dịch có nồng độ lornoxicam khoảng 0,08 mg/ml. Lọc qua màng lọc có kích thước 0,45 µm . Tiến hành sắc ký theo điều kiện đã lựa chọn. Các kết quả được ghi trong Bảng 4.

Bảng 4. Kết quả khảo sát độ lặp lại

STT	Lượng cân (g)	DT pic (mAU.s)	Hàm lượng (%)	Thông số thống kê
1	0,0987	2922439	103,75	HL TB = 103,94% S = 0,31 RSD = 0,29%
2	0,1019	3028537	104,14	
3	0,1009	2993645	103,96	
4	0,0995	2939401	103,51	
5	0,1015	3024095	104,39	
6	0,0991	2938985	103,91	

Nhận xét: Kết quả cho thấy phương pháp có độ lặp lại cao, độ lệch chuẩn tương đối nhỏ (0,29%).

Yêu cầu: RSD ≤ 2,0 %

4. Kết luận

Sau khi thẩm định phương pháp phân tích, chúng tôi thấy: Chương trình sắc ký lỏng pha đảo ở bước sóng đã lựa chọn, có sự tương quan tuyến tính chặt chẽ giữa nồng độ và diện tích pic với r = 0,9999, có độ đúng và độ lặp lại tốt. Chúng tôi đề xuất có thể áp dụng phương pháp HPLC đã nêu trên để tiến hành phân tích mẫu thuốc bột pha tiêm lornoxicam.

Tài liệu tham khảo

1. BP. 2010
2. USP. 2010
3. EP. 2011
4. http://bja.oxfordjournals.org/content/100/6/827.abstract
5. http://en.wikipedia.org/wiki/Lornoxicam
6. http://ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8706598

SUMMARY

An HPLC method for determination of Lornoxicam in Lornoxicam powder for injection is introduced: The chromatographic condition as follows:

- Mobile phase: Potassium Dihydrogen Phosphate buffer solution 0.05M pH 3.0 - Acetonitrile (55:45)

- Detector UV: 293 nm

- Column: Phenomenex RP 18 (250 x 4.6 mm, 5 µm)

- Flow rate. 1.2 ml/min

- Injection volume: 20 µl

The experimental results proved that proposed HPLC method was rapid, accurate and precise.

NGHIÊN CỨU ĐỊNH LƯỢNG TACROLIMUS TRONG THUỐC MỠ BẰNG PHƯƠNG PHÁP SẮC KÝ LỎNG PHA ĐẢO

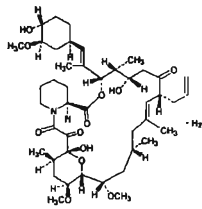
LÊ THỊ HƯỜNG HOA, LÊ ĐÌNH CHI

Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương

1. Đặt vấn đề

Tacrolimus (Hình 1) là một hoạt chất có tác dụng ưu việt hơn hẳn corticosteroid trong điều trị bệnh chàm thể tạng, là bệnh có liên quan đến yếu tố di truyền, miễn dịch và môi trường do có thể sử dụng độc lập và kéo dài mà không gây tình trạng phụ thuộc thuốc. Tuy nhiên, trong các Dược điển trên thế giới như Dược điển Mỹ, Dược điển Anh, Dược điển Nhật chưa thấy đề cập đến các dạng thuốc có chứa Tacrolimus và phương pháp định lượng hoạt chất này. Hiện nay trên thị trường đã xuất hiện dạng bào chế thuốc mỡ, thuốc viên có chứa Tacrolimus của hãng Janssen-Cilag.

Trong nước, chưa thấy cơ sở nào đưa ra sản phẩm có chứa Tacrolimus. Để góp phần nâng cao công tác kiểm tra chất lượng thuốc, trong nghiên cứu này chúng tôi đã xây dựng quy trình định lượng Tacrolimus trong thuốc mỡ bằng phương pháp sắc ký lỏng pha đảo.



Hình 1. Công thức cấu tạo của Tacrolimus

2. Thực nghiệm

2.1. Thiết bị, hóa chất, chất chuẩn và mẫu nghiên cứu

2.1.1. Thiết bị và dụng cụ

- Máy sắc ký lỏng hiệu năng cao được trang bị detector PDA Shimadzu LC-20A.

- Cột Apollo C18 (250 × 4,6 mm, 5 µm).

