêm chính xác một lượng chuẩn hỗn hợp vào các nền mẫu khảo sát để thu được nồng độ cuối cùng: 20 ppb As, 20 ppb Cd, 4 ppb Hg, 80 ppb Pb, xử lý theo quy trình.

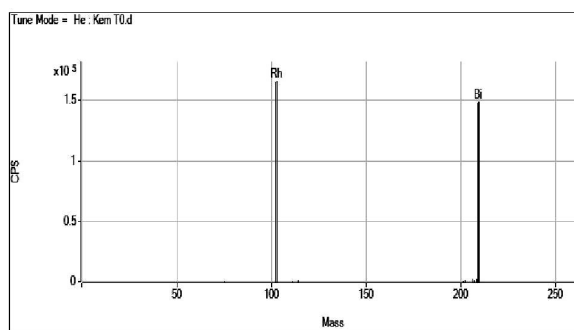
Kết quả thu được như hình 2 cho thấy:

- Hình 2a và Hình 2b: Phổ khối của mẫu trắng và các mẫu nền chỉ xuất hiện pic của nguyên tố chuẩn nội, không xuất hiện pic hoặc xuất hiện nhưng có phần trăm đáp ứng so với mẫu chuẩn không đáng kể (nhỏ hơn 2 %) ở số mass của As (75), Cd (111/114), Hg (201/202), Pb (206/207/208).

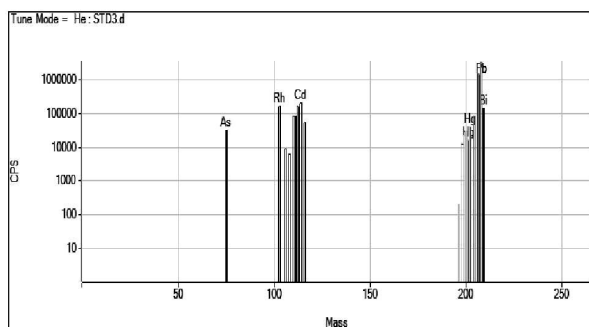
Hình 2c và Hình 2d: Mẫu tự tạo xuất hiện các pic có số mass của As (75), Cd (111/114), Hg (201/202), Pb (206/207/208) tương đương với mẫu chuẩn.



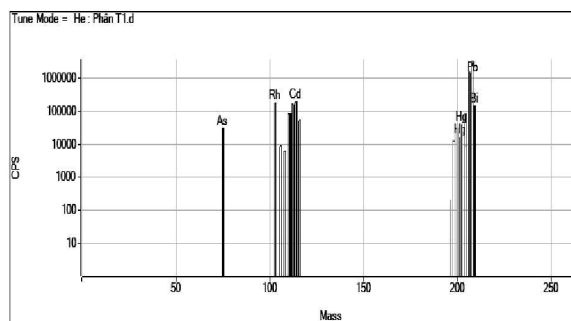
a. Phổ của mẫu trắng



b. Phổ đại diện của nền mẫu (mẫu kem)



c. Phổ của mẫu chuẩn hỗn hợp



d. Phổ của mẫu tự tạo

Hình 2. Phổ khối của các mẫu đánh giá độ đặc hiệu

Quy trình xây dựng là đặc hiệu để phân tích các kim loại nặng trong mẫu mỹ phẩm.

3.3.2. Khoảng tuyến tính

Chuẩn bị các chuẩn hỗn hợp làm việc như mục 3.2.2. Tiến hành đo phổ khối plasma của các dung dịch chuẩn. Thu được kết quả như ở Bảng 2.

Kết quả thu được cho thấy có sự tương quan tuyến tính chặt chẽ giữa tỷ lệ đáp ứng chuẩn/chuẩn nội và nồng độ các nguyên tố trong khoảng nồng độ khảo sát với hệ số tương quan đều lớn hơn 0,9990, phần trăm hệ số chặn (Y-intercept (%)) đều nhỏ hơn 0,2.

Bảng 5. Kết quả khảo sát độ tuyến tính của phương pháp

Nguyên tố	Phương trình tuyến tính	Nguyên tố	Phương trình tuyến tính
As (75)	Y = 0,0091 X - 6,6303E ⁻⁵ R = 0,9996 Y- intercept (%) = 0,04 %	Cd (111)	Y = 0,0230 X - 2,8385E ⁻⁵ R = 0,9996 Y- intercept (%) = 0,006 %
Cd (114)	Y = 0,0570 X + 2,9384E ⁻⁴ R = 0,9997	Hg (201)	Y = 0,0240 X - 7,4025E ⁻⁵ R = 0,9995 Y- intercept (%) = 0,025 %
Hg (202)	Y = 0,0547 X - 1,3446E ⁻⁴ R = 0,9994 Y- intercept (%) = 0,06 %	Pb (206)	Y = 0,1133 X + 0,0105 R = 0,9993 Y- intercept (%) = 0,11 %
Pb (207)	Y = 0,0993 X + 0,0076 R = 0,9994 Y- intercept (%) = 0,09 %	Pb (208)	Y = 0,4471 X + 0,0365 R = 0,9995 Y- intercept (%) = 0,1 %

3.3.3. Độ đúng

Độ đúng được đánh giá trên mẫu tự tạo: Thêm chính xác một lượng chuẩn các nguyên tố vào nền mẫu tại ở 4 mức nồng độ khác nhau: mức LOQ (2,0 ng/ml As; 2,0 ng/ml Cd; 0,4 ng/ml Hg; 8,0 ng/ml Pb), mức 50 %, mức 100 %, mức 200 % của nồng độ định lượng (20,0 ng/ml As; 20,0 ng/ml Cd; 4,0 ng/ml Hg; 80,0 ng/ml Pb). Tiến hành xử lý mẫu theo quy trình phân tích, mỗi nồng độ thực hiện 3 lần. Kết quả tỷ lệ phần trăm thu hồi thể hiện ở Bảng 6.

