



Kiểm nghiệm một số chỉ tiêu chất lượng của viên nén Arterakine lưu hành tại một số tỉnh của Việt Nam

ASSAY OF THE FIXED COMBINATION ANTIMALARIAL DRUG ARTERAKINE COLLECTED IN SOME PROVINCES OF VIETNAM BY TLC AND HPLC

Nguyễn Thị Minh Thu¹, Lê Thị Hương Hoa²

¹Học viện Y Dược học cổ truyền Việt Nam

²Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương

TÓM TẮT

Nghiên cứu được tiến hành tại Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương từ tháng 3 - 11 năm 2019. Tổng số 35 mẫu Arterakine đã được thu thập tại các cơ sở y tế nhà nước và tư nhân ở 3 tỉnh của Việt Nam gồm Thanh Hóa, Quảng Trị và Bình Phước. Các mẫu đã được định tính và xác định giới hạn hàm lượng hoạt chất bằng sắc ký lớp mỏng (TLC) theo phương pháp Recharđ W.O. Jahnke và định lượng các thành phần hoạt tính bằng phương pháp sắc ký lỏng cao áp (HPLC) theo tiêu chí của nhà sản xuất.

Kết quả cho thấy, tất cả các mẫu đều đạt chỉ tiêu TLC, với vết sắc ký DHA và PQP của mẫu thử và mẫu chuẩn tương đồng nhau về hình dạng, kích thước, cường độ màu sắc và khoảng cách từ tâm vết chấm đến tâm vết sắc đồ. Các giá trị R_fDHA (ở khoảng 0,70 ± 0,2) và R_fPQP (0,55 ± 0,2) của mẫu thử và mẫu chuẩn tương đương nhau, với sai số E_{Rf} của mẫu thử và chuẩn ≤ 5%.

Các mẫu đều đạt chỉ tiêu định lượng bằng HPLC với hàm lượng thành phần hoạt tính đều nằm trong giới hạn 90,0-110,0%; cụ thể hàm lượng DHA từ 36,2 - 39,5 mg/viên (tương ứng 90,5 - 98,8%) và PQP từ 300,7 - 319,0 mg/viên (tương ứng 94,0 - 99,7%).

Từ khóa: Arterakine, dihydroartemisinin (DHA), piperquin phosphat (PQP), sắc ký lớp mỏng (TLC), sắc ký lỏng cao áp (HPLC), định tính, định lượng.

ABSTRACT

This study was conducted at National Institute of Drug Quality Control between March and November, 2019. Total of 35 Arterakine samples was collected from public and private health sectors in 3 provinces of Vietnam including Thanh Hoa, Quang Tri, and Binh Phuoc. All samples were qualified by TLC method and were quantified by HPLC methods according to Recharđ W.O. Jahnke and manufacturer's criteria, respectively.

Ngày nhận bài: 21/12/2020

Ngày phản biện: 23/12/2020

Ngày chấp nhận đăng: 23/12/2020



The results showed that all of them (35/35, 100% samples) passed TLC analyzing with R_f DHA and R_f PQP errors between collected and standard samples (ER_f) $\leq 5\%$ and active compound concentrations be in 80-100% of standard concentration limit. Moreover, all the collected sample chromatography marks had colours, shapes and sizes similar to those of standard chromatography marks. Specially, intensity of colour of collected dihydroartemisinin (DHA) and piperazine phosphate (PQP) chromatography marks was homogeneous with that of 100%- concentration DHA and PQP standard marks.

Furthermore, all of Arterakine samples had active ingredient contents reaching manufacturer's registered criteria (content limits of 90.0 - 110.0%) with DHA and PQP content ranges of 36.2 - 39.5 and 300.7 - 319.0 mg per tablet (90.5 - 98.8% and 94.0 - 99.7% compared to the labelled contents, consecutively).

Keywords: Arterakine, dihydroartemisinin (DHA), piperazine phosphate (PQP), thin layer chromatography (TLC), high performance liquid chromatography (HPLC), qualitative assay, quantitative assay.

ĐẶT VẤN ĐỀ

Hiện nay, tỷ lệ thuốc giả và thuốc kém chất lượng lưu hành trên thị trường đang ngày một gia tăng, không chỉ ở các nước đang phát triển mà cả ở những nước có điều luật rất nghiêm ngặt về thuốc như Mỹ và các nước phương Tây. Điều này đã trở thành mối quan ngại lớn của y tế cộng đồng. Theo đánh giá của Tổ chức y tế thế giới, thuốc giả và kém chất lượng chiếm tới 10% thị trường dược phẩm thế giới, 30 - 50% lượng dược phẩm lưu hành trên thị trường ở một số nước đang phát triển, với doanh thu 45 tỉ euro/năm. Trung bình mỗi năm có khoảng 200.000 người tử vong do thuốc giả. Mọi thuốc đều có thể bị giả mạo, kể cả những thuốc đặc trị các bệnh như tim mạch, đái tháo đường, huyết áp, lao, sốt rét, ... [7]. Do đó, việc thường xuyên đánh giá, kiểm tra chất lượng thuốc là rất cần thiết.

