

ĐỊNH HƯỚNG CÔNG TÁC KIỂM TRA VÀ GIÁM SÁT CHẤT LƯỢNG THUỐC NĂM 2019

PGS.TS. ĐOÀN CAO SON

Viện trưởng Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương

Trong năm 2018, hệ thống kiểm nghiệm trên cả nước vẫn tiếp tục cố gắng nỗ lực trên mọi mặt, hoàn thành xuất sắc nhiệm vụ được giao, tích cực hướng ứng các phong trào thi đua, kết quả đã nhận được nhiều thành tích đáng khích lệ, cụ thể:

- Hội đồng thi đua của Hệ thống kiểm nghiệm đã đề nghị Viện trưởng Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương tặng giấy khen cho 28 tập thể và 57 cá nhân đã có thành tích xuất sắc trong công tác kiểm tra, giám sát và đảm bảo chất lượng thuốc năm 2018. Các đơn vị gồm Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương, TTKN Tây Ninh, TTKN Yên Bái, TTKN Quảng Trị, TTKN Sơn La và TTKN Quảng Bình được đề nghị tặng Cờ thi đua của Bộ Y tế năm 2018. Viện Kiểm nghiệm thuốc TP. Hồ Chí Minh được Hội đồng thi đua Bộ Y tế đề nghị tặng Cờ thi đua của Chính phủ năm 2018.

- Về năng lực của hệ thống kiểm nghiệm: Đến nay toàn hệ thống đã có 12 đơn vị đạt tiêu chuẩn GLP và 51 đơn vị đạt tiêu chuẩn ISO/IEC-17025.

Hội thảo tổng kết công tác kiểm tra, giám sát chất lượng thuốc năm 2018 tại Thành phố Buôn Ma Thuột, Đăk Lăk vào ngày 29 tháng 3 năm 2019 đã nhất trí đề ra định hướng công tác và các nhiệm vụ trọng tâm cho hệ thống kiểm nghiệm năm 2019.

1. Định hướng công tác

1.1. Tiếp tục thực hiện công tác kiểm tra giám sát chất lượng thuốc, mỹ phẩm trên địa bàn cả nước nhằm đảm bảo thuốc đến tay người dùng có chất lượng, hiệu lực và an toàn. Cần tăng cường kiểm tra chất lượng nguyên liệu đầu vào cũng như lấy mẫu thành phẩm cuối nguồn. Dựa trên số liệu báo cáo của các đơn vị, Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương đã tổng hợp danh mục các hoạt chất thường có vi phạm chất lượng, cũng như danh sách các công ty trong/ngoài nước có vi phạm chất lượng trong năm 2018, để các đơn vị trong hệ thống kiểm nghiệm có định hướng xây dựng kế hoạch lấy mẫu.

1.2. Củng cố và kiện toàn Hệ thống kiểm nghiệm nhằm sử dụng có hiệu quả các nguồn lực về đội ngũ cán bộ kỹ thuật và trang thiết bị; tiếp tục duy trì quản lý phòng thí nghiệm theo tiêu chuẩn ISO/IEC-17025 và GLP đối với các đơn vị đã đạt các tiêu chuẩn này, tiếp tục xây dựng và cải tạo các trung tâm kiểm nghiệm, để các trung tâm này đạt tiêu chuẩn ISO/IEC-17025 và GLP.

1.3. Đối với Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương và Viện Kiểm nghiệm thuốc TP. Hồ Chí Minh: Cần tăng cường triển khai nghiên cứu đánh giá sinh khả dụng và tương đương sinh học của thuốc. Tiếp tục nghiên cứu triển khai kiểm nghiệm xác định chất lượng các thuốc có nguồn gốc sinh học; sinh phẩm điều trị. Mở các lớp đào tạo cho các trung tâm kiểm nghiệm và các phòng kiểm nghiệm của các doanh nghiệp về chuyên môn kỹ thuật, quản lý chất lượng; tổ chức chương trình đánh giá năng lực thử nghiệm thành thạo bằng so sánh liên phòng thí nghiệm; quản lý phòng thí nghiệm theo tiêu chuẩn GLP và ISO/IEC-17025.

1.4. Đối với các trung tâm kiểm nghiệm tỉnh, thành phố cần tiếp tục cung cấp và tăng cường cơ sở vật chất kỹ thuật, đào tạo cán bộ để tăng cường năng lực quản lý chất lượng thử nghiệm; các trung tâm kiểm nghiệm đạt tiêu chuẩn ISO/IEC 17025 và GLP tích cực tham gia công tác tiền kiểm. Tăng cường công tác kiểm tra giám sát chất lượng thuốc trên địa bàn, tại các cơ sở điều trị, sử dụng thuốc; đặc biệt là đối với các thuốc dễ bị biến đổi chất lượng.

1.5. Củng cố và duy trì phần mềm hệ thống kiểm nghiệm là địa chỉ để cung cấp tiêu chuẩn chất lượng sản phẩm thuốc cho các trung tâm kiểm nghiệm, tiến tới là nơi thu thập thông tin về tình hình kiểm tra chất lượng thuốc của tất cả các đơn vị trên Hệ thống.

2. Nhiệm vụ trọng tâm

2.1. Đối với Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương và Viện Kiểm nghiệm thuốc TP. Hồ chí Minh

- Xây dựng kế hoạch lấy mẫu để làm căn cứ thực hiện và chỉ đạo các trung tâm kiểm nghiệm, trong đó tập trung lấy mẫu từ đầu nguồn; tại các nhà phân phối, nhập khẩu; tăng cường lấy mẫu thuốc trúng thầu tại các bệnh viện và các cơ sở y tế.

- Tăng cường năng lực chuyên môn, nhất là tăng cường các thiết bị và chất chuẩn, tạp chuẩn để thực hiện kịp thời kế hoạch tiền kiểm thuốc nhập khẩu và kiểm tra các thuốc phục vụ cho các chương trình của Bộ Y tế.

- Xây dựng và thực hiện đề án nâng cấp Trung tâm Đánh giá tương đương sinh học ở hai Viện theo chuẩn mực Quốc tế và Khu vực.

- Mở rộng quỹ chất chuẩn, chất đối chiếu và được liệu chuẩn để phục vụ công tác kiểm nghiệm, nhằm tăng tỷ lệ kiểm tra chất lượng toàn bộ đối với các hoạt chất, chế phẩm lưu hành trên thị trường.

2.2. Đối với các trung tâm kiểm nghiệm tuyển tính, thành phố

- Tiếp tục nâng cao năng lực kiểm tra, giám sát chất lượng thuốc, mỹ phẩm và thực phẩm, có lộ trình thích hợp để tiến tới đạt tiêu chuẩn ISO/IEC-17025 và GLP. Tích cực tham gia các chương trình thử nghiệm thành thạo và các lớp tập huấn kỹ thuật do hai Viện tổ chức.