- Bộ lọc dung môi, lọc mẫu với màng lọc 0,45 µm.

- Máy lắc siêu âm.

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

- Các dụng cụ thủy tinh chính xác: bình định mức, pipet chính xác, ống đong, bình gạn...

Các thiết bị phân tích sử dụng trong nghiên cứu đều được hiệu chuẩn đạt yêu cầu theo quy định của ISO/IEC 17025 và GLP.

2.1.2. Hóa chất, chất chuẩn, mẫu nghiên cứu

- Methanol loại dùng cho HPLC (Merck, Đức).

- Acetonitril loại dùng cho HPLC (Merck, Đức).

- Chất chuẩn Tacrolimus có hàm lượng 99,9 %, độ ẩm 2,0 % (Corporacion Farmaceutica Recalcine).

- Acid formic loại PA (Merck, Đức).

2.1.3. Mẫu nghiên cứu

- Thuốc mỡ Protopic có hàm lượng Tacrolimus 0,03 % (0,3 mg tacrolimus/ 1 g kem) (Janssen-Cilag, lô sản xuất: 120135).

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Phương pháp định lượng tacrolimus được xây dựng dựa trên cơ sở kỹ thuật sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC). Phương pháp cho phép sử dụng để định tính và định lượng tacrolimus trong chế phẩm.

- Định tính:

+ *Dựa vào thời gian lưu:* so sánh thời gian lưu của pic chính trên mẫu thử với thời gian lưu của pic chính trên mẫu chuẩn.

+ *Dựa vào phổ hấp thụ UV-VIS thu được nhờ detector PDA:* so sánh phổ hấp thụ UV-VIS lấy ở đỉnh pic tacrolimus trên sắc ký đồ của mẫu thử với phổ UV-VIS lấy ở đỉnh pic tacrolimus trên sắc ký đồ của mẫu chuẩn, đánh giá hệ số tương đồng (similarity index) giữa 2 phổ.

- Định lượng:

Hàm lượng Tacrolimus trong mẫu thử được xác định dựa vào diện tích pic hay chiều cao pic Tacrolimus thu được trên sắc ký đồ của dung dịch chuẩn và dung dịch thử, nồng độ của dung dịch chuẩn, lượng mẫu thử đem phân tích và độ pha loãng của mẫu thử.

3. Kết quả và bàn luận

3.1. Xây dựng phương pháp phân tích

3.1.1. Lựa chọn dung môi pha mẫu

Qua khảo sát trên nhiều loại dung môi và hỗn hợp dung môi khác nhau, chúng tôi nhận thấy hỗn hợp dung môi acetonitril – methanol (1:1) phù hợp để chiết triệt để tacrolimus khỏi nền mẫu kem. Vì vậy chúng tôi sử dụng hỗn hợp acetonitril – methanol (1:1) làm dung môi pha mẫu trong nghiên cứu này.

3.1.2. Quy trình chuẩn bị mẫu chuẩn, mẫu thử

- *Dung dịch chuẩn:* Cân chính xác khoảng 70,0 mg chất chuẩn Tacrolimus, cho vào bình định mức 100 ml, thêm khoảng 70 ml dung môi pha mẫu, lắc kỹ cho tan, thêm dung môi pha mẫu vừa đủ đến vạch, lắc đều. Pha loãng chính xác 1,0 ml dung dịch thu được thành 20 ml với dung môi pha mẫu. Lọc qua màng lọc 0,45 µm.

- *Dung dịch thử :* Cân chính xác một lượng khoảng 3,0 g thuốc mỡ vào bình nón 25 ml, thêm khoảng 10 ml dung môi pha mẫu, đun cách thủy trong 5 phút, lắc siêu âm trong 2 phút. Sau đó đem ngâm lạnh trong nước đá 30 phút để làm đông vón các tá dược thân dầu không tan. Gạn lớp dung dịch vào bình định mức 25 ml. Thêm hai lần, mỗi lần 5 ml dung môi pha mẫu vào bình nón, sau đó tiến hành chiết như trên, bắt đầu từ "đun cách thủy..." đến "... vào bình định mức

25 ml", thêm vừa đủ đến vạch định mức bằng dung môi pha mẫu, lắc đều. Lọc qua giấy lọc, rồi lọc lại qua màng lọc 0,45 µm.