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

Nền mẫu	Mức đánh giá	Tỷ lệ thu hồi trung bình/RSD (%)							
		As (75)	Cd (111)	Cd (114)	Hg (201)	Hg (202)	Pb (206)	Pb (207)	Pb (208)
Mẫu Phần	LOQ	107,97/ 3,66	105,42/ 4,04	99,53/ 3,56	108,08/ 12,78	104,67/ 7,81	108,05/ 3,04	110,75/ 2,16	112,70/ 3,54
	50 %	106,59/ 3,37	106,03/ 3,49	106,0/ 3,29	108,27/ 3,74	108,45/ 3,26	109,34/ 3,40	109,84/ 3,24	108,66/ 2,90
	100 %	101,37/ 0,85	100,92/ 0,64	100,69/ 0,51	103,88/ 0,33	103,58/ 0,82	104,38/ 1,12	105,34/ 0,65	104,27/ 0,85
	200 %	105,6/ 2,52	105,2/ 1,68	105,2/ 1,51	106,8/ 1,28	107,1/ 1,37	106,8/ 1,27	106,6/ 1,25	106,5/ 1,44
Mẫu Sơn	LOQ	110,43/ 6,84	104,53/ 6,48	96,05/ 1,64	131,67/ 3,52	133,50/ 3,20	109,49/ 6,02	112,78/ 2,90	113,23/ 3,28
	50 %	100,55/ 0,41	100,72/ 0,47	101,84/ 0,18	109,53/ 3,12	103,95/ 3,43	108,22/ 1,79	108,29/ 2,04	107,75/ 1,72
	100 %	102,88/ 1,85	102,81/ 2,39	103,24/ 1,82	104,74/ 1,61	105,10/ 1,48	106,51/ 1,65	106,25/ 1,49	106,47/ 2,08
	200 %	105,0/ 4,83	104,0/ 3,90	104,1/ 3,98	109,3/ 4,18	108,5/ 3,90	104,4/ 1,89	104,5/ 1,83	104,6/ 1,54
Mẫu Kem	LOQ	107,30/ 6,94	104,17/ 1,82	95,25/ 4,91	105,17/ 2,16	110,83/ 7,55	108,31/ 4,31	110,29/ 3,38	109,84/ 3,97
	50 %	97,43/ 1,00	105,44/ 4,89	105,79/ 4,42	108,18/ 3,86	106,58/ 4,04	104,87/ 1,02	105,05/ 1,01	104,86/ 1,43
	100 %	102,19/ 2,77	102,82/ 2,32	103,41/ 2,44	108,24/ 2,49	108,05/ 2,73	107,50/ 2,95	110,01/ 2,52	108,97/ 2,47
	200 %	102,72/ 1,28	101,89/ 0,52	102,12/ 0,71	105,46/ 0,37	105,30/ 0,62	105,78/ 1,13	105,04/ 1,25	105,31/ 0,96
Mẫu Dầu gội đầu	LOQ	110,85/ 5,96	102,27/ 3,87	100,45/ 2,48	116,00/ 14,91	109,67/ 11,33	109,00/ 4,41	112,09/ 3,54	112,82/ 3,68
	50 %	94,56/ 1,04	96,33/ 3,08	94,55/ 0,84	99,38/ 2,48	98,85/ 2,54	108,94/ 2,43	106,61/ 1,76	101,23/ 0,31
	100 %	95,78/ 1,00	94,32/ 2,07	94,52/ 1,06	98,79/ 5,27	98,86/ 1,92	104,09/ 1,55	108,77/ 1,39	100,54/ 1,22
	200 %	99,03/ 1,97	96,46/ 2,77	94,76/ 2,87	97,81/ 3,48	100,62/ 1,77	99,73/ 2,74	98,98/ 1,98	99,18/ 1,63

Kết quả cho thấy phương pháp có độ đúng đạt yêu cầu ở tất cả các đồng vị lựa chọn trên 4 nền mẫu với tỷ lệ thu hồi từ 94,32 đến 133,50 % và RSD từ 0,18 đến 14,91 %. Theo USP đối với quy trình xác giới hạn kim loại, yêu cầu về độ thu hồi trong khoảng 70 đến 150 % và độ lặp lại (RSD) không quá 20 % tại mỗi mức nồng độ [8].

3.3.4. Độ chính xác

Độ lặp lại được tiến hành trên 6 mẫu tự tạo tại mức nồng độ 100 % so với nồng độ định lượng dự kiến. Chuẩn bị mẫu theo quy trình phân tích. Kết quả được đánh giá trên độ lệch chuẩn tương đối của hàm lượng kim loại nặng trong mẫu, yêu cầu độ lệch chuẩn không quá 20 % (n = 6) [8].

Độ chính xác trung gian được đánh giá trên 12 mẫu tự tạo được phân tích bởi 2 kiểm nghiệm viên ở 2 ngày khác nhau, yêu cầu độ lệch chuẩn không quá 25 % (n = 12) [8]. Các kết quả thu được như ở Bảng 7.

Bảng 7. Kết quả khảo sát độ chính xác của phương pháp trên 4 nền mẫu

Nền mẫu	Kiểm nghiệm viên (KNV)	Phần trăm tìm lại trung bình/RSD (%)							
		As (75)	Cd (111)	Cd (114)	Hg (201)	Hg (202)	Pb (206)	Pb (207)	Pb (208)
Mẫu phần	KNV 1 (n = 6)	100,08/ 3,18	99,43/ 3,09	99,73/ 3,04	102,03/ 3,36	101,05/ 3,06	101,11/ 2,88	100,65/ 2,86	100,79/ 2,92
	KNV 2 (n=6)	96,74/ 2,80	96,43/ 3,55	96,36/ 2,93	100,68/ 2,89	100,51/ 2,99	99,71/ 3,08	99,12/ 2,91	99,32/ 2,91
	Độ chính xác trung gian (n = 12)	98,41/ 3,37	97,93/ 3,55	98,04/ 3,37	101,35/ 3,07	100,78/ 2,90	100,41/ 2,93	99,89/ 2,86	100,05/ 2,88
Mẫu Sơn	KNV 1 (n = 6)	105,41/ 4,92	105,76/ 5,04	105,49/ 5,06	104,62/ 4,83	104,93/ 4,67	108,62/ 5,00	110,69/ 5,20	109,77/ 4,97
	KNV 2 (n = 6)	98,86/ 2,86	98,36/ 2,65	98,28/ 2,82	102,50/ 3,05	102,58/ 3,19	101,58/ 2,68	101,29/ 2,50	101,38/ 2,54
	Độ chính xác trung gian (n = 12)	102,13/ 5,14	102,06/ 5,45	101,89/ 5,43	103,56/ 4,01	103,76/ 4,01	105,10/ 5,24	105,99/ 6,12	105,57/ 5,66
Mẫu Kem	KNV 1 (n = 6)	110,23/ 3,86	104,89/ 3,51	105,46/ 3,35	104,58/ 2,75	105,07/ 3,09	104,26/ 3,20	105,26/ 2,60	105,17/ 2,75
	KNV 2 (n = 6)	99,42/ 2,38	99,44/ 2,55	99,66/ 2,65	103,27/ 2,87	103,41/ 2,76	102,69/ 2,40	102,53/ 2,71	102,71/ 2,54
	Độ chính xác trung gian (n = 12)	104,82/ 6,23	102,17/ 4,05	102,56/ 4,14	103,93/ 2,76	104,24/ 2,92	103,47/ 2,81	103,9/ 2,88	103,94/ 2,81
Mẫu Dầu gội đầu	KNV 1 (n = 6)	107,02/ 1,72	108,6/ 2,58	106,77/ 2,45	111,23/ 5,89	111,63/ 6,56	110,89/ 4,38	107,4/ 4,77	108,58/ 4,46
	KNV 2 (n = 6)	106,47/ 2,27	105,66/ 2,61	103,47/ 2,19	104,05/ 1,31	103,68/ 1,47	103,03/ 1,56	104,26/ 0,88	103,75/ 1,93
	Độ chính xác trung gian (n = 12)	106,75/ 1,94	107,13/ 2,86	105,12/ 2,76	107,64/ 5,45	107,66/ 6,07	106,96/ 5,01	105,83/ 3,66	106,16/ 4,09

Kết quả cho thấy:

- Phương pháp có độ chính xác đạt yêu cầu đưa ra, độ lặp lại RSD (n = 6) từ 0,88 đến 6,56 %; độ chính xác trung gian RSD (n = 12) từ 1,94 đến 6,23 %.