- Xây dựng và thực hiện kế hoạch lấy mẫu theo định hướng và chỉ đạo chuyên môn của Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương.

- Củng cố việc thực hiện chế độ báo cáo: báo cáo kịp thời tình hình chất lượng thuốc, các mẫu không đạt chất lượng về Cục Quản lý Dược, Sở Y tế và hai Viện để có hướng giải quyết và xử lý, tránh để lọt luzzi các thuốc kém chất lượng lưu hành trên thị trường; báo cáo định kỳ hàng năm về hoạt động của đơn vị và tình hình chất

lượng thuốc ở địa phương cho Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương để tổng hợp báo cáo Bộ Y tế theo biểu mẫu mới đã gửi cho các đơn vị qua đường công văn, thời gian chốt số liệu là ngày 30/11 hàng năm, thời gian nộp báo cáo là trước ngày 20/12 hàng năm.

2.3. Đối với các cơ sở sản xuất, kinh doanh

- Xây dựng và thẩm định phương pháp kiểm nghiệm các sản phẩm theo hướng khả thi với trang thiết bị kỹ thuật hiện có, phù hợp với yêu cầu của Thông tư quy định việc đăng ký thuốc.

- Nghiên cứu và theo dõi đầy đủ độ ổn định các sản phẩm đăng ký lưu hành; có kế hoạch tự thanh kiểm tra chất lượng thuốc của đơn vị mình lưu hành trên thị trường để kịp thời phát hiện và chủ động thu hồi thuốc không đạt chất lượng.

- Cần thực hiện nghiêm túc việc kiểm tra chất lượng nguyên liệu đầu vào, đặc biệt là các dược liệu để tránh sử dụng dược liệu nhầm lẫn hoặc giả mạo; kiểm tra chất lượng thuốc trước khi lưu hành theo đúng tiêu chuẩn chất lượng đã được phê duyệt khi cấp số đăng ký.

NGHIÊN CỨU KHOA HỌC

XÂY DỰNG VÀ THẨM ĐỊNH QUY TRÌNH ĐỊNH LƯỢNG NGUYÊN LIỆU BÁN TỔNG HỢP EXEMESTAN BẰNG KỸ THUẬT SẮC KÝ LỎNG PHA ĐẢO

LÊ QUANG THẢO

Viện Kiểm nghiệm thuốc TW

HOÀNG THỊ HỒNG LIÊN

Trường Đại học Hải Phòng

CAO ĐỨC TUẤN, ĐẶNG VĂN CHỨC,

BẠCH THỊ NHƯ QUỲNH, LÊ HỒNG THU,

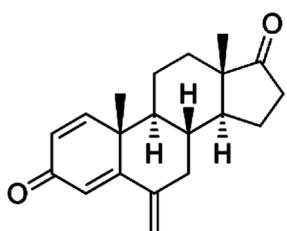
NGUYỄN VĂN HÙNG

Trường Đại học Y Dược Hải Phòng

Từ khóa: Định lượng, Exemestan, ung thư vú, sắc ký lỏng pha đảo, HPLC

1. Đặt vấn đề

Exemestan được sử dụng phổ biến trong điều trị một số loại ung thư vú có thụ thể hormon estrogen dương tính ở phụ nữ sau mãn kinh hoặc hỗ trợ điều trị ung thư vú giai đoạn sớm giúp ngăn ngừa nguy cơ ung thư tái phát [2],[4]. Năm 1999, FDA đã công nhận exemestan là thuốc được sử dụng thay thế trong các trường hợp điều trị ung thư vú bằng tamoxifen thất bại [3].



Hình 1. Exemestan

Với mong muốn làm chủ qui trình công nghệ tổng hợp exemestan từ nguyên liệu sẵn có trên thị trường là androsta-1,4-dien-3,17-dion, qua đó bước đầu góp phần tự chủ cung cấp nguồn nguyên liệu trong nước làm thuốc phục vụ công tác điều trị bệnh. Năm 2018, nhóm nghiên cứu Trường Đại học Y Dược Hải Phòng thực hiện đề tài “Nghiên cứu quy trình tổng hợp nguyên liệu thuốc điều trị ung thư exemestan” thuộc Chương trình nghiên cứu Khoa học công nghệ trọng điểm quốc gia phát triển Công nghiệp Hóa dược đến năm 2020, mã số CNHD. ĐT.070/16-18.

Phương pháp định lượng nguyên liệu exemestan đã được đề cập đến trong Dược điển Anh, Mỹ. Tuy nhiên, những chuyên luận trên đòi hỏi phải sử dụng cột với kích cỡ hạt nhỏ ($3,5 \mu\text{m}$) khó kiểm, thường không được trang bị sẵn tại các đơn vị kiểm nghiệm. Vì thế, nhóm tác giả nghiên cứu xây dựng phương pháp định lượng trên

cột cỡ hạt ($5 \mu\text{m}$) phô biến hơn, phương pháp được tiến hành thẩm định đầy đủ, phù hợp với điều kiện chung của các phòng kiểm nghiệm ở nước ta.

2. Thực nghiệm

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

2.1.1. Thiết bị, dụng cụ

Các thiết bị được hiệu chuẩn theo quy định của ISO/IEC 17025 gồm:

- Máy sắc ký lỏng hiệu năng cao Acquity ARC với detector DAD (Water, Mỹ);
- Cân phân tích Mettler AE163 (Mettler Toledo, Thụy Sĩ);
- Máy lắc siêu âm Branson (Branson, Mỹ);
- Các dụng cụ thủy tinh chính xác cấp A, dùng trong phân tích (bình định mức, pipet, ...).

2.1.2. Hóa chất, chất chuẩn

- Acetonitril, methanol (Merck, Đức) loại dùng cho sắc ký;
- Nước RO đạt tiêu chuẩn cơ sở Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương;
- Chuẩn Dược điển Châu Âu exemestan (Hàm lượng: 99,8%, nguyên trạng), SKS: Y0001756;
- Chuẩn Dược điển Châu Âu exemestan dùng cho kiểm tra độ thích hợp của hệ thống [exemestane for system suitability CRS (containing impurity G)], SKS: Y0001747.

2.2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Đối tượng nghiên cứu

Nguyên liệu exemestan, lô: Ex-NC1; sản xuất ngày 30/11/2017 tại Trường Đại học Y Dược Hải Phòng.

2.2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.2.1. Xây dựng phương pháp phân tích

- *Dung môi pha mẫu*: Pha động ở tỷ lệ ban đầu.
- *Phương pháp phân tích*: Kỹ thuật sắc ký lỏng pha đảo. Cột C18, 250 x 4,6 mm, cỡ hạt $5 \mu\text{m}$ [5],[6].

