

**NGHIÊN CỨU XÁC ĐỊNH ĐỒNG THỜI CYTIDINE 5'-MONOPHOSPHATE
DISODIUM VÀ URIDINE 5'- MONOPHOSPHATE DISODIUM
TRONG THUỐC TIÊM ĐÔNG KHÔ BẰNG PHƯƠNG PHÁP
SẮC KÝ LỎNG HIỆU NĂNG CAO (HPLC)**

Đến tòa soạn 25 – 5 – 2015

Trần Đình Khải

Công ty dược trang thiết bị y tế Bình Định

Cao Văn Hoàng

Khoa Hóa học trường Đại học Quy Nhơn

Dương Thị Tú Anh

Khoa Hóa học - trường Đại học Sư phạm - ĐH Thái Nguyên

SUMMARY

**STUDY ON THE SIMULTANEOUS DETERMINE CYTIDINE 5'-
MONOPHOSPHATE DISODIUM AND URIDINE 5'- MONOPHOSPHATE DISODIUM
IN THE LYOPHILIZED INJECTION BY HIGH PERFORMANCE LIQUID
CHROMATOGRAPHY (HPLC) METHOD**

A method is described for the determination of cytidine 5'-monophosphate disodium (CMP) and uridine 5'-monophosphate disodium (UMP) in the lyophilized injection by High Performance Liquid Chromatography (HPLC). The optimal condition for the determination of (CMP) and (UMP) were found: The mobile phase composition $KH_2PO_4(0,01M): H_2O$ was (95:5); the flow rate of the mobile phase was 1mL/min, the column oven was maintained at 26°C. Under suitable conditions, the method gained high reproducibility of the CMP and UMP peak current: $RSD = 2\%$ ($n=6$), and low limit of detection (3σ): 0.01ppm for the CMP and UMP, and recoveries for the CMP and UMP are in the range of 99,0% to 100,4%. The developed approach is applied for the determination of the trace amounts of the CMP and UMP in the lyophilized injection in Vietnam.

1. MỞ ĐẦU

Cytidine 5'-monophosphate disodium (CMP) là hoạt chất cần thiết cho tổng hợp

phức chất lipid và lipoprotein lập thành phần cấu tạo hệ thống thần kinh; uridine 5'-monophosphate disodium (UMP) là

nguồn cung cấp năng lượng và có tác động dinh dưỡng mô thần kinh và sợi cơ bổ sung cho tác động của CMP và UMP giúp tái tạo thần kinh ngoại biên [1,2,3]. Trong trường hợp thoái hóa thần kinh, xảy ra tình trạng hủy men myelin thì sự tổng hợp proteolipid cần cho quá trình tái tạo lại myelin. Trong những trường hợp này, CMP và UMP giúp tái tạo sợi trục và màng của sợi trục thần kinh. CMP làm trung gian cho quá trình tổng hợp các lipid phức tạp là một thành phần cấu tạo màng tế bào thần kinh, đặc biệt sphingomyelin, tiền chất lớp bao myelin. CMP cũng là tiền thân của các acid nucleic (ADN và ARN), là yếu tố cơ bản của sự chuyển hóa tế bào như trong quá trình tổng hợp protein [4,5,6,7]. UMP tác động như coenzyme trong quá trình tổng hợp glycolipid của cấu trúc neuron và lớp bao myelin, bổ sung hoạt động của CMP. Với vai trò quan trọng của CMP và UMP, việc nghiên cứu qui trình xác định hàm lượng của chúng rất quan trọng.