3.1.3. Khảo sát lựa chọn điều kiện sắc ký

Trên cơ sở tham khảo các kết quả nghiên cứu đã được công bố, chúng tôi lựa chọn hỗn hợp acetonitril – methanol – dung dịch acid formic 0,1% làm pha động cho phương pháp phân tích tacrolimus bằng HPLC và thực hiện khảo sát tối ưu hóa thành phần pha động ở các tỷ lệ khác nhau (Bảng 1).

***Bảng 1.** Kết quả lựa chọn thành phần pha động.*

STT	Tỉ lệ pha động (Acetonitril - methanol - dung dịch acid formic 0,1%)	Kết quả
1	10 : 70 : 20	Pic bị kéo đuôi, t_R =10,5 phút, hệ số bất đối T = 1,54
2	10 : 75 :15	Pic gọn, cân đối, t_R = 6,5 phút, hệ số bất đối T = 1,01
3	10 : 85 : 5	Pic tách không tốt, kéo đuôi, hệ số bất đối T = 1,30

Từ kết quả khảo sát bằng thực nghiệm, chúng tôi nhận thấy thành phần pha động gồm: Acetonitril - methanol - dung dịch acid formic 0,1% (10:75:15) là thích hợp. Các điều kiện phân tích cuối cùng cho phương pháp định lượng tacrolimus bằng HPLC bao gồm:

- Cột Apollo C18 (250 × 4,6 mm, 5 µm). Nhiệt độ cột 50°C.

- Pha động: Acetonitril - methanol - dung dịch acid formic 0,1 % (10:75:15).

- Tốc độ dòng: 1 ml/phút.

- Thể tích tiêm: 20 µl.

- Detector: 210 nm.

3.2. Thẩm định phương pháp

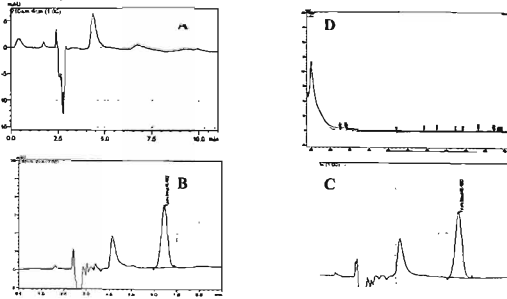
3.2.1. Độ đặc hiệu

Độ đặc hiệu của phương pháp được đánh giá thông qua kết quả phân tích thu được trên nền mẫu trắng không chứa tacrolimus, dung dịch chuẩn tacrolimus và dung dịch thử chuẩn bị từ thuốc mỡ Protopic.

Nền mẫu trắng không chứa tacrolimus: Cân khoảng 3,0 g hỗn hợp các tá dược theo công thức bào chế (công ty gửi tới), xử lý theo qui trình xử lý mẫu thử (mục 3.1.2).

- Dung dịch chuẩn, dung dịch thử: Chuẩn bị như mục 3.1.2.

Sau khi xử lý, các mẫu trên được phân tích ở các điều kiện sắc ký đã nêu tại mục 3.1.3. Kết quả thực nghiệm cho thấy, sắc ký đồ của nền mẫu trắng không chứa tacrolimus không có pic nào có thời gian lưu trùng với pic tacrolimus trên sắc ký đồ của dung dịch chuẩn. Đồng thời, sắc ký đồ của dung dịch thử với mẫu thuốc mỡ Protopic cho pic có cùng thời gian lưu và phổ UV-VIS (hệ số tương đồng = 0,994) với pic tacrolimus trên sắc ký đồ của dung dịch chuẩn (Hình 2). Như vậy, phương pháp phân tích chúng tôi xây dựng đáp ứng được yêu cầu về độ đặc hiệu với tacrolimus, không bị ảnh hưởng bởi các thành phần tá dược có mặt trong công thức bào chế cũng như từ các ảnh hưởng khác trong quá trình chuẩn bị mẫu.



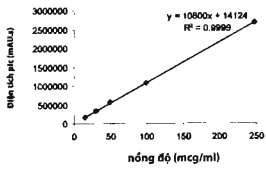
Hình 2. Kết quả đánh giá độ đặc hiệu (A: sắc ký đồ nền mẫu trắng. B: sắc ký đồ dung dịch chuẩn tacrolimus, C: sắc ký đồ dung dịch thử mẫu thuốc mỡ Protopic, D: so sánh phổ UV-VIS của pic tacrolimus trên sắc ký đồ dung dịch chuẩn và dung dịch thử).