Arterakine có hai thành phần hoạt tính Dihydroartemisinin và piperazine (DHA-PQP), là thuốc sốt rét phối hợp được chỉ định cho điều trị sốt rét do *Plasmodium falciparum* hoặc *P. vivax* và cũng có hiệu quả tốt với sốt rét do các loài *P. malariae*, *P. ovale*, *P. knowlesi*. Hiện nay, DHA-PQP được Bộ Y tế và Chương trình Phòng chống sốt rét Quốc gia Việt Nam khuyến cáo là thuốc

ưu tiên để điều trị sốt rét do *P. falciparum*. Vì thế, DHA-PQP là thuốc sốt rét thiết yếu, có ở tất cả các cơ sở y tế những vùng sốt rét lưu hành [1].

Cho đến nay, rất ít nghiên cứu đầy đủ về chất lượng của thuốc sốt rét nói chung và phối hợp DHA-PQP nói riêng do thuốc mới được đưa vào điều trị sốt rét những năm gần đây. Newton P.N và CS (2007) đã phát hiện được 5 mẫu thuốc dihydroartemisinin (DHA) giả ở châu Phi bằng phương pháp phối khối (MS) hoặc sắc ký lỏng cao áp (HPLC) để xác định độ hòa tan và hàm lượng hoạt chất [8]. Onwujekwe O. và CS (2009) khi đánh giá chất lượng của 225 mẫu thuốc sốt rét trong đó có mẫu DHA đã thấy có 60 mẫu (37%) không đạt tiêu chuẩn Dược điển Mỹ về hàm lượng các thành phần hoạt tính. Các nghiên cứu ở Việt Nam về chất lượng viên nén phối hợp DHA-PQP chưa nhiều. Một số nghiên cứu của Nguyễn Thị Minh Thu và cộng sự đã công bố về độ rã và hàm lượng của thuốc này bằng HPLC. [5][6]

Để góp phần bổ sung thông tin về chất lượng của viên nén phối hợp DHA - PQP đang lưu hành tại Việt Nam, nghiên cứu này được tiến hành nhằm kiểm nghiệm một số chỉ tiêu chất lượng của viên nén Arterakine, gồm: Định tính và bán định lượng bằng sắc ký lớp mỏng (TLC) và định lượng bằng



phương pháp sắc ký lỏng cao áp (HPLC).

ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Địa điểm, thời gian nghiên cứu

Nghiên cứu được tiến hành từ tháng 03-11/2019, tại Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương.

Đối tượng nghiên cứu

Viên nén Arterakine gồm 40 mg DHA và 320 mg PQP, do công ty Dược phẩm Parbaco sản xuất, số lô 17001, hạn dùng 07/3/2021, số đăng ký VD-12944-10. Mẫu thuốc được thu thập tại một số cơ sở y tế Nhà nước và tư nhân thuộc các tỉnh có lưu hành sốt rét của Việt Nam (Thanh Hóa, Quảng Trị và Bình Phước). Các mẫu được lấy ngẫu nhiên theo quy định ở Phụ lục 1 về “Hướng dẫn việc lấy mẫu thuốc, nguyên liệu làm thuốc để xác định chất lượng” trong Thông tư số 11/2018/TT-BYT của Bộ trưởng Bộ Y tế quy định về chất lượng thuốc và nguyên liệu làm thuốc, ban hành ngày 04/5/2018, có hiệu lực thi hành từ ngày 20/6/2018 [2].

Thuốc chuẩn là viên nén gồm 40 mg dihydroartemisinin và 320 mg piperacilin phosphat do Hãng Merck cung cấp, lô A330, hạn dùng 5/2022.

Phương tiện, thiết bị dùng trong nghiên cứu

- Bộ kit GPHF (Global Pharma Health Fund) cung cấp, gồm các dụng cụ như: bàn mỏng silicagel (5 x 10 cm), mao quản 2 μ L, các pipet chia vạch, ống đong, lọ thủy tinh có dung tích khác nhau, bình triển khai sắc ký, các đĩa petri, chày sứ, đèn tử ngoại UV 254 và 365 nm, giấy lọc,...

- Máy sắc ký lỏng cao áp Shimadzu, bộ lọc hút dung môi chân không, bể rửa siêu âm, cân phân tích, tủ hút khí độc.

- Các dụng cụ chuyên dụng khác dùng cho phân tích bằng máy HPLC: bình định mức có nút mài, pipet chia vạch các loại, phễu thủy tinh,...

Hóa chất, chất chuẩn

- Hóa chất dùng trong phân tích mẫu thuốc bằng sắc ký lớp mỏng: Methanol, ethyl acetat, dung dịch acid sulfuric 96%, dung dịch amoniac 25%, dung dịch acid hydrochloric 32 - 36% (tinh khiết, do GPHF – Merck cung cấp), nước cất 1 lần.

- Hóa chất dùng trong phân tích mẫu thuốc bằng HPLC: Acetonitril, dung dịch natri dihydro phosphat (NaH_2PO_4) 0,25M, dung dịch acid acetic 1%, acid phosphoric đặc, nước cất 2 lần.

- Viên nén chuẩn DHA 40 mg và PQP 320 mg do GPHF (Merck) cung cấp.

- Bột DHA và PQP chuẩn (Viện kiểm nghiệm Trung ương), độ tinh khiết 99,98%.

Phương pháp tiến hành

Định tính và xác định giới hạn hàm lượng bằng TLC

Tiến hành theo phương pháp của Rechar W.O. Jahnke và cs [30]. Chuẩn bị các dung dịch chuẩn DHA 80% và 100%; dung dịch chuẩn PQP 80% và 100%. Chấm sắc ký của chất chuẩn và thử trên bản mỏng theo thứ tự.

+ Vị trí số 1: Chuẩn DHA 100% hoặc PQP 100% (giới hạn hàm lượng trên).