Hiện nay, trên thị trường ở nước ta, đang lưu hành một số loại thuốc chứa đồng thời 2 hoạt chất CMP và UMP, nhưng cho đến nay, quy trình bào chế các loại thuốc đó chưa được đưa ra trong các Dược điển Việt Nam, Dược điển Anh, Mỹ và Châu Âu. Mặt khác, quy trình phân tích riêng và phân tích đồng thời CMP và UMP cũng chưa được công bố trong các dược điển nói trên. Rõ ràng, để phục vụ công tác kiểm nghiệm dược phẩm, việc nghiên cứu xây dựng quy trình phân tích riêng và đặc biệt là phân tích đồng thời 2 hoạt chất trên trong các loại thuốc là rất cấp thiết. Bài báo này trình bày kết quả nghiên cứu xác định đồng thời cytidine 5'-monophosphate disodium và

uridine 5'- monophosphate disodium trong thuốc tiêm đông khô bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao.

2. HÓA CHẤT VÀ THIẾT BỊ

2.1. Hóa chất

-Các hóa chất sử dụng là loại tinh khiết dùng cho HPLC của Merck (Đức), Sigma Aldrich: KH_2PO_4 ,...

-Tráng rửa dụng cụ bằng nước cất 2 lần.

-Chất chuẩn: CMP (hàm lượng 99,90%) của hãng Sigma Aldrich, Mỹ; Lô: 041M0146V. UPM (hàm lượng 99,30%) của hãng Sigma Aldrich, Mỹ;

2.2. Thiết bị và dụng cụ

-Hệ thống HPLC Series 20A và các phụ kiện đi kèm của hãng Shimadzu, Nhật Bản; cột sắc ký pha đảo C18, 250 x 4,6 mm (dài x đường kính trong); kích thước hạt nhỏ 5 μm ; Hãng Merck, Đức.

- Máy UV - Vis 8453 Agilent và các phụ kiện đi kèm của hãng Agilent, Nhật Bản;

- Cân phân tích HM202 ($\pm 0,01$ mg) của hãng AND, Nhật Bản;

- Bộ lọc hút chân không; màng lọc thủy tinh 0,45 μm ;

- Các thiết bị khác: tủ sấy, máy lắc, bể chưng cách thủy, máy cất nước hai lần, thiết bị lọc nước siêu sạch, phễu Buchner...

- Các dụng cụ thủy tinh: bình định mức các loại, pipet vạch và pipet bầu các loại, cốc mô, syranh lọc mẫu, micropipet các loại (0,5-10 μL , 10-100 μL , 100-1000 μL ,...).

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

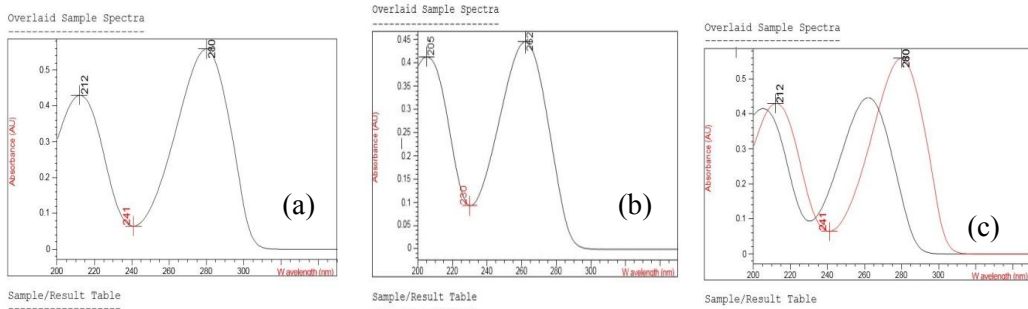
3.1. Xác định bước sóng phát hiện

Tiến hành đo độ hấp thụ quang (Abs) của dung dịch chuẩn CMP và UMP trong dải bước sóng (λ) 190 - 300 nm, thu được kết quả ở hình 1. Kết quả cho thấy, CMP và

UPM có độ hấp thụ cực đại tương ứng ở bước sóng 269 nm và 262 nm.

Khi sử dụng detector DAD, có thể chọn một bước sóng (mà tại đó phổ của các chất phân tích xen phủ nhau) để định lượng đồng thời các chất. Do không có bước sóng cực đại chung cho 2 chất nêu trên, nên có

thể sử dụng một bước sóng mà tại đó độ hấp thụ quang (Abs) của 2 chất đều đủ lớn. Hình 1 cho thấy, khoảng bước sóng thích hợp là 262 – 269 nm. Trong khoảng bước sóng đó, bước sóng 262 nm được chọn cho các thí nghiệm tiếp theo.