3.2.2. Khoảng tuyến tính

Chúng tôi tiến hành khảo sát sự phụ thuộc tuyến tính giữa nồng độ và diện tích pic tương ứng của tacrolimus trên 5 dung dịch chuẩn có nồng độ tacrolimus đã biết chính xác. Kết quả thu được (Bảng 2 và Hình 3) cho thấy trong khoảng nồng độ tacrolimus đã khảo sát từ 14,9 đến 247,7 µg/ml, có sự tương quan tuyến tính chặt chẽ giữa nồng độ tacrolimus và diện tích pic với hệ số tương quan r = 0,9999.

Bảng 2. Kết quả khảo sát khoảng tuyến tính

STT	Nồng độ (µg/ml)	Diện tích pic (mAU.s)
1	14,9	166934
2	29,7	331885
3	49,5	567770
4	99,1	1076155
5	247,7	2689692
Phương trình hồi quí		y = 10800x + 14124
Hệ số tương quan tuyến tính		r = 0,9999



Hình 3. Tương quan tuyến tính giữa nồng độ và diện tích pic của tacrolimus

3.2.3. Độ lặp lại của phương pháp

Độ lặp lại của phương pháp được đánh giá thông qua việc tiến hành định lượng 6 lần độc lập trên mẫu thuốc mỡ Protopic. Kết quả thực nghiệm (Bảng 3) cho thấy phương pháp dã xây dựng có độ lặp lại tốt (độ lệch chuẩn tương đối RSD = 1,6 %).

Bảng 3. Kết quả khảo sát độ lặp lại

STT	Lượng cân mẫu (g)	Diện tích pic (mAu.s)	Hàm lượng tacrolimus (mg/ g kem)	Tỷ lệ (%) so với hàm lượng công bố
1	3,8754	566532	0,297	99,0
2	3,7954	552396	0,296	98,5
3	3,8976	569945	0,297	99,0
4	3,7382	548930	0,299	99,6
5	3,8654	569832	0,299	99,8
6	3,7865	556423	0,298	99,5
Trung bình			*0,298*	*99,2*
RSD (%)			*1,6*	

3.2.4. Độ đúng của phương pháp

Độ đúng của phương pháp được xác định bằng phương pháp thêm chuẩn như sau: Thêm một lượng chính xác chuẩn tacrolimus vào nền mẫu thuốc mỡ Protopic, tiến hành xử lý mẫu như ở mục 3.1.2 và phân tích trong các điều kiện sắc ký ở mục 3.1.3. Kết quả thực nghiệm (Bảng 4) cho thấy, tỷ lệ thu hồi (thực hiện với 3 mức nồng độ chuẩn tacrolimus thêm vào nền mẫu) dao động từ 98,2% đến 100,9 %. Như vậy, phương pháp được xây dựng có độ đúng cho phép khi áp dụng định lượng tacrolimus trong chế phẩm thuốc mỡ Protopic và chứng tỏ phương pháp chiết đã nêu ở mục 3.1.2. cho phép chiết hết hoạt chất.

Bảng 4. Kết quả khảo sát độ đúng

Khối lượng thử (g)	Lượng tacrolimus có sẵn trong nền mẫu (µg)	Lượng chuẩn tacrolimus thêm vào (µg)	Diện tích pic (mAU.s)	Tổng lượng tacrolimus tìm thấy (µg)	Lượng chuẩn tacrolimus thu hồi được (µg)	Tỷ lệ thu hồi (%)
0,7745	230,8	24,1	331203	254,6	23,8	99,0
0,7916	235,9	24,1	325090	260,2	24,3	100,9
0,7802	232,5	24,1	333298	256,5	24,0	99,8
0,7799	232,4	48,2	354635	279,7	47,3	98,2
0,7755	231,1	48,2	348842	279,3	48,2	100,0
0,7735	230,5	48,2	357654	278,7	48,2	100,0
0,7674	228,7	72,3	402341	299,8	71,1	98,3
0,7607	226,7	72,3	397661	299,2	72,5	100,3
0,7698	229,4	72,3	405970	301,6	72,2	99,9

3.2.5. Giới hạn định lượng, giới hạn phát hiện

Giới hạn định lượng, giới hạn phát hiện của phương pháp được xác định qua thực nghiệm bằng cách tiêm các dung dịch chuẩn tacrolimus có nồng độ giảm dần vào hệ thống sắc ký cho đến khi không còn đáp ứng pic trên sắc ký đồ. Kết quả thực nghiệm cho thấy, ở nồng độ 15 µg/ml, pic tacrolimus trên sắc ký đồ cao hơn khoảng 10 lần đường nền và ở nồng độ 5 µg/ml, pic tacrolimus trên sắc ký đồ cao hơn khoảng 3 lần so với đường nền. Như vậy phương pháp đã xây dựng có giới hạn định lượng và giới hạn phát hiện với tacrolimus lần lượt là 15 µg/ml và 5 µg/ml.