+ Vị trí số 2: Chất phân tích 1.

+ Vị trí số 3: Chất phân tích 2.

+ Vị trí số 4: Chuẩn DHA 80% hoặc PQP 80% (giới hạn hàm lượng dưới).

Chạy sắc ký với hệ dung môi gồm 16 ml ethyl acetat, 04 ml methanol và 03 ml dung dịch amoniac đậm đặc (25%).

Phát hiện vết sắc ký

Quan sát bản mỏng bằng đèn tử ngoại ở bước sóng 254 nm. Các vết PQP chuẩn và vết phân tích sẽ xuất hiện với màu xanh tím mờ. Xác định giá trị Rf của PQP.

Tiếp theo, xác định sự có mặt của DHA:

i) Nhúng bản mỏng vào dung môi methanol-



acid sulfuric 96% (19:1), để khô, rồi quan sát dưới ánh sáng tự nhiên, các vết DHA xuất hiện với màu nâu;

ii) Nhúng bản mỏng vào dung môi methanol-acid sulfuric 96% (19:1), để khô, rồi mang vào

buồng tối, quan sát bản sắc ký dưới ánh sáng tử ngoại ở bước sóng 366 nm, các vết DHA phát huỳnh quang màu trắng mờ, còn các vết PQP phát huỳnh quang màu xanh sáng.

- Tính các giá trị R_f chuẩn, R_f phân tích và sai số E_{Rf} :

$$R_f = \frac{\text{Khoảng cách từ tâm của vết chấm đến tâm của vết sắc đồ}}{\text{Khoảng cách từ tâm của vết chấm đến điểm kết thúc dung môi}}$$

$$E_{Rf} = \frac{(R_f \text{ thử} - R_f \text{ chuẩn}) \times 100\%}{R_f \text{ chuẩn}}$$

Định lượng DHA-PQP bằng phương pháp HPLC

Định lượng hàm lượng DHA và PQP trong viên nén Arterakine theo tiêu chuẩn cơ sở [3].

Định lượng DHA ($C_{15}H_{24}O_5$):

* Điều kiện sắc ký:

- Cột LiChrosorb RP 18 (C18) 250 × 4 mm, 5 μm; detector UV 216 nm; pha động: acetonitril - nước cất 70:30, tốc độ dòng 1 - 2 mL/phút; thể tích tiêm mẫu: 100 μL.

* Tiến hành:

Dung dịch thử: Cân chính xác một lượng chế phẩm tương ứng khoảng 60 mg dihydroartemisinin (DHA) vào bình định mức 50 mL, thêm pha động vừa đủ, lắc đều, lọc qua màng lọc 0,45 μL.

Dung dịch chuẩn: Cân chính xác khoảng 60 mg DHA chuẩn vào bình định mức 50 mL, thêm pha động vừa đủ, lắc đều, lọc qua màng lọc 0,45 μL.

Lần lượt tiêm dung dịch chuẩn và dung dịch thử vào hệ thống HPLC. Tính hàm lượng DHA theo diện tích pic.

Định lượng PQP ($C_{29}H_{32}Cl_2N_6 \cdot 4H_3PO_4$):

* Điều kiện sắc ký:

- Cột LiChrosorb RP 18 (C18) 250 × 4 mm, 5 μm; detector UV 210 nm; pha động: NaH_2PO_4 0,25M - acetonitril tỷ lệ 94:6, tốc độ dòng 1,5 mL/phút; thể tích tiêm mẫu: 100 μL.

- Dung dịch đệm NaH_2PO_4 (phân tử lượng

156,01) được chuẩn bị như sau: cân 39,0131g NaH_2PO_4 hòa tan vừa đủ trong 1000 mL nước cất, chỉnh đến pH 2,5 bằng acid phosphoric đặc, lọc qua màng lọc Anow 47 mm, 0,45 μm.

* Tiến hành: Tiến hành tương tự như phần định lượng DHA ở trên.

Dung dịch thử: Cân chính xác một lượng chế phẩm tương ứng khoảng 50 mg piperquin phosphat (PQP) khan vào bình định mức 50 mL, thêm 40 mL acid acetic 1% để hòa tan, sau đó thêm acid acetic 1% vừa đủ đến vạch. Lọc; hút 5,0 mL dịch lọc vào bình định mức 50 mL, thêm acid acetic 1% vừa đủ, lắc đều; lọc qua màng lọc Anow 47 mm, 0,45 μm.

Dung dịch chuẩn: Cân chính xác khoảng 50 mg PQP chuẩn cho vào bình định mức 50 mL, thêm acid acetic 1% vừa đủ đến vạch. Hút 2 mL dịch lọc này cho vào bình định mức 20 mL, thêm acid acetic 1% đến vạch, lắc đều; lọc qua màng lọc Anow 47 mm, 0,45 μm.

Lần lượt tiêm dung dịch chuẩn và dung dịch thử vào hệ thống HPLC. Tính hàm lượng PQP khan theo diện tích pic. [3]

Đánh giá kết quả

Với chỉ tiêu TLC

- **Mẫu phân tích đạt yêu cầu:** Khi vết DHA và PQP của mẫu phân tích tương đồng với vết chuẩn



về 5 tiêu chuẩn sau trên bản sắc ký [10]: khoảng cách từ đường thẳng gốc tới tâm vết chấm: giá trị R_f trong giới hạn $0 \leq R_f \leq 1$ và $E_{Rf} \leq 5\%$; màu sắc: giống nhau; cường độ màu: như nhau; kích thước: như nhau; hình dạng: như nhau.