Pha động: Sử dụng điều kiện theo tài liệu [5],[6]; sau đó khảo sát các thành phần, tỷ lệ dung môi khác (methanol, hỗn hợp methanol và acetonitril,...) để lựa chọn pha động phù hợp.

2.2.2.2. Thẩm định phương pháp phân tích

Phương pháp phân tích được thẩm định theo yêu cầu chung của ICH (International Conference on Harmonisation) về thẩm định phương pháp phân tích đối với các sản phẩm được sử dụng cho người, với đầy đủ các chỉ tiêu: tính thích hợp của hệ thống, độ đặc hiệu, khoảng nồng độ tuyến tính, độ đúng, độ chính xác (độ lặp lại, độ chính xác trung gian), khoảng xác định,

LOD, LOQ,...

2.2.2.3. Xử lý số liệu

Số liệu được phân tích thống kê trên phần mềm Microsoft Excel 2013, Sigma plot 12.

3. Kết quả và bàn luận

3.1. Xây dựng phương pháp phân tích

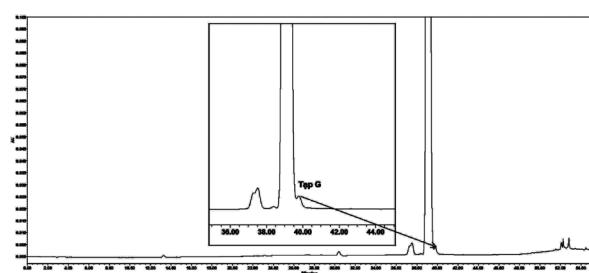
3.1.1. Chuẩn bị mẫu

- *Dung dịch chuẩn*: Cân chính xác khoảng 50,0 mg chuẩn exemestan trong bình định mức 25,0 ml, thêm khoảng 15 ml dung môi pha mẫu, lắc siêu âm để hòa tan mẫu hoàn toàn, để nguội tới nhiệt độ phòng, thêm pha động vừa đủ thể tích. Lọc qua màng lọc $0,45 \mu\text{m}$, thu được dung dịch chuẩn gốc có nồng độ chính xác khoảng 2,0 mg/ml. Pha loãng dung dịch chuẩn gốc bằng dung môi pha mẫu để có các dung dịch chuẩn làm việc.

- *Dung dịch thử*: Cân chính xác khoảng 50,0 mg nguyên liệu bán tổng hợp exemestan chuyển vào bình định mức 50,0 ml, thêm khoảng 15 ml dung môi pha mẫu, lắc siêu âm để hòa tan mẫu hoàn toàn, để nguội tới nhiệt độ phòng, thêm pha động vừa đủ thể tích. Lọc qua màng lọc $0,45 \mu\text{m}$ thu được dung dịch thử có nồng độ khoảng 1 mg/ml.

3.1.2. Lựa chọn điều kiện sắc ký

Tiến hành phân tích theo điều kiện ban đầu [5] trên một số cột C18 (25 cm x 4,6 mm; $5 \mu\text{m}$) như Phenomenex Luna, Phenomenex Gemini, YMC Triart, Zorbax ODS, ... Kết quả cho thấy các cột mới sử dụng có khả năng tách được tạp G ra khỏi exemestan tuy nhiên còn chưa tách rõ ràng (Hình 2).



Hình 2. Tạp G ở điều kiện ban đầu.

Kết quả khảo sát tỷ lệ, thành phần các dung môi và chương trình gradient chỉ ra việc thay thế acetonitril bằng methanol hoặc hỗn hợp methanol và acetonitril không tăng khả năng tách, trong khi đó thay đổi chương trình gradient cho thấy sự tách rõ ràng tạp G ra khỏi exemestan, đạt tỷ số đỉnh – hõm ($H_{p/v}$) $\geq 2,5$ (Hình 3). Do vậy, chúng tôi lựa chọn được điều kiện sắc ký cuối cùng (chương trình gradient 3) như sau:

- Cột: C18 (25 cm x 4,6 mm; $5 \mu\text{m}$)
- Nhiệt độ cột: 40°C

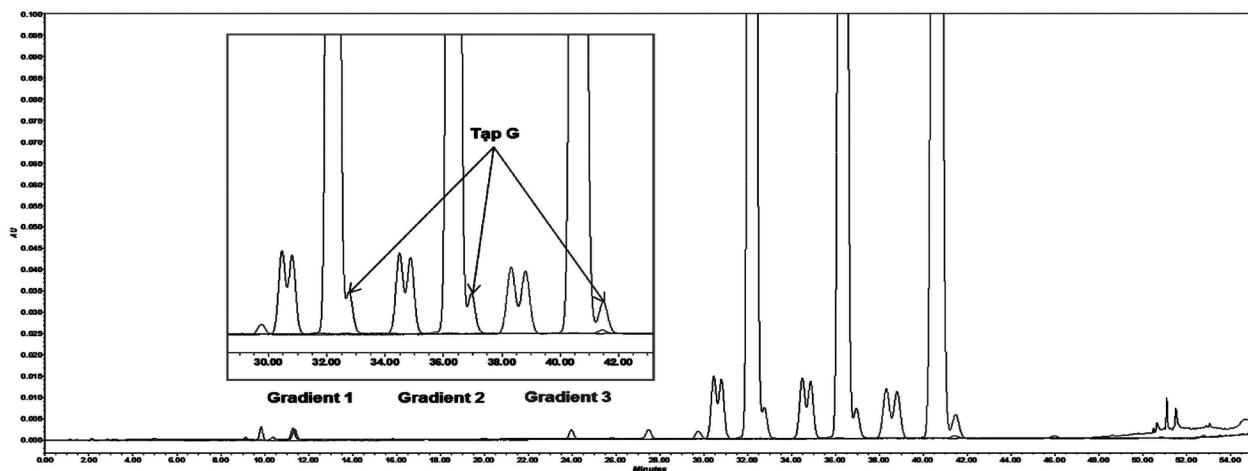
- Detector UV: 247 nm
- Tốc độ dòng: 1,2 ml/min
- Thể tích tiêm: 10 μ l
- Chương trình gradient dung môi:

Thời gian (min)	Nước (%; tt/tt)	Acetonitril (%; tt/tt)
0 - 5	75	25
5 - 50	75 → 60	25 → 40
50 - 55	60 → 5	40 → 95
55 - 60	5	95
60 - 65	5 → 75	95 → 25
65 - 70	75	25

3.2. Thẩm định phương pháp phân tích

3.2.1. Tính thích hợp của hệ thống sắc ký

Tiến hành sắc ký 6 lần tiêm liên tiếp lặp lại với dung dịch chuẩn tạp (exemestane for system suitability CRS) có chứa exemestan nồng độ khoảng 1 mg/ml và tạp G. Ghi lại sắc ký đồ, thời gian lưu, diện tích pic của exemestan, tỷ số định – hõm ($H_{p/v}$) giữa exemestan và tạp G, kết quả được trình bày trong Bảng 1.