- Độ chính xác của các đồng vị khác nhau của cả 4 nguyên tố trong các nền mẫu khảo sát là tương tự nhau.

3.3.5. Giới hạn phát hiện (LOD), giới hạn định lượng (LOQ), Khoảng xác định của phương pháp

- Tiến hành phân tích các mẫu nền (phần, son, kem, dầu gội đầu). Phân tích 10 lần song song, tính độ lệch chuẩn. Tính LOD, LOQ của phương pháp theo công thức:

$$LOD = \frac{3,3 * SD}{a}; LOQ = \frac{10 * SD}{a}$$

Trong đó: SD là độ lệch chuẩn của tín hiệu đo; a là độ dốc của đường chuẩn.

- Từ khoảng tuyến tính, độ đúng suy ra khoảng xác định của phương pháp đối với từng kim loại nặng.

- Kết quả thu được giới hạn phát hiện và giới hạn định lượng như Bảng 8:

Bảng 8. LOD, LOQ, khoảng xác định của phương pháp

Nguyên tố	LOD		LOQ		Khoảng xác định	
	Dung dịch đo (ppb)	Mẫu (ppm)	Dung dịch đo (ppb)	Mẫu (ppm)	Dung dịch đo (ppb)	Trong mẫu (ppm)
Asen	0,67	0,17	2,0	0,5	2,0 – 40	0,5 – 10
Cadimi	0,67	0,17	2,0	0,5	2,0 – 40	0,5 – 10
Thủy ngân	0,14	0,04	0,4	0,1	0,4 – 8	0,1 – 2
Chì	2,67	0,70	8,0	2,0	8 – 160	2,0 – 40

3.4. Ứng dụng khảo sát hàm lượng kim loại nặng một số mẫu mỹ phẩm trên thị trường

Ứng dụng quy trình vừa xây dựng để kiểm tra hàm lượng kim loại nặng trên 30 mẫu mỹ phẩm trên thị trường. Kết quả cho thấy có 01 mẫu có hàm lượng thủy ngân vượt mức cho phép (1340,8 ppm Hg); các mẫu còn lại đều đạt yêu cầu về hàm lượng kim loại nặng (As, Cd, Hg, Pb).

4. Kết luận

Đề tài đã xây dựng được quy trình xác định các kim loại nặng (As, Cd, Hg, Pb) trong mỹ phẩm bằng ICP-MS. Trong đó đã khảo sát và đưa ra được các thông số

phân tích phù hợp, lựa chọn được hỗn hợp thuốc thử và chương trình vô cơ hóa mẫu trong lò vi sóng đảm bảo vô cơ hóa nền mẫu và tránh làm mất mẫu. Tiến hành thẩm định trên 4 nền mẫu là: phấn, son môi, kem, dầu gội đầu, kết quả thẩm định cho thấy phương pháp có độ lặp lại, độ đúng tương đối tốt, đáp ứng yêu cầu của phép đo ICP-MS; khoảng tuyến tính rộng, giới hạn phát hiện thấp, đáp ứng yêu cầu để xác định kim loại nặng (As, Cd, Hg, Pb) trong mỹ phẩm. Áp dụng quy trình xác định các kim loại nặng trong 30 mẫu mỹ phẩm trên thị trường kết quả phát hiện 01 mẫu chứa hàm lượng thủy ngân vượt quá mức cho phép theo quy định.

Tài liệu tham khảo

1. Bộ Y tế (2011), Quy định về quản lý mỹ phẩm, *Thông tư số 06/2011/TT-BYT*.
2. Asean (2003), *Hiệp định về hệ thống hoà hợp Asean trong quản lý mỹ phẩm (2003)*.
3. Phạm luận (2014), *Phương pháp phân tích phổ nguyên tử*. NXB Bách khoa, Hà Nội.
4. International Organization for Standardization (2014), “*Cosmetics - Analytical approach for screening and quantification methods for heavy metals in cosmetics*” (ISO/TR 17276:2014).
5. The United States Pharmacopeial Convention (2020), Elemental impurities – limits <232> and Elemental impurities – procedures <233>, *United states Pharmacopeia 43*”.
6. Agilent Technologies (2011), Successful Low Level Mercury Analysis, *Technical report publication number 5990-7173EN*.
7. Agilent Technologies (2012), Elemental impurity analysis in regulated pharmaceutical laboratories, *Primer; publication number 5991-0436 EN*.
8. Association of Official Analytical Chemists (2015), Heavy Metals in Food, Inductively Coupled Plasma–Mass Spectrometry, *Official Methods of Analysis*.

Summary

An ICP-MS method was developed and validated for determination of the heavy metals (Pb, As, Hg and Cd) in cosmetic products, an interference-free isotope was chosen for each heavy metal as 75 As, 111 Cd, 114 Cd, 201 Hg, 202 Hg, 206 Pb, 207 Pb, 208 Pb. The internal standard Rh used at 20 ng/ml. The samples were digested in microwave oven using a mixture of nitric acid, hydrochloric acid and hydrogen peroxide (5:1:1) as oxidizing agents. The method was validated in term of specificity, linear range, precision, accuracy, LOD, LOQ. The results indicated that the method was rapid, sensitive and accurate, which meet which meet the requirements for simultaneous determination of heavy metals analysis in cosmetics products.

The method is applied to control 30 cosmetic samples (lipsticks, lotions, makeup powders, shampoos) on the market, one of which contained mercury in excess of permitted limits.

(Ngày nhận bài: 24/12/2020; Ngày phản biện: 07/07/2021; Ngày duyệt đăng: 21/09/2021)

NGHIÊN CỨU XÂY DỰNG QUI TRÌNH ĐỊNH LƯỢNG ĐỒNG THỜI AMBROXOL HYDROCLORID VÀ NATRI BENZOAT TRONG SIRÔ BEFABROL BẰNG PHƯƠNG PHÁP SẮC KÝ LỎNG HIỆU NĂNG CAO

PHẠM HỒNG MINH, KHÚC HOÀNG PHƯƠNG,
NGUYỄN MAI QUYÊN, TRẦN THÚY HẠNH*

Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương

Từ khóa: Định lượng đồng thời, ambroxol hydroclorid, natri benzoat

1. Đặt vấn đề

Ambroxol là một chất chuyển hóa của bromhexin, có tác dụng long đờm và làm tiêu chất nhầy. Hiện nay, trên thị trường có rất nhiều biệt dược dạng sirô có chứa ambroxol sử dụng cho trẻ em. Thuốc được bào chế ở dạng này dễ sử dụng, dễ phân liều cho trẻ em và được chất dễ dàng hấp thu hơn dạng thuốc rắn. Tuy nhiên, thuốc bào chế ở dạng này thường có độ ổn định kém hơn các dạng thuốc rắn. Do đó, trong công thức bào chế của các sirô thường có thêm chất bảo quản kháng khuẩn, kháng nấm, chất chống oxy hóa và một số loại tá dược để làm tăng độ ổn định của chế phẩm trong quá trình lưu thông, phân phối và sử dụng của bệnh nhân.