Với chỉ tiêu HPLC

Mỗi mẫu thử sau khi chạy HPLC sẽ cho các giá trị đặc trưng gồm: thời gian lưu (retention time - Rt), diện tích pic (diện tích dưới đường cong, area under the curve - AUC) và tính được hàm lượng thuốc/viên, % hàm lượng thuốc/viên so với hàm lượng ghi trên nhãn.

Hàm lượng DHA hoặc PQP được coi là đạt nếu nằm trong giới hạn 90,0 - 110,0% hàm lượng ghi trên nhãn (tiêu chuẩn cơ sở) [3].

KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

Định tính bằng TLC

Tổng số 35 mẫu Arterakine (mỗi mẫu có từ 30-50 viên) đã được thu thập tại các cơ sở y tế công và tư trên địa bàn các tỉnh Thanh Hóa, Quảng Trị và Bình Phước. Cả 35 mẫu Arterakine đều được định tính và xác định giới hạn hàm lượng bằng sắc ký lớp mỏng (TLC) theo phương pháp Recharđ W.O. Jahnke. Kết quả cho thấy: Các vết thử DHA hoặc PQP đều tương đồng với vết chuẩn về màu sắc, hình dạng và kích thước. Cường độ màu sắc của vết thử đậm hơn màu của của vết chuẩn nồng độ 80% và tương ứng với màu của vết chuẩn nồng độ 100%. Giá trị Rf của các vết mẫu thử và mẫu chuẩn được thể hiện ở bảng 1 và 2.

Bảng 1. Các giá trị Rf của DHA ở mẫu thử, mẫu chuẩn và sai số E_{Rf-DHA}

Tên mẫu	Rf _{T-DHA}	Rf _{C-DHA}	E _{RF-DHA} (%)	Tên mẫu	Rf _{T-DHA}	Rf _{C-DHA}	E _{RF-DHA} (%)
Mẫu 1	0,69	0,69	0	Mẫu 19	0,71	0,71	0
Mẫu 2	0,69	0,70	1,43	Mẫu 20	0,69	0,68	1,47
Mẫu 3	0,70	0,70	0	Mẫu 21	0,70	0,69	1,45
Mẫu 4	0,71	0,70	1,43	Mẫu 22	0,70	0,70	0
Mẫu 5	0,71	0,71	0	Mẫu 23	0,68	0,68	0
Mẫu 6	0,70	0,70	0	Mẫu 24	0,69	0,69	0
Mẫu 7	0,71	0,71	0	Mẫu 25	0,72	0,72	0
Mẫu 8	0,70	0,70	0	Mẫu 26	0,72	0,71	1,41
Mẫu 9	0,68	0,69	1,45	Mẫu 27	0,72	0,70	2,86
Mẫu 10	0,68	0,68	0	Mẫu 28	0,71	0,71	0
Mẫu 11	0,68	0,68	0	Mẫu 29	0,69	0,70	1,43
Mẫu 12	0,69	0,69	0	Mẫu 30	0,70	0,70	0
Mẫu 13	0,70	0,69	1,45	Mẫu 31	0,71	0,71	0
Mẫu 14	0,72	0,72	0	Mẫu 32	0,69	0,69	0
Mẫu 15	0,71	0,71	0	Mẫu 33	0,70	0,70	0
Mẫu 16	0,72	0,70	2,86	Mẫu 34	0,71	0,71	0
Mẫu 17	0,72	0,71	1,41	Mẫu 35	0,71	0,70	1,43
Mẫu 18	0,71	0,70	1,43				

Ở cả 35 mẫu, giá trị Rf_{T-DHA} và Rf_{C-DHA} tương ứng nhau, sai số E_{RF-DHA} giữa vết thử và vết chuẩn $\leq 5\%$, đạt yêu cầu tiêu chuẩn thử nghiệm DHA bằng TLC.

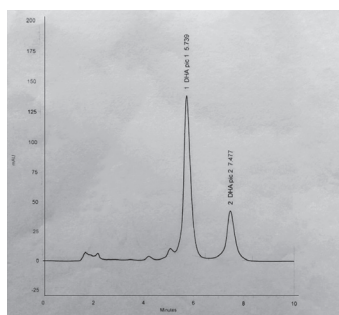
Bảng 2. Các giá trị R_f của PQP ở mẫu thử, mẫu chuẩn và sai số E_{Rf-PQP}

Tên mẫu	$R_{f-T-PQP}$	$R_{f-C-PQP}$	E_{Rf-PQP} (%)	Tên mẫu	$R_{f-T-PQP}$	$R_{f-C-PQP}$	E_{Rf-PQP} (%)
Mẫu 1	0,54	0,54	0	Mẫu 19	0,55	0,56	1,79
Mẫu 2	0,56	0,56	0	Mẫu 20	0,54	0,55	1,82
Mẫu 3	0,56	0,55	1,82	Mẫu 21	0,54	0,54	0
Mẫu 4	0,55	0,55	0	Mẫu 22	0,55	0,55	0
Mẫu 5	0,56	0,56	0	Mẫu 23	0,56	0,56	0
Mẫu 6	0,54	0,54	0	Mẫu 24	0,55	0,54	1,85
Mẫu 7	0,56	0,54	3,70	Mẫu 25	0,53	0,54	1,85
Mẫu 8	0,56	0,55	1,82	Mẫu 26	0,53	0,53	0
Mẫu 9	0,54	0,54	0	Mẫu 27	0,55	0,55	0
Mẫu 10	0,54	0,55	1,82	Mẫu 28	0,54	0,56	3,57
Mẫu 11	0,55	0,56	1,79	Mẫu 29	0,56	0,56	0
Mẫu 12	0,55	0,56	1,79	Mẫu 30	0,53	0,54	1,85
Mẫu 13	0,54	0,55	1,82	Mẫu 31	0,54	0,54	0
Mẫu 14	0,56	0,56	0	Mẫu 32	0,55	0,55	0
Mẫu 15	0,57	0,56	1,79	Mẫu 33	0,53	0,53	0
Mẫu 16	0,56	0,56	0	Mẫu 34	0,56	0,56	0
Mẫu 17	0,55	0,54	1,85	Mẫu 35	0,55	0,54	1,85
Mẫu 18	0,56	0,54	3,70				