4. Kết luận

Phương pháp sắc ký lỏng pha đảo đã được thiết lập để định lượng tacrolimus trong chế phẩm dạng thuốc mỡ. Phương pháp đã xây dựng sử dụng cột Apollo C18 (250 × 4,6 mm, 5 µm) được duy trì ở 50°C trong quá trình phân tích. Pha động là hỗn hợp Acetonitril - Methanol - Dung dịch acid formic 0,1 % (10:75:15), tốc độ dòng 1 ml/phút, thể tích tiêm mẫu 20 µl, detector PDA ở bước sóng 210 nm. Phương pháp đã được thẩm định về độ đặc hiệu, khoảng tuyến tính, độ đúng, độ lặp lại, được xác định giới hạn phát hiện, giới hạn định lượng. Kết quả thẩm định cho thấy phương pháp được xây dựng hoàn toàn phù hợp cho việc định lượng tacrolimus trong chế phẩm thuốc mỡ Protopic và có thể áp dụng định lượng hoạt chất này trong các thuốc mỡ có thành phần hoạt chất tương tự.

Tài liệu tham khảo

1. A.Dasgupta, T. G. Timmerman, *Journal of Liquid Chromatograhy & Related Technologies*, tr.95-100, 1995.
2. A. Fujiwara, N. Kihara, S. Koda, K Hane and T. Yasuda, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, tr 278-281, 2006.

SUMMARY

A reversed-phase liquid chromatography method was developed for assay of Tacrolimus in ointment. The method was carried out by using a Apollo C18 column maintained at 50°C during analysis procedure as stationary phase and a mixture of Acetonitrile, Methanol and 0.1% solution of Formic acid (10:75:15) as mobile phase. Flow rate of mobile phase is maintained at 1.0 ml per minute, injection volume: 20 µl, analyte was detected by a PDA detector set at 210 nm. The method was validated in specificity, linear range, accuracy, LOQ and LOD. Validation results proved that the developed method was suitable for assay of Tacrolimus in ointment and was used to determine this active principle in Protopic ointment.

XÂY DỰNG PHƯƠNG PHÁP XÁC ĐỊNH HOẠT LỰC CỦA STREPTODORNASE TRONG CHẾ PHẨM HỖN HỢP CHỨA STREPTOKINASE VÀ STREPTODORNASE

HÀ THỊ MINH CHÂU, TRẦN THỊ THANH HUỆ
NGUYỄN THỊ KIM HƯƠNG, ĐOÀN CAO SƠN
Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương

1. Đặt vấn đề

Streptodornase là enzym thuộc nhóm deoxyribonuclease với cơ chất đặc hiệu là acid deoxyribonuclease (ADN). Enzym Streptodornase là cách viết tắt của enzym deoxyribonuclease từ vi khuẩn tan huyết *Streptococcus sp.* (Streptococcus deoxyribonuclease) [4], [5]. Trước đây các chế phẩm thường chứa đơn thành phần Streptokinase nhưng khi phát hiện ra vai trò tương hỗ nhau trong tăng tác dụng chống viêm và tiêu huyết khối của Streptokinase và Streptodornase thì hai enzym này thường được phối hợp với tỷ lệ 1:4 trong bào chế [1], [2], [3]. Trên thế giới có nhiều phương pháp xác định hoạt lực Streptokinase đã được áp dụng nhưng chưa thực sự có phương pháp xác định hoạt lực của Streptokinase và Streptodornase trong chế phẩm hỗn hợp được đưa vào các dược điển.

Ở Việt Nam, khi dạng thuốc này được nhập khẩu thì các phương pháp cơ sở đã được yêu cầu thẩm định. Tuy vậy, với điều kiện thí nghiệm chưa đầy đủ thì các tiêu