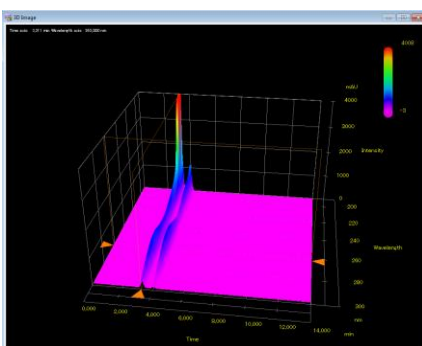


Hình.1. Phổ UV - Vis của dung dịch chuẩn CMP (trong nước) (a); dung dịch chuẩn UPM (trong nước) (b) và dung dịch hỗn hợp 2 chất chuẩn (c)

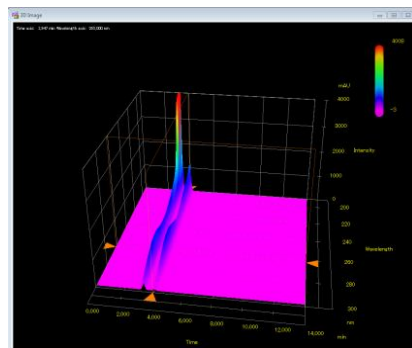
Để thu được những kết quả rõ nét hơn, chúng tôi tiến hành ghi phổ UV-Vis 3D của dung dịch chuẩn CMP và dung dịch chuẩn UPM. Kết quả được thể hiện trên hình 2.a và 2.b:

Kết quả phân tích cho thấy bước sóng cực đại cũng giống với bước sóng cực đại ở phổ

UV-Vis 2D của 2 chất chuẩn CMP và UPM. Ở phổ 3D cho thấy các dải phổ rất bé, đỉnh pic rất cao và nhọn, điều đó cho phép xác định bước sóng cực đại chính xác hơn so với phổ UV-Vis 2D.



Hình 2.a. Phổ UV - Vis 3D của dung dịch chuẩn CMP



Hình2.b. Phổ UV - Vis 3D của dung dịch chuẩn UPM

3.2. Ảnh hưởng của thành phần pha động

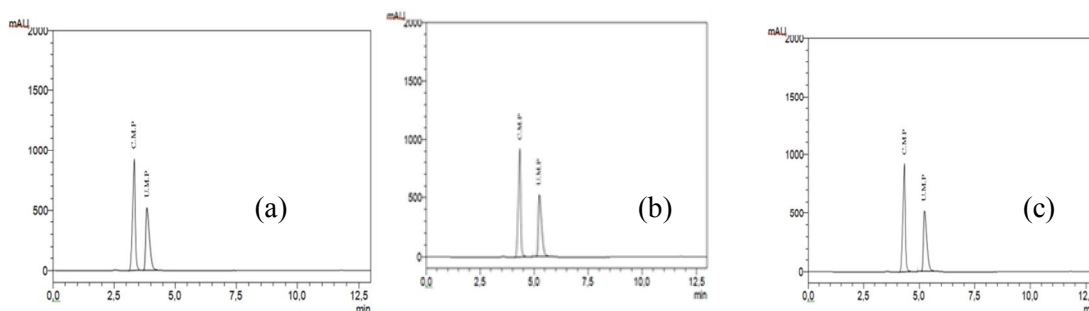
Trong nghiên cứu này chúng tôi chỉ nghiên cứu thành phần pha động là dung dịch hỗn

hợp KH_2PO_4 0,01M và nước. Pha động với 3 hệ có tỉ lệ thể tích thành phần 1 (KH_2PO_4 0,01 M) : thành phần 2 (nước) khác nhau:

(a) Dung dịch KH_2PO_4 0,01 M : nước = 100 : 0

(b) Dung dịch KH_2PO_4 0,01 M : nước = 90:10

(c) Dung dịch KH_2PO_4 0,01 M : nước = 95:05



Hình 3. Thành phần pha động với tỷ lệ khác nhau của dung dịch Kali dihydro phosphatee 0,01 M và nước

Kết quả hình 3 cho thấy:

- Hệ dung môi (a) (KH_2PO_4 0,01 M : nước = 100 : 0) tách được hoàn toàn 2 pic với hệ số đối xứng tốt ($T < 1,2$), số đĩa lý thuyết lớn ($N > 26.000$). Tuy nhiên, do đường nền trong trường hợp này xấu, nên làm giảm độ phân giải các pic, dẫn đến độ tách 2 pic chưa tốt (độ phân giải pic nhỏ với $R < 2$) và như vậy, gây khó khăn cho việc định lượng.

- Hệ dung môi (b) (KH_2PO_4 0,01 M : nước = 90:10) cho phép tách được hoàn toàn 2 pic độ phân giải cao ($R = 3,85$), số đĩa lý thuyết lớn ($N > 20.000$). Tuy nhiên hệ dung môi này cho ra 2 pic có độ đối xứng kém với hệ số đối xứng lệch nhiều so với giá trị 1 (T đối với CMP và UMP tương

ứng là 0,886 và 1,452) và do vậy, cũng gây khó khăn cho định lượng.

- Hệ dung môi (c) (KH_2PO_4 0,01 M : nước = 95 : 5), 2 pic của CMP và UMP được tách hoàn toàn với hệ số đối xứng tốt ($T < 1,2$), độ phân giải cao ($R = 2,89 > 2$), số đĩa lý thuyết lớn ($N > 23.000$) điều này đạt yêu cầu cho phân tích định lượng. Vì vậy, hệ dung môi (c) được chọn làm pha động cho các nghiên cứu tiếp theo.

3.3. Ảnh hưởng của tốc độ dòng pha động (u)

Tiến hành khảo sát ảnh hưởng của tốc độ dòng pha động (u) với các tốc độ khác nhau: 1,0 mL/phút; 1,5 mL/phút và 1,6 mL/phút, thu được kết quả ở bảng 1.

Bảng 1. Kết quả khảo sát ảnh hưởng của tốc độ dòng pha động (*)

Tốc độ pha động (u)	Thông số	Chất phân tích	
		CMP	UMP
1,0 mL/phút	Thời gian lưu, phút	3,25	3,94
	Hệ số đối xứng	0,995	1,132
	Độ phân giải	-	2,89
	Số đĩa LT	23149	25808
1,5 mL/phút	Thời gian lưu, phút	3,01	3,62
	Hệ số đối xứng	0,989	1,125

Tốc độ pha động (u)	Thông số	Chất phân tích	
		CMP	UMP
1,6 mL/phút	Độ phân giải	-	1,48
	Số đĩa LT	24149	24808
	Thời gian lưu, phút	2,89	3,48
	Hệ số đối xứng	0,995	1,118
1,6 mL/phút	Độ phân giải	-	1,35
	Số đĩa LT	24215	24325

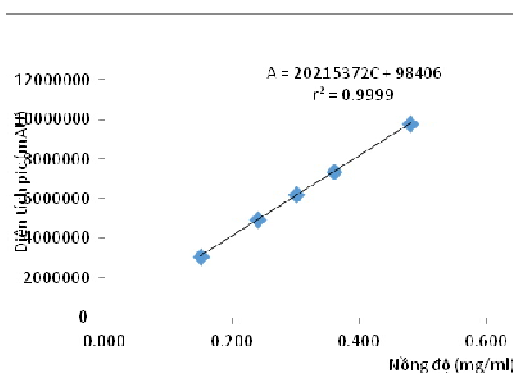
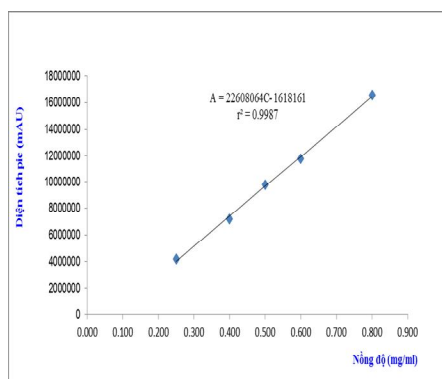
(*) ĐKTN: CMP 0,5000 mg/mL; UMP 0,3000 mg/mL; thành phần pha động: KH_2PO_4 0,01M : Nước = 95 : 5; Các ĐKTN khác như ở ĐKTN (1)**