Bảng 2 cho thấy, các giá trị R_{fT-PQP} và R_{fC-PQP} tương ứng nhau, sai số E_{Rf-PQP} giữa vết thử và vết chuẩn $\leq 5\%$ đạt yêu cầu tiêu chuẩn thử nghiệm PQP bằng TLC.

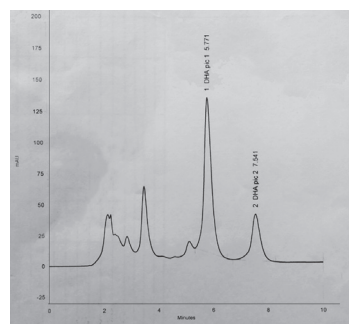
Định tính và định lượng bằng HPLC

Ba lăm (35) mẫu Arterakine đã được phân tích định tính và định lượng bằng phương pháp HPLC.

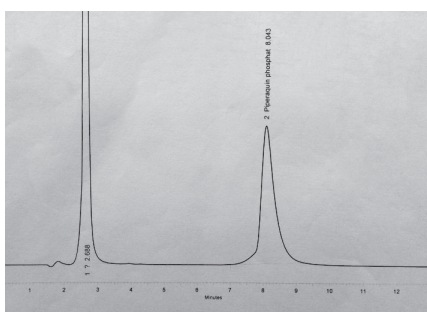


Hình 1a. Sắc ký đồ của DHA chuẩn

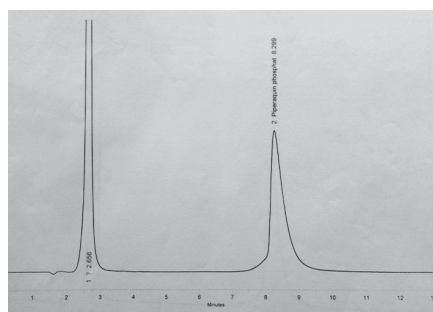
Kết quả cho thấy, các sắc ký đồ của DHA và PQP ở các mẫu thử đều có thời gian lưu tương ứng với thời gian lưu của DHA và PQP chuẩn. DHA có 2 pic sắc ký tương ứng với thời gian lưu ở 5,7 và 7,4 phút (hình 1a và 1b); còn PQP có 1 pic sắc ký xuất hiện ở khoảng 8,0 phút (hình 2a và 2b).



Hình 1b. Sắc ký đồ của DHA trong viên nén Arterakine của 1 mẫu thử



Hình 2a. Sắc ký đồ của PQP chuẩn



Hình 2b. Sắc đồ của PQP trong viên nén Arterakine của 1 mẫu thử

Kết quả định lượng mẫu thử 01 và các mẫu còn lại được thể hiện ở các bảng từ 3-6 sau đây.

Bảng 3. Kết quả định lượng DHA trong mẫu viên nén Arterakine 01

Mẫu	Thời gian lưu Rt _{1-DHA} (phút)	Thời gian lưu Rt _{2-DHA} (phút)	Diện tích pic 1 (AUC _{1-DHA})	Diện tích pic 2 (AUC _{2-DHA})	Tổng AUC của DHA	Hàm lượng DHA (mg/viên)	% so với hàm lượng trên nhãn
Chuẩn DHA	5,739	7,477	2531440	1001939	3533379		
Mẫu thử 01-L1	5,747	7,458	2496512	966575	3463087	39,2	98,0
Mẫu thử 01-L2	5,769	7,466	2447983	873902	3321885	37,6	94,0
Mẫu thử 01-L3	5,732	7,478	2468038	910023	3378061	38,2	95,5
Trung bình					3387677,7	38,3	95,8

Mẫu viên nén Arterakine 01 có hàm lượng DHA trung bình trong 1 viên là 38,3 mg, chiếm 95,8% so với hàm lượng ghi trên nhãn, đạt tiêu chuẩn cơ sở về giới hạn hàm lượng DHA từ 90,0 - 110,0%.