Hình 3. Sắc ký đồ thu được từ 3 chương trình gradient, tạp G được tách rõ ra khỏi pic chính exemestan với chương trình gradient 3.

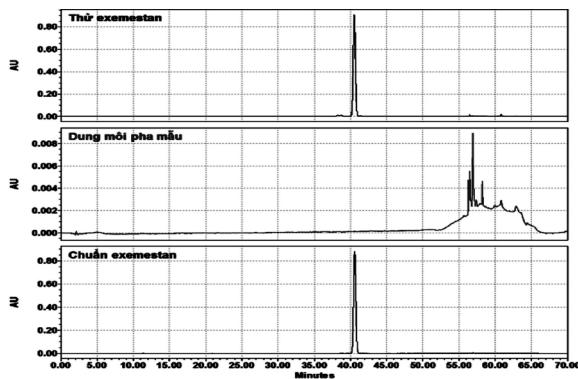
Bảng 1. Kết quả khảo sát tính thích hợp của hệ thống sắc ký

STT	Thời gian lưu của exemestan (phút)	Diện tích pic exemestan (mAUs)	Tỷ số $H_{p/v}$
1	40,586	18975589	2,7
2	40,593	19001485	2,6
3	40,588	19028188	2,7
4	40,598	19019891	2,7
5	40,583	19090443	2,7
6	40,589	19026738	2,8
TB	40,590	19023722	2,7
RSD	0,01%	0,20%	

Độ lệch chuẩn tương đối (RSD) của thời gian lưu của exemestan là $0,01\% < 1,0\%$, RSD của diện tích pic exemestan là $0,2\% < 2,0\%$, đều phù hợp theo hướng dẫn của ICH. Tạp G tách tương đối rõ ràng khỏi pic chính exemestan (Tỷ số $H_{p/v} = 2,7$). Như vậy, phương pháp định lượng exemestan đạt yêu cầu về độ thích hợp của hệ thống.

3.2.2. Độ đặc hiệu, chọn lọc

Tiến hành sắc ký lần lượt với dung dịch chuẩn tạp, dung dịch chuẩn, dung dịch thử và dung môi pha mẫu. Kết quả cho thấy, vị trí xuất hiện của pic chính trên sắc ký đồ của dung dịch thử có thời gian lưu và phổ tương ứng với pic của exemestan trên sắc ký đồ của dung dịch chuẩn (t_R khoảng 40,5 phút) và khác với thời gian lưu



Hình 4. Độ đặc hiệu, chọn lọc

3.2.3. Khoảng tuyển tính

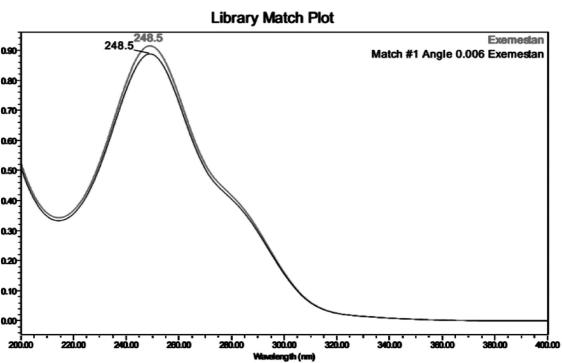
Tiến hành sắc ký lần lượt với các dung dịch chuẩn exemestan có nồng độ chính xác khoảng 0,5; 0,8; 1,0; 1,2; 1,5 mg/ml. Kết quả được thể hiện ở Bảng 2 và Hình 5, hệ số tương quan thu được là $r = 0,9998 (> 0,995)$. Như vậy khoảng tuyển tính của phương pháp là từ 0,5 - 1,5 mg/ml. Nồng độ 1,0 mg/ml được chọn làm nồng độ định lượng.

Bảng 2. Kết quả khảo sát khoảng tuyển tính

STT	Nồng độ exemestan (mg/ml)	DT pic exemestan (mAU.s)
1	0,5	9527087
2	0,8	15225988
3	1,0	19131843
4	1,2	22911567
5	1,5	28764603

$$\text{Phương trình hồi quy: } y = 18666915 x - 251369$$

$$\text{Hệ số tương quan } r = 0,9998$$



3.2.4. Độ đúng

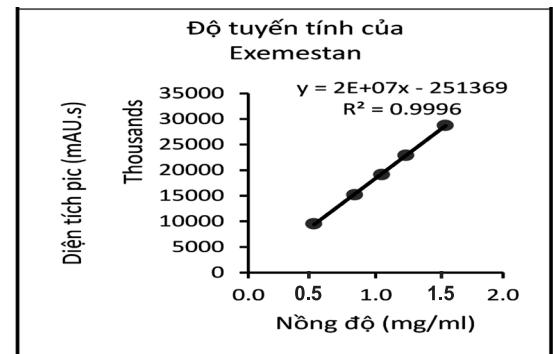
Cân lèn lượt lượng các chất chuẩn exemestan (như ở Bảng 3), hòa tan trong dung môi pha mẫu để được các dung dịch chuẩn đã biết nồng độ ở các mức 70%, 100%, 130% so với nồng độ định lượng. Tỷ lệ tìm lại của exemestan là từ 99,6% đến 101,4% (trong khoảng 98,0% - 102,0%) và RSD từ 0,28% đến 0,87% (< 2,0%), kết quả thể hiện ở Bảng 3 (Xem trang sau).

3.2.5. Độ chính xác của phương pháp

- Độ lặp lại: Tiến hành định lượng exemestan trong mẫu thử là nguyên liệu tổng hợp được, 6 dung dịch thử được chuẩn bị như mục 3.1.1 với điều kiện sắc ký như mục 3.1.2.

- Độ chính xác trung gian: Tiến hành giống “Độ lặp lại” trên cùng thiết bị nhưng khác ngày, khác kiểm nghiệm viên.

Kết quả khảo sát độ chính xác của phương pháp được thể hiện trong Bảng 4 (Xem trang sau).