Sản phẩm sirô BEFABROL (ambroxol HCl 15 mg/5 ml) của Công ty cổ phần Dược phẩm Bến Tre, trong công thức có chứa natri benzoat. Đây là một tá dược đóng vai trò chất bảo quản kháng khuẩn, kháng nấm được phép sử dụng trong các chế phẩm thuốc uống [1] nhưng cần phải kiểm soát hàm lượng.

Hiện nay, trong DĐVN V [2] chưa có chuyên luận sirô chứa ambroxol, Dược điển Trung Quốc [3] có chuyên luận sirô ambroxol nhưng chỉ có qui trình định lượng cho ambroxol. Tiêu chuẩn cơ sở của thành phẩm sirô BEFABROL [4] cũng định lượng riêng biệt hai thành phần trên.

Để đáp ứng nhu cầu kiểm soát chất lượng và góp phần nâng cao khả năng kiểm tra chất lượng thuốc, trong phạm vi bài viết này, chúng tôi xin giới thiệu phương pháp định lượng đồng thời ambroxol hydroclorid và natri benzoat trong sirô BEFABROL bằng phương pháp HPLC đảm bảo độ chính xác, tin cậy, tiến hành đơn giản và nhanh chóng. Quy trình này đã được chúng tôi thẩm định và đạt yêu cầu theo đúng hướng dẫn của ICH [5] đối với phép thử định lượng.

2. Thực nghiệm

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

2.1.1. Thiết bị, dụng cụ: Sử dụng thiết bị đã được hiệu chuẩn theo qui định của ISO/IEC 17025 và GLP.

- Máy HPLC Shimadzu UFLC và LC-20A với detector DAD;
- Cân phân tích Mettler Toledo MS 105 độ chính xác 0,01 mg;
- Bộ lọc dùng cho sắc ký với màng lọc 0,45 mm;
- Các dụng cụ thủy tinh chính xác: Bình định mức, pipet.

2.1.2. Chất chuẩn:

- Chất chuẩn ambroxol, hàm lượng 99,6 % (nguyên trạng); SKS: QT142070420 (Chuẩn của Viện Kiểm nghiệm thuốc TP. Hồ Chí Minh).

- Chất chuẩn natri benzoat, hàm lượng 99,78 % (nguyên trạng); SKS: C0219314.02 (Chuẩn của Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương).

2.1.3. Hóa chất thuốc thử

- Acetonitril HPLC (Merck - Germany);
- Kali dihydrophosphat PA (Scharlau - Spain);
- Acid phosphoric PA (Scharlau - Spain);
- Nước RO.

2.2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Đối tượng nghiên cứu

- Sirô BEFABROL (Ambroxol HCl 15 mg/5 ml) của Công ty cổ phần dược phẩm Bến Tre, có chứa: Ambroxol HCl 3 mg/ml; natri benzoat 1 mg/ml.

2.2.2. Phương pháp nghiên cứu

Trên cơ sở tham khảo các tài liệu [2],[3], tiêu chuẩn cơ sở của sản phẩm [4] và các trang thiết bị có sẵn, chúng tôi đã tiến hành khảo sát về bước sóng phát hiện, cột sắc ký, tỷ lệ pha động, nồng độ mẫu thử,... chúng tôi đã lựa chọn được qui trình phân tích tối ưu như sau:

* Điều kiện sắc ký

- Cột Phenomenex RP 18 (250 x 4,6 mm; 5 µm).
- Pha động: Acetonitril - dung dịch đệm pH 2,5 (35 - 65).

- Tốc độ: 1,0 ml /phút.
- Detector: 230 nm.
- Thể tích tiêm: 20 μ l.

Dung dịch đệm pH 2,5: Hòa tan 6,8 g kali dihydrophosphat trong 1000 ml nước, điều chỉnh đến pH $2,5 \pm 0,1$ bằng acid phosphoric 10 %.

* Phương pháp chuẩn bị mẫu:

- *Dung dịch chuẩn*: Cân chính xác các chất chuẩn ambroxol hydroclorid và natri benzoat, hòa tan và pha loãng trong nước để thu được dung dịch chuẩn hỗn hợp có nồng độ ambroxol hydroclorid khoảng 60 μ g/ml và natri benzoat khoảng 20 μ g/ml.

- *Dung dịch thử*: Cân chính xác một lượng chế phẩm tương ứng với 3 mg ambroxol hydroclorid, pha loãng với nước vừa đủ 50 ml, lắc đều, lọc qua màng lọc 0,45 mm.

* *Cách tiến hành*:

Kiểm tra tính thích hợp của hệ thống sắc ký: Tiêm 6 lần dung dịch chuẩn, độ lệch chuẩn tương đối của diện tích pic không được lớn hơn 2,0 %, độ lệch chuẩn tương đối của thời gian lưu không được lớn hơn 1,0 %, tính trên pic ambroxol hydroclorid và pic natri benzoat.

* *Tính kết quả*:

Tính lượng ambroxol hydroclorid và natri benzoat trong chế phẩm dựa vào lượng cân ambroxol hydroclorid và natri benzoat chuẩn, hàm lượng chất chuẩn, diện tích các pic ambroxol hydroclorid và natri benzoat trong dung dịch chuẩn, dung dịch thử, hệ số pha loãng của các dung dịch.

* *Thẩm định phương pháp*:

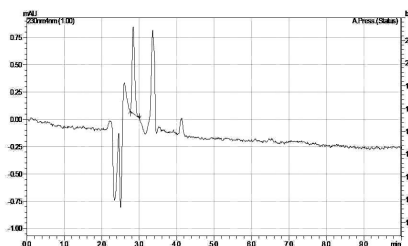
Tiến hành thẩm định phương pháp phân tích với các chỉ tiêu: Tính đặc hiệu, tính thích hợp hệ thống, độ tuyến tính, khoảng xác định, độ đúng, độ chính xác.

3. Kết quả và bàn luận

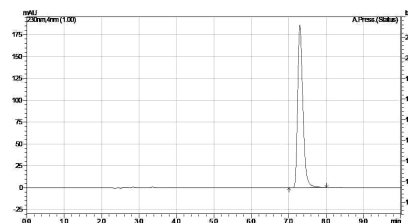
3.1. Khảo sát tính đặc hiệu

Tiến hành sắc ký dung môi pha mẫu, dung dịch chuẩn, dung dịch thử và các dung dịch placebo vào hệ thống sắc ký. Kết quả cho thấy, trên sắc ký đồ của dung dịch thử (Hình 5) cho 2 pic có thời gian lưu và phổ UV tương ứng với pic ambroxol và natri benzoat trên sắc ký đồ của dung dịch chuẩn (Hình 4) (thời gian lưu của ambroxol ~ 3,7 phút; natri benzoat ~ 7,2 phút). Độ tinh khiết của pic ambroxol và natri benzoat trên sắc ký đồ của dung dịch chuẩn và thử đều bằng 0,9999 (~ 100 %). Sắc ký đồ của dung dịch placebo MT-0 (Hình 1); MT-1 (Hình 2); MT-2 (Hình 3) không xuất hiện pic tại thời gian lưu tương ứng với thời gian của của pic ambroxol và/hoặc natri benzoat.