Bảng 4. Kết quả định lượng DHA trong viên nén Arterakine của 35 mẫu

Tên mẫu	Hàm lượng DHA (mg/viên)	% so với hàm lượng trên nhãn	Tên mẫu	Hàm lượng DHA (mg/viên)	% so với hàm lượng trên nhãn
Mẫu 1	38,3	95,8	Mẫu 19	38,8	97,0
Mẫu 2	36,9	92,3	Mẫu 20	39,4	98,5
Mẫu 3	38,1	95,3	Mẫu 21	36,8	92,0
Mẫu 4	39,4	98,5	Mẫu 22	36,7	91,8
Mẫu 5	36,2	90,5	Mẫu 23	39,3	98,3
Mẫu 6	37,5	93,8	Mẫu 24	39,5	98,8
Mẫu 7	38,8	97,0	Mẫu 25	37,8	94,5



Mẫu 8	37,7	94,3	Mẫu 26	37,6	94,0
Mẫu 9	38,6	96,5	Mẫu 27	37,5	93,8
Mẫu 10	37,9	94,8	Mẫu 28	39,0	97,5
Mẫu 11	38,4	96,0	Mẫu 29	39,2	98,0
Mẫu 12	38,9	97,3	Mẫu 30	37,0	92,5
Mẫu 13	36,7	91,8	Mẫu 31	37,4	93,5
Mẫu 14	37,6	94,0	Mẫu 32	38,0	95,0
Mẫu 15	37,1	92,8	Mẫu 33	38,2	95,5
Mẫu 16	38,2	95,5	Mẫu 34	36,6	91,5
Mẫu 17	38,7	96,8	Mẫu 35	37,6	94,0
Mẫu 18	39,2	98,0			

Hàm lượng DHA trong cả 35 mẫu Arterakine đều nằm trong giới hạn 90,0-110,0% so với hàm lượng ghi trên nhãn, đạt tiêu chuẩn cơ sở.

Bảng 5. Kết quả định lượng PQP trong viên nén Arterakine mẫu 01

Mẫu	Thời gian lưu Rt _{PQP} (phút)	Diện tích pic (AUC _{PQP})	Hàm lượng PQP (mg/viên)	% so với hàm lượng trên nhãn
Chuẩn PQP	8,043	11021736		
Thử 01-L1	8,235	11910324	318,3	99,5
Thử 01-L2	8,451	11825649	317,5	99,2
Thử 01-L3	8,337	11710952	315,2	98,5
Trung bình			317,0	99,1

Hàm lượng trung bình của PQP trong viên nén Arterakine mẫu 01 là 317,0 mg/viên, chiếm 99,1% so với hàm lượng ghi trên nhãn, đạt tiêu chuẩn cơ sở về giới hạn hàm lượng PQP từ 90,0 - 110,0%.

Bảng 6. Kết quả định lượng PQP trong 35 mẫu viên nén Arterakine

Tên mẫu	Hàm lượng PQP (mg/viên)	% so với hàm lượng trên nhãn	Tên mẫu	Hàm lượng PQP (mg/viên)	% so với hàm lượng trên nhãn
Mẫu 1	317,0	99,1	Mẫu 19	311,7	97,4
Mẫu 2	315,1	98,5	Mẫu 20	314,6	98,3
Mẫu 3	316,8	99,0	Mẫu 21	300,9	94,0
Mẫu 4	313,7	98,0	Mẫu 22	319,0	99,7
Mẫu 5	314,9	98,4	Mẫu 23	307,8	96,2
Mẫu 6	316,3	98,8	Mẫu 24	315,0	98,4
Mẫu 7	305,8	95,6	Mẫu 25	315,6	98,6
Mẫu 8	315,5	98,6	Mẫu 26	314,9	98,4
Mẫu 9	315,7	98,7	Mẫu 27	316,6	98,9



Mẫu 10	314,8	98,4	Mẫu 28	300,7	94,0
Mẫu 11	315,8	98,7	Mẫu 29	312,4	97,6
Mẫu 12	312,2	97,6	Mẫu 30	309,2	96,6
Mẫu 13	311,7	97,4	Mẫu 31	307,4	96,1
Mẫu 14	308,2	96,3	Mẫu 32	317,7	99,3
Mẫu 15	318,2	99,4	Mẫu 33	318,6	99,6
Mẫu 16	311,9	97,5	Mẫu 34	309,4	96,7
Mẫu 17	306,5	95,8	Mẫu 35	314,5	98,3
Mẫu 18	314,1	98,2			

Bảng 6 cho thấy, các mẫu đều có hàm lượng PQP nằm trong giới hạn 90,0-110,0% so với hàm lượng ghi trên nhãn, đạt tiêu chuẩn cơ sở.

BÀN LUẬN

Định tính bằng TLC

Phương pháp định tính bằng sắc ký lớp mỏng (TLC) cho biết thuốc có chứa hoạt chất cần xác định hay không. Trong nghiên cứu này, ngoài việc định tính DHA và PQP, các hoạt chất của mẫu thử còn được sơ bộ xác định hàm lượng bằng cách so sánh cường độ màu sắc của vết sắc ký với các vết chuẩn DHA hoặc PQP có nồng độ 80 và 100%. Phương pháp này đã được Recharđ W.O. Jahnke và CS mô tả ở tài liệu [10] và được áp dụng ở gần 100 nước trên thế giới để đánh giá sàng lọc nhanh chất lượng thuốc lưu hành. Tuy nhiên, nhược điểm của phương pháp là chưa thể xác định chính xác hàm lượng hoạt chất.

Kết quả nghiên cứu cho thấy, các vết thử DHA hoặc PQP đều tương đồng với vết chuẩn về màu sắc, hình dạng và kích thước. Cường độ màu sắc của vết thử đậm hơn màu của của vết chuẩn nồng độ 80% và tương ứng với màu của vết chuẩn nồng độ 100%. Các giá trị $R_{f_{DHA}}$ (ở khoảng $0,70 \pm 0,2$) và $R_{f_{PQP}}$ ($0,55 \pm 0,2$) của mẫu thử và mẫu chuẩn tương đương nhau, với sai số E_{Rf} của mẫu thử và chuẩn $\leq 5\%$ (đạt yêu cầu về sai số cho phép). Chứng tỏ, cả 35 mẫu đều chứa hai hoạt chất DHA

và PQP, hàm lượng các thành phần này nằm trong giới hạn 80-100%.