Hình 5. Mối tương quan giữa nồng độ và diện tích pic exemestan

Bảng 3. Kết quả thẩm định độ đúng

Số TT	Dung dịch thử	Lượng exemestan thêm vào (mg)	Diện tích pic exemestan (mAU.s)	Lượng exemestan tìm thấy (mg)	Tỷ lệ tìm lại (%)	Thông kê	
Dung dịch chuẩn: 1,05 mg exemestan/ml			19023722				
1	70%	7,25	13348890	7,35	101,4	TB = 101,0% RSD = 0,53%	
2	70%	7,32	13344116	7,35	100,4		
3	70%	7,28	13382777	7,37	101,3		
4	100%	10,43	19207704	10,58	101,4		
5	100%	10,58	19259378	10,61	100,3	TB = 100,5% RSD = 0,87%	
6	100%	10,62	19226880	10,59	99,7		
7	130%	13,75	24982632	13,76	100,1		
8	130%	13,82	24986766	13,76	99,6	TB = 99,8% RSD = 0,28%	
9	130%	13,79	24991815	13,77	99,8		

Bảng 4. Kết quả khảo sát độ chính xác của phương pháp (độ lặp lại và độ chính xác trung gian)

Mẫu thử	Kiểm nghiệm viên 1			Kiểm nghiệm viên 2					
	Máy HPLC: Water								
	Ngày thử: 08/11/2018; Lượng cân chuẩn: 26,25 mg Diện tích pic (n = 6): 19023722 mAU.s		Ngày thử: 10/11/2018; Lượng cân chuẩn: 26,12 mg Diện tích pic (n = 6): 19164118 mAU.s						
Lượng cân thử (mg)	Diện tích pic (mAU.s)	Hàm lượng (%)	Lượng cân thử (mg)	Diện tích pic (mAU.s)	Hàm lượng (%)				
1	92,3	16750084	100,0	93,8	16774304	98,5			
2	100,2	18148597	99,8	98,7	18164262	101,4			
3	95,2	17037536	98,6	95,2	17060922	98,7			
4	93,9	16814411	98,6	93,5	16834739	99,2			
5	99,7	18277180	101,0	99,6	18304051	101,2			
6	95,2	17079820	98,8	96,3	17090249	97,8			
Trung bình = 99,5%; n = 6; RSD = 0,96%			Trung bình = 99,5%; n = 6; RSD = 1,51%						
Trung bình = 99,5%; n = 12; RSD = 1,51%									

Kết quả thử nghiệm cho thấy phương pháp đã xây dựng có độ chính xác cao.

3.2.6. Khoảng xác định

Khoảng xác định được suy ra từ kết quả đánh giá độ đúng và độ tuyếntính của phương pháp từ 0,7 mg/ml đến 1,3 mg/ml (trong ứng 70% đến 130% nồng độ định lượng).

3.2.7. Giới hạn phát hiện (LOD) và giới hạn định lượng (LOQ)

Pha loãng dần dung dịch chuẩn exemestan (mục 3.1.1) đến nồng độ thấp nhất sao cho khi tiêm vào hệ thống sắc ký tín hiệu thu được cao gấp 3,3 lần so với độ nhiễu đường nền, xác định được giá trị LOD = 0,37 µg/ml.

Giới hạn định lượng của phương pháp: LOQ = 3 x LOD = 1,11 µg/ml. Giá trị này được xác nhận độ lặp lại đạt yêu cầu để định lượng.

3.3. *Bàn luận*

Qua tài liệu tham khảo, các phương pháp được đề cập đến trong các công bố, bài báo khoa học hầu hết là dành cho thành phẩm, không chú trọng đến việc tách tạp chất ra khỏi chất chính. Trong các phương pháp định lượng theo Dược điển, phương pháp phân tích theo BP 2018 là phù hợp hơn so với USP 40 do chỉ cần sử dụng 1 chuẩn tạp G, hơn nữa tạp G có thời gian lưu tương đối khoảng 1,03 so với exemestan, nên nếu xây dựng được điều kiện sắc ký tách được tạp G, có thể đánh giá được chính xác hàm lượng cũng như mức độ tinh khiết sắc ký của nguyên liệu exemestan bán tổng hợp. Nghiên cứu này dùng cột sắc ký C18 (250 x 4,6 mm; 5 µm) đã đạt kết quả tách được tạp G ra khỏi pic chính theo yêu cầu của BP 2018.

Công thức cấu tạo của exemestan cho thấy pH hầu như không ảnh hưởng đến khả năng ion hóa trong dung dịch ($pK_a = 19,96$), nên việc khảo sát sử dụng pha động có chứa thành phần dung dịch đậm là không cần thiết. Đối với các chất tổng hợp bằng phương pháp hóa dược,

mà trong qui trình tổng hợp có thể xuất hiện nhiều tạp có công thức cấu tạo phân tử và tính chất phân cực gần tương tự hoạt chất chính, như exemestan thì kỹ thuật rửa giải theo chương trình gradient là phù hợp do nó cải thiện đáng kể chất lượng của quá trình tách, tuy nhiên khi xây dựng hoặc tối ưu chương trình gradient cần chú ý đảm bảo độ lặp lại của quá trình sắc ký. Ngoài ra, do exemestan rất ít tan trong nước nên khi khảo sát chương trình gradien cần đảm bảo tỷ lệ dung môi acetonitril trong mỗi hỗn hợp không quá nhỏ.

4. *Kết luận*

- Đã dựng phương pháp định lượng exemestan bằng kỹ thuật rửa giải theo chương trình dung môi trên cột C18 cỡ hạt 5 µm, tạp G được tách rõ ràng ra khỏi pic chính exemestan, pic chính đạt mức tinh khiết sắc ký, hình dáng cân đối, gọn, độ lặp lại của thời gian lưu tốt.

- Phương pháp định lượng được thẩm định đầy đủ cho thấy qui trình phân tích đạt yêu cầu về tính thích hợp của hệ thống, độ đặc hiệu, độ tuyển tính, độ đúng, độ lặp lại, độ chính xác trung gian, khoảng xác định, LOD và LOQ phù hợp để định lượng nguyên liệu exemestan.

Tài liệu tham khảo

1. Cao Đức Tuấn, Trịnh Thị Hải, Bạch Thị Như Quỳnh và các cộng sự, “Phương pháp tổng hợp exemestan từ androsta-1,4-dien-3,17-dion”, *Tạp chí Dược học*, số 19/2018, trang 35-38.
2. Tran Van Thuan et al. *Breast cancer and breast cancer treatment in Vietnam*, Conference Proceeding: Advances in the Treatment of HER2 Positive Breast Cancer, Ho Chi Minh City, 2017.
3. Anderson WF¹, Katki HA, Rosenberg PS (2011), “Incidence of breast cancer in the United States: current and future trends”, *J. Natl Cancer Inst.* 2011 Sep 21;103(18), pp.1397-402.
4. Paridaens R¹, Thomas J, Wildiers J, Vermeiren P, Lobelle JP, di Salle E, Ornati G, Zurlo MG, Polli A, Lanzalone S, de Belder K., “Safety, activity and estrogen inhibition by exemestane in postmenopausal women with advanced breast cancer: a phase I study”, *Anticancer Drugs*. 1998 Sep;9(8):675-83.
5. BP 2018, *Exemestane monograph*, vol. 1, p. 996.
6. USP 40, 2017, *Exemestane monograph*, Vol. 2, pp. 4126-4127.
7. Cao Đức Tuan, Vu Thi Kim Loan, Trinh Hien Trung, Nguyen Van Hung, Pham Van Thuc, “Study on the synthesis of Exemestane”, *Vietnam Journal of Chemistry*, 2018, 56(6), 700-703.