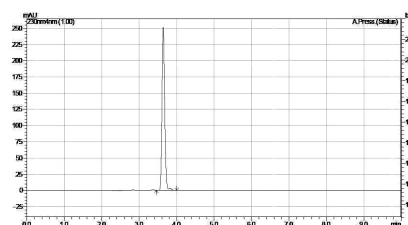
* Như vậy phương pháp đã xây dựng có tính đặc hiệu.



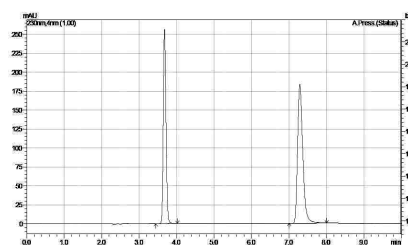
Hình 1: Sắc ký đồ của dung dịch placebo MT-0



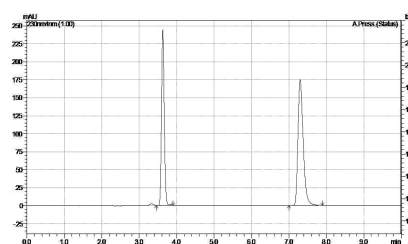
Hình 2: Sắc ký đồ dung dịch placebo MT-1



Hình 3: Sắc ký đồ dung dịch placebo MT-2



Hình 4: Sắc ký đồ dung dịch chuẩn



Hình 5: Sắc ký đồ dung dịch thử

- Mẫu placebo MT-0: Gồm các thành phần theo công thức bào chế nhưng không có ambroxol và natri benzoat.

- Mẫu placebo MT-1: Gồm các thành phần theo công thức bào chế nhưng không có ambroxol.

- Mẫu placebo MT-2: Gồm các thành phần theo công thức bào chế nhưng không có natri benzoat.

3.2. Tính thích hợp của hệ thống sắc ký

Tính thích hợp của hệ thống sắc ký được xác định bằng cách tiến hành tiêm 6 lần dung dịch chuẩn có nồng độ ambroxol hydroclorid 60 mg/ml và natri benzoat 20 mg/ml. Ghi lại các giá trị về thời gian lưu, diện tích pic. Kết quả được thể hiện ở *Bảng 1*.

Bảng 1. Tính thích hợp của hệ thống sắc ký

STT	Ambroxol HCl		Natri benzoat	
	Thời gian lưu (phút)	Diện tích pic (mAU.s)	Thời gian lưu (phút)	Diện tích pic (mAU.s)
1	3,672	1296883	7,286	1758527
2	3,665	1296833	7,277	1760138
3	3,665	1299105	7,277	1760748
4	3,658	1300244	7,282	1760707
5	3,651	1300383	7,281	1761682
6	3,658	1300413	7,291	1761713
TB	3,661	1298977	7,282	1760586
RSD (%)	0,20	0,13	0,08	0,07

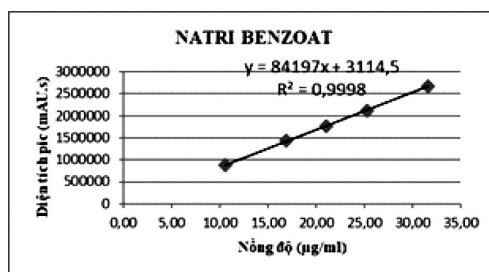
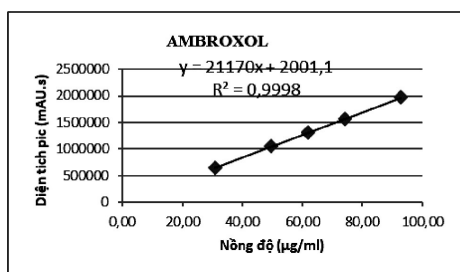
* **Nhận xét:** Các số liệu cho thấy, hệ thống sắc ký trên phù hợp cho việc định lượng ambroxol HCl và natri benzoat.

3.3. Độ tuyến tính

Khảo sát trên 05 dung dịch chuẩn với 5 nồng độ khác nhau (được pha loãng từ dung dịch chuẩn gốc với hệ số pha loãng khác nhau) có nồng độ 50 %; 80 %; 100 %, 120 % và 150 % so với nồng độ định lượng của ambroxol HCl và natri benzoat. Kết quả được thể hiện trong *Bảng 2* và *Hình 6*.

Bảng 2. Kết quả khảo sát độ tuyến tính

STT	% so với định lượng	V _{chuẩn gốc} (ml)	F _{pha loãng}	Ambroxol HCl		Natri benzoat	
				Nồng độ (µg/ml)	S _{pic} (mAU.s)	Nồng độ (µg/ml)	S _{pic} (mAU.s)
1	50	2,5	25	30,91	653692	10,54	890622
2	80	4,0	25	49,45	1059816	16,86	1434142
3	100	5,0	25	61,81	1303984	21,07	1767016
4	120	6,0	25	74,17	1566320	25,29	2121611
5	150	7,5	25	92,72	1969028	31,61	2673865
Phương trình hồi qui				y = 21170x + 2001,1		y = 84197x + 3114,5	
Hệ số tương quan				r = 0,9998 (> 0,998)		r = 0,9998 (> 0,998)	
% Y				0,15% (< 2,0 %)		0,18% (< 2,0 %)	



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

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

3.4. Độ đúng

Chuẩn bị các mẫu thử: Chuẩn bị các mẫu tự tạo bằng cách thêm chính xác một lượng chất chuẩn ambroxol

hydroclorid và natri benzoat vào mẫu placebo sao cho sau khi xử lý theo qui trình phân tích thu được các dung dịch có nồng độ 50 %, 100 %, 150 % so với nồng độ định lượng.

Mỗi mức nồng độ làm 03 mẫu.

Tính lượng hoạt chất tìm thấy dùng dung dịch chuẩn ở mục 3.2. Tính thích hợp của hệ thống.

Kết quả khảo sát độ đúng thể hiện ở Bảng 3.