Các kết quả trên cũng phù hợp với nghiên cứu trước đó của Nguyễn Thị Minh Thu và CS khi đánh giá chất lượng thuốc sốt rét nói chung, trong đó có thuốc phối hợp DHA-PQP [4], [5], [6].

Do chỉ có tác dụng đánh giá ở mức độ sàng lọc, nên các mẫu sau đó cần được phân tích bằng các kỹ thuật cao để kết luận chính xác về chất lượng thuốc như: Xác định độ hòa tan và định lượng bằng HPLC, xác định hoạt chất bằng phương pháp khối phổ,...

Định tính và định lượng bằng HPLC

Phương pháp phân tích bằng HPLC cho kết quả với độ chính xác cao về sự có mặt và hàm lượng các thành phần hoạt tính. Việc phân tích DHA và PQP được thực hiện với các điều kiện sắc ký khác nhau để đảm bảo cho kết quả tách sắc ký tốt nhất.

Trong nghiên cứu này, sắc đồ của DHA ở mẫu thử và mẫu chuẩn đều tách thành 2 pic sắc ký riêng biệt với thời gian lưu ở khoảng 5,7 và 7,4 phút (hình 1a và 1b). Như vậy, các mẫu thử đều có chứa hoạt chất DHA. Kết quả này phù hợp với kết quả định tính bằng TLC. Tuy nhiên, ngoài 2 vết sắc ký chính tương ứng với vị trí của DHA, sắc đồ của mẫu thử còn có các pic xuất hiện ở thời gian lưu $R_t = 2,2-3,8$ phút. Điều này là do ngoài DHA, các mẫu thử còn có thêm thành phần PQP và các tá dược nên sắc đồ có thêm các pic này trong điều kiện pha động và



điều kiện sắc ký đã chạy.

Sắc đồ của PQP ở các mẫu chuẩn và thử đều xuất hiện ở khoảng $R_t = 8,0$ phút (hình 2a và 2b), cho thấy các mẫu thử đều chứa hoạt chất PQP. Kết quả này cũng phù hợp với kết quả định tính bằng TLC.

Hàm lượng DHA và PQP trong 35 mẫu thử đều nằm trong giới hạn từ 90,0-110,0%, đạt tiêu chuẩn cơ sở TCCS Z₁-14-04, 2004 [3]. Kết quả trên phù hợp với kết quả sơ bộ xác định giới hạn hàm lượng hoạt chất (80-100%) bằng TLC dựa trên việc so sánh cường độ màu của vết sắc ký.

Các nghiên cứu trước đó của Viện Sốt rét - KST - CT Trung ương cũng cho kết quả tương tự khi đánh giá chất lượng thuốc phối hợp DHA-PQP tại các tỉnh của Việt Nam từ năm 2005-2014, trong đó chỉ có 01 mẫu thuốc phối hợp DHA-PQP được coi là kém chất lượng do không đạt yêu cầu về độ rã (viên thuốc chỉ trương nở mà không rã ra trong thời gian quy định) [6].

So với các nghiên cứu trên thế giới, đặc biệt nghiên cứu về chất lượng thuốc sốt rét nói chung và chất lượng thuốc phối hợp DHA-PQP nói riêng tại châu Phi, tỷ lệ thuốc kém chất lượng của Việt Nam ít hơn rất nhiều lần.

Onwujekwe O. và CS (2009) đã tiến hành đánh giá chất lượng các thuốc sốt rét thu thập tại các cơ sở y tế công và tư nhân ở 6 thị trấn ở Đông Nam Nigeria bằng sắc ký lỏng cao áp (phân tích độ hoà tan và hàm lượng các thành phần hoạt tính). Trong 225 mẫu thuốc sốt rét (bao gồm cả DHA), có 60 mẫu (37%) không đạt tiêu chuẩn Dược điển Mỹ về hàm lượng các thành phần hoạt tính và 78% số thuốc kém chất lượng được thu mua từ các cơ sở y tế tư nhân. [9]

Newton P.N và CS khi phân tích bằng sắc ký lỏng cao áp cho thấy, trong 2 mẫu viên nén dihydroartemisinin (Cotecxin™) thu thập tại Kenya năm 2007, một mẫu có hàm lượng DHA

101%, mẫu còn lại không chứa DHA. Bao bì của hai mẫu này khá giống nhau. Đường kính của viên thuốc giả và nền vi thuốc giả rộng hơn, màu cam nhạt hơn so với thuốc thật. Cả 3 mẫu DHA thu thập ở Tây Phi năm 2008 đều có 01 viên với hàm lượng DHA nằm ngoài giới hạn cho phép. Phân tích bằng phổ khối, các tác giả đã phát hiện một mẫu DHA thu thập ở Nigeria là thuốc giả, chỉ chứa paracetamol (acetaminophen). [8]

Như vậy, với các nghiên cứu về định tính và xác định giới hạn hàm lượng hoạt chất bằng TLC và định lượng hàm lượng hoạt chất bằng HPLC, có thể kết luận cả 35 mẫu viên nén Arterakine đều đạt chỉ tiêu chất lượng theo tiêu chuẩn cơ sở TCCS Z₁-14-04, 2004.