SUMMARY

An HPLC method for determination of steroid Exemestane was established and validated. The chromatography was performed with: C18 reverse phase column (250 x 4.6 mm; 5µm); mobile phase consists of Acetonitrile and Water are mixed in gradient elution chromatography; UV-Vis detector (247 nm); flow rate (1.2 ml/min). The quantification procedure was validated to be HPLC system suitability; linearity; ensured of specificity, repeatability; and ensured of reliable accuracy ($\leq 2.0\%$). This validated method was applied for determination of synthetic Exemestane material, a product of National Research Grant: “National Science and Technology Research Program for the development of Pharmaceutical Chemistry Industry, 2020”.

(Ngày nhận bài: 20/03/2019 ; Ngày phản biện: 27/03/2019 ; Ngày duyệt đăng: 09/04/2019)

THẨM ĐỊNH QUY TRÌNH ĐỊNH LƯỢNG CHYMOTRYPSIN TRONG CHẾ PHẨM VIÊN NÉN BẰNG PHƯƠNG PHÁP ĐO QUANG ĐỘNG HỌC

VŨ QUÝ CHIẾN

Công ty Cổ phần Dược phẩm Trường Thọ

TRẦN THỊ THANH HUẾ, NGUYỄN THỊ HỒNG VINH,

NGUYỄN THỊ HẰNG, NGUYỄN THỊ LIÊN, ĐOÀN CAO SƠN

Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương

Từ khóa: Định lượng, Chymotrypsin, UV - VIS, đo quang động học

1. Đặt vấn đề

Chymotrypsin là một enzym thủy phân protein thu được bằng cách hoạt hóa chymotrypsinogen được chiết xuất từ tuyến tụy của bò [3] có tác dụng kháng viêm và chống phù nề vì vậy được sử dụng rộng rãi trên thị trường dưới nhiều biệt dược khác nhau như: Alphadeka DK, Hatab trypsin, Alphachoay, Alphachymotrypsin 10, Chymobest... Một khác do bản chất thuốc này là enzym nên hàm lượng của chế phẩm lại dễ bị biến đổi bởi điều kiện môi trường. Vì vậy, để kiểm soát tốt chất lượng thuốc, cần có quy trình phân tích phù hợp và được thẩm định một cách đầy đủ, chính xác. Hiện nay, trong Dược điển Mỹ có chuyên luận nguyên liệu chymotrypsin và chế phẩm thuốc nhỏ mắt được định lượng bằng phương pháp đo quang động học [4], Dược điển Anh có chuyên luận nguyên liệu chymotrypsin được định lượng bằng phương pháp chuẩn độ đo điện thế [3], Dược điển Việt Nam V có chuyên luận nguyên liệu và chế phẩm viên nén chymotrypsin sử dụng phương pháp đo động học [1]. Mỗi phương pháp khác nhau có yêu cầu về hóa chất, trang thiết bị và điều kiện thử khác nhau. Theo đó, phương pháp đo quang động học là phương pháp có yêu cầu về hóa chất, trang thiết bị và điều kiện thử nghiệm phù hợp với điều kiện phòng thí nghiệm ở Việt Nam. Chính vì thế phương pháp này thường được các công ty dược phẩm trong nước lựa chọn. Tuy nhiên, đây là phương pháp đo quang động học enzym có nhiều yêu cầu đặc thù cho nên đa phần các công ty dược phẩm gặp khó khăn trong việc định lượng đặc biệt là việc thẩm định phương pháp định lượng. Vì vậy chúng tôi tiến hành nghiên cứu thẩm định quy trình định lượng chymotrypsin bằng phương pháp đo quang động học trong chế phẩm viên nén nhằm đưa ra cách thức thẩm định để các công ty dược phẩm trong nước có thể tham khảo và tự thẩm định sản phẩm chứa chymotrypsin của mình.

2. Thực nghiệm

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

2.1.1. Thiết bị, dụng cụ

Đã được hiệu chuẩn theo ISO/IEC 17025 bao gồm:

- Máy quang phổ UV-VIS Shimadzu 2600;
- Cân phân tích Sartorius CP224S, độ chính xác 0,1 mg;
- Cân phân tích Mettler Toledo AG245, độ chính xác 0,01 mg;

- Bể ủ nhiệt Labec;

- Bộ Micropipette eppendorf;

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

2.1.2. Hóa chất, dung môi, chất chuẩn

- Kali dihydrophosphat (KH_2PO_4) loại PA (Merck);

- Dinatri hydrophosphat khan (Na_2HPO_4) loại PA (Merck);

- N-acetyl-L-tyrosin ethyl ester monohydrat loại PA (Sigma);

- Acid hydrochloric 37% (Merck);

- Chuẩn chymotrypsin USP, lô: J0F105, hàm lượng: 1300 đơn vị USP/mg.

2.2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Đối tượng nghiên cứu

- Mẫu thử: Viên nén Alpha-Ktal của Công ty Cổ phần Dược phẩm Trường Thọ.

- Mẫu placebo gồm các thành phần như công thức bào chế nhưng không có chymotrypsin. Công thức mẫu placebo trong một viên gồm: isomalt 110 mg; talc 1,18 mg; aerosil 0,1 mg; menthol 0,02 mg; magnesi stearat 0,28 mg.

2.2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.2.1. Chuẩn bị thuốc thử

- Dung dịch đệm phosphat pH 7,0 (0,067 M): Hòa tan 4,54 g kali dihydrophosphat (KH_2PO_4) (TT) trong 500 ml nước (Dung dịch 1). Hòa tan 4,73 g dinatri hydrophosphat khan (Na_2HPO_4) (TT) trong 500 ml nước (Dung dịch 2). Trộn 38,9 ml dung dịch 1 và 61,1 ml dung dịch 2, khuấy đều, điều chỉnh về pH 7,0 bằng cách thêm dung dịch 1 hoặc dung dịch 2.

- Dung dịch HCl 0,0012 N: Hòa tan 1,2 ml dung dịch HCl 1 N với nước vừa đủ 1000 ml.