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

STT	m _{thêm vào} so với nhãn	Ambroxol HCl				Natri benzoat			
		m _{thêm vào} (mg)	S _{pic} (mAU.s)	m _{tìm lại} (mg)	% Thu hồi	m _{thêm vào} (mg)	S _{pic} (mAU.s)	m _{tìm lại} (mg)	% Thu hồi
1.	50 %	1,51392	638382	1,51887	100,33	0,538812	904393	0,54126	100,45
2.	50 %	1,51392	638949	1,52022	100,42	0,538812	900198	0,53875	99,99
3.	50 %	1,51392	634570	1,50980	99,73	0,538812	897850	0,53735	99,73
% thu hồi trung bình 100,16 %; RSD 0,37 %						% thu hồi trung bình 100,06 %; RSD 0,37 %			
4.	100 %	3,0378	1272092	3,02662	99,63	1,082613	1820846	1,08974	100,66
5.	100 %	3,0378	1287608	3,06354	100,85	1,082613	1821625	1,09021	100,70
6.	100 %	3,0378	1280383	3,04635	100,28	1,082613	1824119	1,09170	100,84
% thu hồi trung bình 100,25 %; RSD 0,61 %						% thu hồi trung bình 100,73 %; RSD 0,09 %			
7.	150 %	4,60152	1954984	4,65139	101,08	1,586502	2664802	1,59483	100,53
8.	150 %	4,60152	1943885	4,62498	100,51	1,586502	2659727	1,59180	100,33
9.	150 %	4,60152	1952104	4,64454	100,93	1,586502	2663856	1,59427	100,49
% thu hồi trung bình 100,84 %; RSD 0,30 %						% thu hồi trung bình 100,45 %; RSD 0,10 %			

***Nhận xét:** Từ kết quả thu được trong Bảng 3 cho thấy tỉ lệ thu hồi từ 99,63 % đến 101,08 % đối với ambroxol HCl và từ 99,73 % - 100,84 %: “đối với natri benzoat”, đều trong khoảng 98,0 % - 102,0 % và RSD nhỏ hơn 2,0 %.

3.5. Độ chính xác

3.5.1. Độ lặp lại: Tiến hành định lượng trên 06 mẫu thử sirô BEFABROL độc lập theo qui trình phân tích.

Xác định hàm lượng ambroxol HCl và natri benzoat trong mẫu thử. Kết quả được trình bày trong Bảng 4. RSD của kết quả định lượng của hai chất đều không quá 2,0 %, đáp ứng yêu cầu về độ lặp lại của qui trình định lượng.

3.5.2. Độ chính xác trung gian: Cách tiến hành tương tự như phần Độ lặp lại với hai kiểm nghiệm viên khác nhau và trên hai thiết bị khác nhau.

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

STT	Lượng cân (g) (KLR = 1,26626 mg/ml)	Kiểm nghiệm viên 1			
		Ambroxol HCl		Natri benzoat	
		S _{pic} (mAU.s)	HL (%)	S _{pic} (mAU.s)	HL (%)
1.	1,27571	1233570	97,12	1672332	99,36
2.	1,29844	1260451	97,50	1712715	99,98
3.	1,29412	1256790	97,54	1704292	99,82
4.	1,29785	1258377	97,39	1710540	99,90
5.	1,28642	1244888	97,20	1687530	99,43
6.	1,26955	1229058	97,24	1680716	100,34
		TB = 97,33 %; n = 6; RSD = 0,18 %		TB = 99,80 %; n = 6; RSD = 0,37 %	

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

STT	Lượng cân	Kiểm nghiệm viên 2			
		Ambroxol HCl		Natri benzoat	
		Diện tích (mAU.s)	HL (%)	Diện tích (mAU.s)	HL (%)
1.	1,27056	1258785	97,53	1752250	99,84
2.	1,28612	1274452	97,55	1760265	99,08
3.	1,27686	1271039	98,00	1758621	99,71
4.	1,29215	1278115	97,37	1772023	99,28
5.	1,28862	1275007	97,40	1770429	99,46
6.	1,27089	1265589	98,03	1754268	99,93
TB = 97,65%; n = 6; RSD = 0,30 %			TB = 99,55%; n = 6; RSD = 0,30 %		
TB (n = 12)			97,49	TB (n = 12)	99,68
RSD (%)			0,29	RSD (%)	0,36

* **Nhận xét:** Từ kết quả thu được trong Bảng 4 cho thấy:

Trung bình kết quả định lượng của 2 kiểm nghiệm viên (n = 12): Ambroxol = **97,49 %**; natri benzoat = **99,68 %**.

RSD của các kết quả định lượng của 2 kiểm nghiệm viên (n = 12): Ambroxol = **0,29 %**; natri benzoat = **0,36%** (< 2,0 %).

→ Độ chính xác đạt yêu cầu.

4. Kết luận

Nghiên cứu đã xây dựng được qui trình định lượng đồng thời ambroxol HCl và natri benzoat trong sirô BEFABROL của Công ty cổ phần Dược phẩm Bến tre. Kết quả thẩm định cho thấy, phương pháp có độ chính xác cao, độ đúng tốt, khoảng tuyến tính rộng với độ tương quan tuyến tính chặt chẽ giữa nồng độ và diện tích trong khoảng nồng độ đã khảo sát, tiến hành đơn giản và nhanh chóng. Chúng tôi hy vọng có thể áp dụng phương pháp này để định lượng đồng thời ambroxol HCl và natri benzoat trong các chế phẩm có thành phần tương tự.

Tài liệu tham khảo

1. Paul J. Sheskey; Walter G. Cook; Colin G. Cable (2017), *Handbook of Pharmaceutical Excipients – Eighth edition*, Amer Pharmacists Assn Publisher.
2. Bộ Y tế (2017), *Dược điển Việt Nam*, lần xuất bản thứ năm, NXB Y học, Hà Nội.
3. Chinese Pharmacopoeia commission (2015), *Pharmacopoeia of the people's republic of China*.
4. Công ty cổ phần dược phẩm Bến Tre (2021), *Tiêu chuẩn Sirô BEFABROL (Ambroxol HCl 15 mg/ml)*.
5. ICH (2005), Validation of analytical procedures: Text and methodology Q2(R1), *ICH Harmonized Tripartite guidelines*.

SUMMARY

A reversed-phase liquid chromatography method was developed for simultaneous assay of ambroxol hydrochloride and sodium benzoate in BEFABROL sirup. Chromatographic conditions are as follows:

Column: Phenomenex RP 18 (250 x 4.6 mm; 5 µm).

Flow rate: 1.0 ml /min.

Detector: 230 nm.

Injection volume: 20 µl.

Mobile phase: ACN – Buffer solution pH 2.5 (35 – 65)

Buffer solution pH 2.5: Dissolve 6.8 g of potassium dihydrophosphate in 1000 ml water, adjust to pH 2.5 ± 0.1 with phosphoric acid.

The method was validated in system suitability, specificity, linearity, accuracy and precision. Validation results proved that the developed method was suitable for simultaneous determination of ambroxol hydrochloride and sodium benzoate in BEFABROL sirup.

(Ngày nhận bài: 26/11/2020; Ngày phản biện: 28/04/2021; Ngày duyệt đăng: 21/09/2021)

THUỐC KHÔNG ĐẠT CHẤT LƯỢNG ĐÃ ĐƯỢC BỘ Y TẾ XỬ LÝ TỪ 01/06/2021 ĐẾN 30/11/2021

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 01/06/2021 đến 30/11/2021 mà Bộ Y tế đã ra văn bản thông báo thuốc giả, thuốc bị thu hồi, rút số đăng ký gồm: 10 thuốc bị thu hồi, 04 được liệu bị thu hồi, 24 thuốc rút số đăng ký và 03 thuốc giả.