KẾT LUẬN

Đã kiểm nghiệm một số chỉ tiêu chất lượng của 35 mẫu viên nén phối hợp Arterakine (40 mg DHA- 320 mg PQP) do Công ty Pharbaco sản xuất, được thu thập tại các cơ sở y tế nhà nước và tư nhân thuộc 3 tỉnh Thanh Hóa, Quảng Trị và Bình Phước theo tiêu chuẩn cơ sở TCCS Z₁-14-04, 2004. Kết quả cho thấy:

- Tất cả các mẫu đều đạt chỉ tiêu định tính và xác định giới hạn hàm lượng bằng sắc ký lớp mỏng, với vết sắc ký DHA và PQP của mẫu thử và mẫu chuẩn tương đồng nhau về hình dạng, kích thước, cường độ màu sắc và khoảng cách từ tâm vết chấm đến tâm vết sắc đồ. Các giá trị $R_{f_{DHA}}$ (ở khoảng $0,70 \pm 0,2$) và $R_{f_{PQP}}$ ($0,55 \pm 0,2$) của mẫu thử và mẫu chuẩn tương đương nhau, với sai số E_{Rf} của mẫu thử và chuẩn $\leq 5\%$.

- Các mẫu đều đạt chỉ tiêu định lượng bằng HPLC với thời gian lưu $R_{t_{DHA}} = 5,7$ và $7,4$ phút, $R_{t_{PQP}} = 8,0$ phút và hàm lượng hoạt chất DHA và PQP trong mẫu thử đều nằm trong giới hạn 90,0-110,0%.



LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu được tài trợ bởi Chương trình Phòng chống Sốt rét Quốc gia Việt Nam và Hội đồng Dược điển Mỹ. Chúng tôi xin trân trọng cảm ơn sự phối hợp của cán bộ Viện Sốt rét - KST - CT Trung ương và Trung tâm Phòng chống sốt rét các tỉnh Thanh Hóa, Quảng Trị và Bình Phước trong công tác thu thập mẫu. Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương tham gia phân tích mẫu.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Bộ Y tế (2016)**, *Hướng dẫn chẩn đoán, điều trị và phòng bệnh sốt rét*, Ban hành kèm theo quyết định số 4845/QĐ-BYT ngày 08 tháng 9 năm 2016 của Bộ trưởng Bộ Y tế.
- Bộ Y tế (2018)**, “*Thông tư quy định về chất lượng thuốc và nguyên liệu làm thuốc*”, số 11/2018/TT-BYT của Bộ trưởng Bộ Y tế, ban hành ngày 04/5/2018, có hiệu lực thi hành từ ngày 20/6/2018.
- Xí nghiệp Dược phẩm Trung ương I (2004)**, *Tiêu chuẩn cơ sở viên nén bao phim Arterakine*, số TC 04Z₁-14-04.
- Nguyễn Thị Minh Thu, Trần Thanh Dương, Bùi Quang Phúc, Trịnh Ngọc Hải, Vương Tuấn Anh, Souly Phanouvong (2014)**, “Nghiên cứu về chất lượng, sự phổ biến thuốc sốt rét và một số kháng sinh tại một số tỉnh ở Việt Nam năm 2013”, *Tạp chí Phòng chống bệnh sốt rét và các bệnh ký sinh trùng*, số 2, tr. 75-82.
- Nguyễn Thị Minh Thu, Trịnh Ngọc Hải, Nguyễn Mạnh Hùng, Trần Thanh Dương, Bùi Quang Phúc, Vương Tuấn Anh, Souly Phanouvong (2014)**, “Đánh giá chất lượng thuốc chống lây nhiễm tại một số tỉnh ở Việt Nam giai đoạn từ cuối 2009 - 2013”, *Tạp chí Phòng chống bệnh sốt rét và các bệnh ký sinh trùng*, số 3, tr. 42-49.
- Nguyễn Thị Minh Thu, Trịnh Ngọc Hải, Trần Thanh Dương, Souly Phanouvong, Nguyễn Mạnh Hùng, Bùi Quang Phúc, Vương Tuấn Anh, Nguyễn Đăng Lâm (2015)**, “Đánh giá chất lượng thuốc chống lây nhiễm tại một số tỉnh ở Việt Nam từ năm 2005 đến 2014”, *Công trình nghiên cứu khoa học báo cáo tại Hội nghị khoa học toàn quốc chuyên ngành sốt rét - ký sinh trùng - côn trùng năm 2015*, Nhà xuất bản Y học, tr. 38-48.
- Albert IW., Nicole MC., Thomas S. (2003)**, “Counterfeit pharmaceuticals: current status and future projections”, *Journal of the American pharmacists Association*, 43(6).
- Newton PN., Green MD., Mildenhall DC., Plancon A., Nettey H., Nyadong L., Hostetler DM. et al (2011)**, “Poor quality vital antimalarials in Africa - an urgent neglected public health priority”, *Malaria Journal*, 10:352.
- Onwujekwe O., Kaur H., Dike N., Shu E., Uzochukwu B., Hanson K., Okoye V., Okonwo P. (2009)**, “Quality of antimalarial drugs provided by public and private healthcare providers in Southeast Nigeria”, *Malaria Journal*, 10; 8:22.
- Rechard W.O. Jahnke, Kornelia Dwornik and Souly Phanouvong (2011)**, *A concise quality control guide on essential drugs and other medicines*, Vol.2, supplement 2011, published by Global Pharma Health Fund (GPHF), Germany, pp. 16-19.