3.4. Khoảng tuyến tính, giới hạn phát hiện và giới hạn định lượng của phương pháp HPLC

Kết quả khảo sát tương quan tuyến tính giữa diện tích pic (A) và nồng độ chất phân tích (C) trong dung dịch chuẩn chứa hỗn hợp 2 chất phân tích, thu được ở bảng 2 và hình 4 cho thấy:

Trong khoảng nồng độ 0,25 - 0,8 mg/mL đối với CMP và 0,15 - 0,48 mg/mL đối với UMP,

giữa diện tích pic (A) và nồng độ chất phân tích (C) có tương quan tuyến tính tốt với $R \geq 0,999$. Do nồng độ CMP và UMP trong các mẫu thuốc thực tế (đang sử dụng trên thị trường hiện nay) thường dao động trong khoảng nồng độ trên, nên các đường chuẩn ở hình 5 được sử dụng để định lượng CMP và UMP trong các mẫu thực tế.



Hình 4. Đường hồi quy tuyến tính của CMP (a) và UMP (b)

Tiến hành xác định giới hạn phát hiện (LOD) của phương pháp HPLC dùng detector DAD theo quy tắc 3σ [4], [5], giới hạn định lượng (LOQ) của phương pháp theo quy tắc 10σ [5], [6] và áp dụng hồi quy tuyến tính để tính toán

LOD. Đường hồi quy tuyến tính được xây dựng trong khoảng nồng độ hẹp của CMP (0,25 - 0,8 mg/mL) và UMP (0,15 - 0,48 mg/mL). Giới hạn phát hiện (LOD) và giới hạn định lượng như sau:

Bảng 2. Kết quả xác định LOD và LOQ của CMP và UMP

Chất phân tích	Nồng độ (C), mg/mL	Diện tích pic (A), mAU	Phương trình hồi quy tuyến tính, hệ số tương quan r và S	LOD mg/L	LOQ mg/L
CMP	0,2500	4.204.808	$A = 22608064C - 1618161$ $r = 0,9993$ $S = 39$	0,01	0,03
	0,4000	7.207.693			
	0,5000	9759969			
	0,6000	11.800.148			
	0,8000	16.587.137			
UMP	0,1500	3.103.886	$A = 20215372 C + 98406$ $r = 1,00$ $S = 70$	0,01	0,03
	0,2400	4.966.218			
	0,3000	6.192.720			
	0,3600	7.372.913			
	0,4800	9.785.813			

Như vậy, phương pháp HPLC với detector DAD đạt được LOD khá thấp đối với cả 2 chất CMP và UMP (LOD đối với cả 2 chất đều là 0,01 ppm) khi xác định đồng thời chúng trong hỗn hợp.

3.5. Áp dụng thực tế

Áp dụng các điều kiện nghiên cứu trên cho việc phân tích một số mẫu dược phẩm

đang lưu hành trên thị trường tỉnh Bình Định, gồm 2 mẫu thuốc viên nang (LEOLEN Forte, Nucleo CMP) và một mẫu thuốc đông khô (ALTON CMP), thu được kết quả ở bảng 3 và 4.