- Dung dịch cơ chất: Hòa tan khoảng 23,7 mg N-acetyl-L-tyrosin ethyl ester monohydrat với 60 ml dung dịch đệm phosphat pH 7,0, lắc siêu âm ở 60°C trong vòng 15 phút cho tan hoàn toàn, để nguội đến nhiệt độ phòng, thêm dung dịch đệm phosphat pH 7,0 vừa đủ 100 ml.

2.2.2.2. Phương pháp xử lý mẫu

- Chuẩn bị dung dịch chuẩn (dùng để đánh giá tính thích hợp của hệ thống và thẩm định độ đặc hiệu): Cân

chính xác khoảng 50 mg chất chuẩn chymotrypsin cho vào bình định mức 100 ml. Thêm 70 ml dung dịch HCl 0,0012N, lắc cho tan hoàn toàn. Thêm dung dịch HCl 0,0012 N vừa đủ 100 ml. Lắc đều. Hút chính xác 1,0 ml dung dịch trên pha loãng với dung dịch HCl 0,0012 N đến vừa đủ 50 ml thu được dung dịch chuẩn.

- *Chuẩn bị dung dịch thử:* Cân và xác định khối lượng trung bình của 20 viên, nghiền thành bột mịn. Cân chính xác một lượng chế phẩm hòa tan trong dung dịch HCl 0,0012 N để thu được dung dịch có nồng độ từ 12 - 16 đơn vị USP chymotrypsin trong 1 ml. Pha loãng dung dịch nếu cần để trong quá trình định lượng, độ hấp thụ biến đổi trong khoảng từ 0,008 - 0,0012 trong mỗi 30 giây.

- *Chuẩn bị dung dịch placebo:* Hoà tan 37,2 mg placebo bằng dung dịch HCl 0,0012 N vừa đủ 100 ml. Lọc, loại bỏ 20 ml dịch lọc đầu.

2.2.2.3. Quy trình phân tích

Hút chính xác 0,2 ml dung dịch thử vào cốc đo dày 1 cm, thêm chính xác 3,0 ml dung dịch cơ chất, lắc đều. Đặt cốc đo vào máy và điều chỉnh để có độ hấp thụ là 0,200 ở bước sóng 237 nm (Ghi chú: Phải theo đúng thứ tự như trên, tính thời gian ngay sau khi thêm dung dịch cơ chất). Đo độ hấp thụ sau mỗi 30 giây, tổng cộng thời gian không ít hơn 5 phút. Mỗi dung dịch tiến hành ít nhất 2 lần. (Lưu ý: *Sử dụng máy quang phổ từ ngoại có hệ thống điều nhiệt để duy trì nhiệt độ buồng chứa cốc đo ở 25 ± 0,1°C, nhiệt độ trong cốc đo trước và sau khi đo độ hấp thụ đảm bảo nhiệt độ không thay đổi quá 0,5°C*). Giá trị tuyệt đối của độ hấp thụ không quan trọng bằng tốc độ suy giảm hằng định của độ hấp thụ sau mỗi 30 giây. Nếu tốc độ suy giảm hằng định của độ hấp thụ này không duy trì được trong khoảng thời gian ít nhất là 3 phút thì làm lại thí nghiệm, nếu cần có thể pha lại dung dịch thử có nồng độ thích hợp. Vẽ đường biểu diễn độ hấp thụ theo thời gian, lấy giá trị độ hấp thụ làm tung độ và thời gian làm hoành độ. Chọn đoạn tuyến tính trong vòng 3 phút để xác định hoạt lực của

Bảng 1. Biến thiên độ hấp thụ của dung dịch cơ chất khi thêm dung dịch chuẩn, thử và placebo

STT	Dung dịch	A ₀	A _t	A ₀ -A _t
1	Dung dịch placebo	0,2390	0,2385	0,0005
2	Dung dịch thử	0,1936	0,1321	0,0615
3	Dung dịch chuẩn	0,1902	0,1280	0,0622

Bảng 2. Ảnh hưởng của mẫu giả dược (placebo) đối với sự biến thiên độ hấp thụ của dung dịch cơ chất

STT	Lượng cân bột placebo (mg)	A ₀	A _t	A ₀ -A _t	% ảnh hưởng mẫu giả dược
1	38,1	0,2378	0,2365	0,0013	1,97
2	37,1	0,2390	0,2385	0,0005	0,78
3	37,5	0,2412	0,2407	0,0005	0,77
4	36,9	0,2406	0,2399	0,0007	1,10
5	36,4	0,2396	0,2385	0,0011	1,75
6	38,0	0,2382	0,2369	0,0013	1,98
Trung bình				1,39%	

mẫu thử [1],[4].

2.2.2.4. Tính kết quả

I đơn vị USP chymotrypsin tạo ra sự biến đổi độ hấp thụ là 0,0075 trong mỗi phút với các điều kiện quy định của phương pháp định lượng này.

Hàm lượng (%) chymotrypsin trong viên so với lượng ghi trên nhãn được tính theo công thức:

$$X (\%) = \frac{(A_0 - A_t) \times D \times M \times 100}{T \times 0,0075 \times m_t \times 0,2 \times 4200}$$

Trong đó:

A₀ và A_t: Độ hấp thụ ở thời điểm đầu và cuối trong khoảng biến thiên độ hấp thụ không đổi

T: Thời gian giữa A₀ và A_t (phút)

D: Độ pha loãng của mẫu thử

m_t: Khối lượng mẫu cân định lượng (mg)

M: Khối lượng trung bình viên (mg)

2.2.2.5. Thẩm định phương pháp

Theo thông tư số 44/2014/TT-BYT ngày 25/11/2014 của Bộ Y tế quy định về việc đăng ký thuốc, lần lượt đánh giá các chỉ tiêu: tính đặc hiệu, tính thích hợp của hệ thống, độ tuyển tính, khoảng xác định, độ đúng, độ chính xác [2].

3. Kết quả và bàn luận

3.1. Độ đặc hiệu

Tiến hành định lượng hàm lượng chymotrypsin có trong mẫu trắng, dung dịch placebo, dung dịch chuẩn và dung dịch thử theo quy trình phân tích đã nêu ở mục 2.2.2.3. Ghi lại độ biến thiên độ hấp thụ của dung dịch cơ chất trong 3 phút sau khi thêm các dung dịch trên. Kết quả được trình bày ở Bảng 1 và Bảng 2.

Dung dịch chuẩn và dung dịch thử đều làm giảm độ hấp thụ của dung dịch cơ chất. Dung dịch placebo có làm giảm độ hấp thụ của dung dịch cơ chất, tuy nhiên ảnh hưởng này < 2,0%. Do vậy, phương pháp đã xây dựng có độ đặc hiệu để định lượng chymotrypsin trong viên nén Alpha-Ktal.