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

Danh mục đình chỉ lưu hành thuốc từ ngày 01/06/2021 đến ngày 30/11/2021

STT	Tên thuốc	Số lô	Ngày sản xuất	Hạn dùng	Số đăng ký	Tên cơ sở sản xuất	Tên cơ sở đơn vị nhập khẩu	Chỉ tiêu không đạt	Văn bản xử lý	Hình thức xử lý
1	Thuốc viên nang cứng Amoxicilin 500mg (Amoxicillin trihydrat)	220089	21/02/2021	20/02/2024	VD-17537-12	Công ty cổ phần dược phẩm Trung ương I - Pharbaco		Định lượng Độ hòa tan	Công văn: số 8968/QLD-CL ngày 30/07/2021	Thu hồi tại các cơ sở kinh doanh, cơ sở khám bệnh, chữa bệnh trên địa bàn tỉnh Bắc Giang, các cơ sở kinh doanh, cơ sở khám bệnh, chữa bệnh không nằm trên địa bàn tỉnh Bắc Giang đã mua lô thuốc trên do Công ty TNHH dược phẩm Tín Thành cung cấp
2	Viên nang cứng Fabamox 500 (Amoxicillin trihydrat)	220036	25/12/2020	24/12/2023	VD-25792-16	Công ty cổ phần dược phẩm Trung ương I - Pharbaco		Độ hòa tan	Công văn: số 12e/QLD-CL ngày 30/07/2021	Thu hồi tại các cơ sở kinh doanh, cơ sở khám bệnh, chữa bệnh trên địa bàn thành phố Hồ Chí Minh
3	Hỗn dịch uống Sucrate gel (Sucralfate - 1g/5ml)	9028	10/2019	10/2022	VN-13767-11	Laboratorio Italiano Biochimico Farmaceutico Lisapharma S.p.A. (Italy)	Công ty cổ phần Dược phẩm Codupha	pH	Công văn: số 9155/QLD-CL ngày 05/08/2021	Thu hồi trên địa toàn quốc

4	Viên nén bao phim Vitamin C 300mg	18001	04/10/2018	03/10/2021	VD-28097-17	Công ty cổ phần dược phẩm Trung ương I - Pharbaco	Công ty cổ phần Dược phẩm Thiên Thảo			Công văn: số 9171/QLD-CL ngày 06/08/2021	Thu hồi toàn quốc
5	Viên nén bao đường Hoạt huyết dưỡng não	011120	02/11/2020	01/11/2023	VD-30958-18	Công ty cổ phần dược Phúc Vinh		Định lượng		Công văn: số 9764/QLD-CL ngày 20/08/2021	Thu hồi toàn quốc
6	Viên nén Navadiab (Gliclazid 80 mg)	200182/2	01/06/2020	01/06/2025	VN-11676-11	Industria Farmaceutica Nova Argentina S.p.A (Italy)		Độ hòa tan		Công văn: số 10e/QLD-CL ngày 09/09/2021	Thu hồi tại các cơ sở kinh doanh, cơ sở khám bệnh, chữa bệnh trên địa bàn Hà Nội, các cơ sở kinh doanh, cơ sở khám bệnh, chữa bệnh không nằm trên địa bàn Hà Nội đã mua lô thuốc trên do Công ty TNHH Dược mỹ phẩm và thương mại Thiên Phúc cung cấp (nếu có)
7	Viên nén bao phim Taparen (Cetirizine 2HCl 10 mg)	9962	01/2020	01/2023	VN-19811-16	Farmalabor-Produtos Farmacêuticos, S.A, Bồ Đào Nha	Công ty cổ phần thương mại và phát triển Hà Lan	Tập chất liên quan		Công văn: số 13e/QLD-CL ngày 09/09/2021	Thu hồi tại các cơ sở kinh doanh, cơ sở khám bệnh, chữa bệnh trên địa bàn thành phố Hồ Chí Minh, các cơ sở kinh doanh, cơ sở khám bệnh, chữa bệnh không nằm trên địa bàn thành phố Hồ Chí Minh đã mua lô thuốc trên do Công ty Thương mại Dược phẩm Duy Khang cung cấp (nếu có)
8	Dược liệu Cốt toái bổ	NK/TT.0806	08/06/2020	08/06/2022			Công ty cổ phần dược liệu Indochina	Chất chiết được trong dược liệu		Công văn: số 947/YHCT-QCL ngày 16/09/2021	Thu hồi tại các cơ sở đã cung ứng trên địa bàn thành phố Hà Nội
9	Dược liệu Đẳng sâm	21030524	05/03/2021	04/03/2024			Như trên	Độ ẩm		Như trên	Như trên
10	Dược liệu Bạch chỉ	001/2021	25/01/2021	24/01/2023			Như trên	Định lượng Imperatorin		Như trên	Như trên
11	Dược liệu Bạch chỉ	N0011020	14/10/2021	14/10/2022			Công ty cổ phần Đông y Thăng Long	Định lượng Imperatorin		Công văn: số 946/YHCT-QCL ngày 16/09/2021	Thu hồi tại các cơ sở đã cung ứng trên địa bàn thành phố Hà Nội

12	Viên nén NOVOTEC - 70 (Acid Alendronic 70 mg)	E11532001	05/03/2020	04/03/2023	VN-22482- 19	M/s Unicare Remedies Private Limited., India	Công ty cổ phần được liệt Trung ương 2 (PHYTOPHARMA)	Đồng điều lượng hàm Định lượng	Công văn: số 12887/QLD-CL ngày 20/10/2021	Thu hồi toàn quốc
13	Viên nén Unicet (Cetirizin hydroclorid 10mg)	UNE 152	27/12/2019	26/12/2022	VN-18786- 15	Bal Pharma Limited (India)	Công ty cổ phần xuất nhập khẩu y tế Tp. Hồ Chí Minh	Độ hòa tan	Công văn: số 13164/QLD-CL ngày 28/10/2021	Thu hồi tại các cơ sở kinh doanh, cơ sở khám bệnh, chữa bệnh trên địa bản thành phố Cần Thơ, các cơ sở kinh doanh, cơ sở khám bệnh, chữa bệnh không nằm trên địa bàn thành phố Cần Thơ đã mua lô thuốc trên do Công ty TNHH Phúc Khởi Nguyên cung cấp (nếu có)
14	Thuốc bột uống Acetylcystein	71041120	04/11/2021	40/11/2023	VD-21827- 14	Công ty cổ phần được phẩm Cửu Long		Hình thức	Công văn: số 13169/QLD-CL ngày 28/10/2021	Thu hồi tại các cơ sở kinh doanh, cơ sở khám bệnh, chữa bệnh trên địa bàn Hà Nội, các cơ sở kinh doanh, cơ sở khám bệnh, chữa bệnh không nằm trên địa bàn Hà Nội đã mua lô thuốc trên do Chi nhánh Công ty cổ phần được phẩm Cửu Long cung cấp (nếu có)