Bảng 3. Kết quả phân tích CMP trong một số mẫu thực tế^(*)

Mẫu	Hàm lượng (mg/đơn vị đóng gói)		ϵ (95%)	Hàm lượng CMP trên nhãn (mg)	Khoảng tin cậy 95% (mg - mg)
	x_i	x_{tb}			
LEOLEN Forte	4,96	4,99	$\pm 0,11$	5	4,88 - 5,10
	5,04				
	4,97				
Nucleo CMP	4,99	5,00	$\pm 0,03$	5	4,97 - 5,03
	5,01				
	5,01				
ALTON CMP	9,94	9,98	$\pm 0,15$	10	9,82 - 10,13
	10,05				
	9,94				

^(*) đối với mỗi mẫu, tiến hành 3 phép phân tích lặp lại ($n = 3$); x_i - các kết quả riêng lẻ; x_{tb} - kết quả trung bình; ϵ - biên giới tin cậy 95%; khoảng tin cậy 95% = $x_{tb} - \epsilon$ đến $x_{tb} + \epsilon$. $\epsilon = t_{(0,95;f=n-1=2)} \times S/(n)^{1/2}$; trong đó, t là chuẩn student ở độ tin cậy 95% và bậc tự do f ; S là độ lệch chuẩn; n (số phép đo lặp lại) = 3.

Bảng 4. Kết quả phân tích UMP trong một số mẫu thực tế (*)

Tên mẫu	Kết quả định lượng uridine 5'-monophosphate disodium (mg/ đơn vị đóng gói)		ε với khoảng tin cậy 95%	Hàm lượng trên nhãn (mg)	$x_{tb} - \varepsilon$	$x_{tb} + \varepsilon$
	x_i	x_{tb}				
LEOLEN Forte	2,99	3,01	$\pm 0,0691$	3	2,9375	3,0757
	3,04					
	2,99					
Núcleo CMP	3,01	3,02	$\pm 0,0161$	3	2,9992	3,0313
	3,02					
	3,02					
ALTON CMP	6,00	6,01	$\pm 0,0952$	6	5,9174	6,1078
	6,06					
	5,99					

(*) đối với mỗi mẫu, tiến hành 3 phép phân tích lặp lại ($n = 3$);

x_i – các kết quả riêng lẻ;

x_{tb} – kết quả trung bình; ε - biên giới tin cậy 95%;

khoảng tin cậy 95% = $x_{tb} - \varepsilon$ đến $x_{tb} + \varepsilon$; ε như ở bảng 3

Kết quả ở bảng 3 và 4 cho thấy, hàm lượng ghi trên nhãn của hai hoạt chất CMP và UMP là tin cậy, do hàm lượng đó nằm trong khoảng tin cậy 95% của hàm lượng xác định được bằng phương pháp HPLC.

Các kết quả trên cũng cho phép khẳng định rằng, hoàn toàn có thể áp dụng quy trình phân tích xây dựng được để phân tích đồng thời 2 chất CMP và UMP trong các mẫu được phẩm.

4. KẾT LUẬN

+ Đã tiến hành xác định được bước sóng phát hiện CMP và UMP theo phương pháp HPLC lần lượt là 269 nm và 262 nm.

+ Đã khảo sát được ảnh hưởng của thành phần pha động và tốc độ dòng pha động đối

với phép phân tích đồng thời 2 chất CMP và UMP trong hỗn hợp.

+ Đã xác định được khoảng tuyến tính, giới hạn phát hiện và giới hạn định lượng của phương pháp HPLC đối với phép phân tích đồng thời 2 chất CMP và UMP trong hỗn hợp thông qua mẫu chuẩn CMP và UMP của hãng Sigma Aldrich, Mỹ;

+ Đã áp dụng các điều kiện thí nghiệm khảo sát được vào việc phân tích một số mẫu được phẩm đang lưu hành trên thị trường tỉnh Bình Định, gồm 2 mẫu thuốc viên nang (LEOLEN Forte, Nucleo CMP) và một mẫu thuốc đông khô (ALTON CMP) cho kết quả tốt.

(xem tiếp trang 285)