Danh mục thuốc bị rút số đăng ký từ ngày 01/06/2021 đến ngày 30/11/2021

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	Alvesin 10E	VN-21157-18	Berlin-Chemie AG, Germany	A. Menarini Singapore Pte. Ltd.	Quyết định số 564/QĐ-QLD ngày 30/09/2018	Rút SDK tự nguyện
2	Alvesin 40	VN-21158-18	Như trên	Như trên	Như trên	Như trên
3	Omnaris Nasal Spray	VN3-220-19	Takeda GmbH, Germany	AstraZeneca Singapore Pte., Ltd.	Như trên	Như trên

4	Losec Mups	VN-17833-14	AstraZeneca AB, Sweden (CS đồng gói: AstraZeneca Pharmaceutical Co., Ltd., Trung Quốc)	Như trên	Như trên	Như trên
5	Xigduo XR	VN3-218-19	AstraZeneca Pharmaceuticals LP, USA	Công ty TNHH AstraZeneca Việt Nam	Như trên	Như trên
6	Sivextro	VN3-285-20	Patheon Inc., Whitby Operation, Canada	Bayer (South East Asia) Pte. Ltd.	Như trên	Như trên
7	Aremed 1mg Film Coated tablets	VN-20478-17	J. Uriach and Cía., S.A., Spain	Công ty cổ phần Dược phẩm và Thiết Bị Y Tế Âu Việt	Như trên	Như trên
8	Sivextro	VN3-145-19	Patheon Italia S.p.A., Italy (CS đồng gói Bayer Pharma AG, Đức)	Merck Sharp & Dohme (Asia) Ltd.	Như trên	Như trên
9	Bridion	VN-21210-18	Patheon Manufacturing Services LLC, USA (CS đồng gói: N.V. Organon, The Netherlands)	Như trên	Như trên	Như trên
10	Ponstan 500	VN-21932-19	Olic (Thailand) Limited	Pfizer (Thailand) Ltd.	Như trên	Như trên
11	Lopid	VN-21101-18	Như trên	Như trên	Như trên	Như trên
12	Lopid	VN-21102-18	Như trên	Như trên	Như trên	Như trên
13	DBL Irinotecan Injection Concentrate	VN-22186-19	Zydus Hospira Oncology Pvt. Ltd, India	Như trên	Như trên	Như trên
14	DBL Irinotecan Injection Concentrate	VN-22187-19	Như trên	Như trên	Như trên	Như trên
15	Optive Advanced UD	VN-20374-17	Allergan Sales, LLC, USA	Allergan Singapore Pte. Ltd.	Như trên	Như trên
16	Etoposid "Ebewe"	VN-16746-13	Ebewe Pharma Ges.m.b.H Nfg. KG, Austria	Novartis (Singapore) Pte Ltd.	Như trên	Như trên
17	Mitoxantron "Ebewe"	VN-20827-17	Như trên	Như trên	Như trên	Như trên

18	Mitoxantron “Ebewe”	VN-20828-17	Như trên	Như trên	Như trên	Như trên
19	Irinotecan 100mg/5ml	VN-21919-19	Như trên	Như trên	Như trên	Như trên
20	Weekendal 20 mg	VN-22181-19	Sandoz Ilac Sanayi ve Ticaret, A.S., Turkey	Như trên	Như trên	Như trên
21	Zantac Tablets	VN-20764-17	Glaxo Wellcome S.A, Spain	GlaxoSmithKline Pte., Ltd., Singapore	Như trên	Như trên
22	Tocalus tablet	VN-22329-19	Inist Bio Pharmaceutical Co., Ltd, Korea	Công ty cổ phần thương mại và dược phẩm T&T	Như trên	Như trên
23	Glucophage XR	VN-21909-19	Merck Sante s.a.s, France (CS đóng gói và xuất xưởng: PT. Merck Tbk., Indonesia)	Merck Export GmbH, Germany	Như trên	Như trên
24	Lysopadol	VN-21184-18	Delpharm Reims, France	Boehringer Ingelheim International GmbH, Germany	Như trên	Như trên

Danh mục thuốc giả từ ngày 01/06/2021 đến ngày 30/11/2021

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	Aquadetrim vitamin D3	050419	080419	080422	VN-21328-18	NSX: Medana Pharma S.A DNINK: Công Ty Cổ Phần Dược Thiết Bị Y Tế Đa Năng	Công văn: số 6427/QLD-CL ngày 03/06/2021
2	Viên nang Ditanavic-F				VD-3036-10	N.I.C Pharma Co., Ltd	Công văn: số 8157/QLD-CL ngày 13/07/2021
3	Voltrén 75 mg solución inyectable	81111		12/2023	Không có	Novatis Farmacéutica, S.A	Công văn: số 13481/QLD-CL ngày 08/11/2021

MỤC LỤC

	Trang
● Nghiên cứu khoa học	
- Xây dựng qui trình xác định giới hạn tạp chất liên quan của nguyên liệu methyl 2-methoxy-5-sulfamoylbenzoat (tạp B của sulpirid) bằng phương pháp HPLC. <i>NGUYỄN THỊ HỒNG*, NGUYỄN THỊ NGÂN</i>	1
- Đánh giá độc tính cấp và bán trường diễn của thực phẩm chức năng Thấp diệu nang Tâm Bình. <i>NGUYỄN THỊ LIÊN*, NGUYỄN THỊ HẰNG</i>	6
- Nghiên cứu xây dựng qui trình xác định kim loại nặng trong mỹ phẩm bằng khối phổ plasma cảm ứng. <i>TRẦN ĐỨC LAI*, NGUYỄN VĂN HẠ, ĐOÀN CAO SON</i>	13
- Nghiên cứu xây dựng qui trình định lượng đồng thời ambroxol hydroclorid và natri benzoat trong siro BEFABROL bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao. <i>PHẠM HỒNG MINH, KHÚC HOÀNG PHƯƠNG, NGUYỄN MAI QUYÊN, TRẦN THÚY HẠNH *</i>	22
● Thông tin khoa học – Tin tức	
- Thuốc không đạt chất lượng đã được Bộ Y tế xử lý từ 01/06/2021 đến 30/11/2021. <i>HÀ THỊ MINH CHÂU</i>	27

CONTENTS

	Page
● Scientific researches	
- Development of an analytical procedure for determining the limit of related substances in sulpirid impurity B by RP- HPLC. <i>NGUYEN THI HONG*, NGUYEN THI NGAN</i>	1
- Acute and repeated dose 28-day oral toxicity studies of Thap Dieu Nang Tam Binh. <i>NGUYEN THI LIEN*, NGUYEN THI HANG</i>	6
- Study on development of an analytical procedure for determination of heavy metals in cosmetic products by Inductively Coupled Plasma–Mass Spectrometry (ICP-MS). <i>TRẦN ĐỨC LAI*, NGUYỄN VĂN HẠ, ĐOÀN CAO SON</i>	13
- Study on development of an analytical procedure for simultaneous assay of ambroxol hydroclorid and sodium benzoat in BEFABROL sirup. <i>PHẠM HỒNG MINH, KHÚC HOÀNG PHƯƠNG, TRẦN THÚY HẠNH*</i>	22
● Technical information - News	
- Substandard pharmaceuticals recalled from June 2021 to November 2021 on decision of Ministry of Health. <i>HÀ THỊ MINH CHÂU</i>	27