3.2. Độ thích hợp của hệ thống

Tiến hành đo độ hấp thụ chymotrypsin trong dung dịch chuẩn 6 lần độc lập theo quy trình phân tích đã nêu ở mục 2.2.2.3. Kết quả được trình bày ở Bảng 3.

Bảng 3. Kết quả kiểm tra tính thích hợp của hệ thống

STT	A_0	A_t	$A_0 - A_t$
1	0,1724	0,1094	0,0630
2	0,1896	0,1255	0,0641
3	0,1710	0,1071	0,0639
4	0,1682	0,1050	0,0632
5	0,1708	0,1097	0,0611
6	0,1902	0,1280	0,0622
Trung bình		0,0629	
RSD (%)		1,78	

Bảng 4. Kết quả khảo sát khoáng tuyển tính

STT	Nồng độ Chymotrypsin (đơn vị USP/ml)	A_0	A_t	$A_0 - A_t$
1	12,0	0,1690	0,1177	0,0513
2	13,0	0,1663	0,1118	0,0545
3	14,0	0,1597	0,1004	0,0593
4	15,0	0,1504	0,0872	0,0632
5	16,0	0,1462	0,0786	0,0676

Phương trình hồi quy: $y = 0,0041x + 0,0014$;
Hệ số tương quan $r = 0,9985$

Chuẩn bị các mẫu tự tạo: Chuẩn bị 3 loại mẫu tự tạo bằng cách thêm chính xác một lượng chất chuẩn chất cần phân tích vào các mẫu giả dược. Lượng chất chuẩn thêm vào tương ứng với 3 mức nồng độ 80%, 100%, 120%. Tại mỗi mức nồng độ, thực hiện ít nhất 3 mẫu độc lập. Tiến hành pha loãng các mẫu tự tạo trên bằng dung dịch HCl 0,0012 N để thu được các dung dịch có nồng độ từ 12 – 16 đơn vị USP chymotrypsin/ml theo quy trình xử lý mẫu ở mục 2.2.2.2.

Tiến hành định lượng theo quy trình phân tích đã nêu ở mục 2.2.2.3. Xác định hoạt chất thu hồi dựa vào định nghĩa đơn vị USP chymotrypsin. Kết quả khảo sát độ đúng của phương pháp được thể hiện ở Bảng 5.

Bảng 5. Kết quả khảo sát độ đúng của phương pháp

Mẫu tự tạo	Khối lượng placebo (mg)	Khối lượng chymotrypsin chuẩn thêm vào (mg)	Độ pha loãng	Nồng độ chymotrypsin thêm vào (đơn vị USP/ml)	$A_0 - A_t$	Nồng độ chymotrypsin tìm lại (đơn vị USP/ml)	Tỷ lệ thu hồi (%)	Trung bình (%)
80%	557,8	12,88	1400	11,96	0,0525	11,67	97,5	98,1% RSD = 3,32%
80%	556,8	12,91	1250	13,43	0,0614	13,64	101,6	
80%	558,2	12,88	1050	15,95	0,0683	15,18	95,2	
100%	556,8	16,27	1750	12,09	0,0543	12,07	99,8	98,3% RSD = 1,92%
100%	557,1	16,71	1600	13,58	0,0604	13,42	98,9	
100%	558,2	16,62	1400	15,43	0,0668	14,84	96,2	
120%	557,6	19,33	2100	11,97	0,0512	11,38	95,1	98,0% RSD = 3,78%
120%	558,4	19,42	1900	13,29	0,0611	13,58	102,2	
120%	558,7	19,72	1700	15,08	0,0657	14,60	96,8	

Trung bình = 98,1%; n = 9, RSD = 2,69%

Kết quả cho thấy hệ thống quang phổ có độ lặp lại tốt với RSD của chênh lệch độ hấp thụ là 1,78% (< 2,0%). Như vậy, hệ thống sử dụng phù hợp cho việc định lượng chymotrypsin trong chế phẩm.

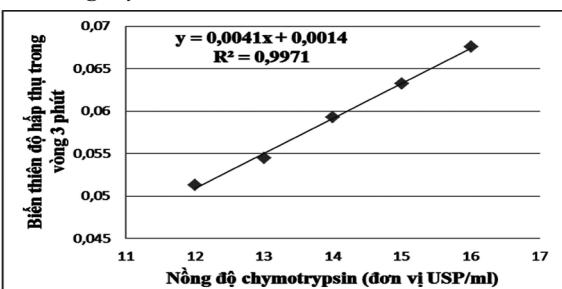
3.3. Khoảng tuyển tính

Khảo sát trên dãy dung dịch chuẩn với 5 nồng độ khác nhau từ 12,0 - 16,0 đơn vị USP chymotrypsin/ml, tiến hành định lượng theo quy trình phân tích ở mục 2.2.2.3. Kết quả được thể hiện ở Bảng 4 và Hình 1.

Trong khoảng nồng độ từ 12,0 đến 16,0 đơn vị USP chymotrypsin/ml có sự tương quan tuyến tính chặt chẽ giữa nồng độ và biến thiên độ hấp thụ với hệ số tương quan $r = 0,9985$.

3.4. Độ đúng

Độ đúng của phương pháp được tiến hành theo phương pháp thêm chuẩn vào mẫu placebo.



Hình 1. Đồ thị biểu diễn mối tương quan tuyến tính giữa nồng độ chymotrypsin và chênh lệch độ hấp thụ

Kết quả thu được trong Bảng 5 cho thấy tỉ lệ thu hồi chymotrypsin đạt từ 95,1% đến 102,2% và RSD nhỏ hơn 5,0% phù hợp cho một phương pháp định lượng các hoạt chất có nguồn gốc sinh học.

3.5. Độ chính xác

3.5.1. Độ lặp lại

Tiến hành định lượng chymotrypsin trong Viên nén

Bảng 6. Kết quả khảo sát độ lặp lại và độ chính xác trung gian của phương pháp

Ngày 1, KNV 1				Ngày 2, KNV 2		
STT	Lượng mẫu thử (mg)	$A_0 - A_t$	Kết quả định lượng (%)	Lượng mẫu thử (mg)	$A_0 - A_t$	Kết quả định lượng (%)
1	34,8	0,0637	111,6	36,0	0,0649	110,0
2	33,0	0,0615	113,6	31,7	0,0557	107,2
3	32,6	0,0591	110,5	30,5	0,0551	110,3
4	33,9	0,0611	109,9	35,1	0,0641	111,5
5	34,1	0,0637	113,9	29,6	0,0548	113,0
6	36,2	0,0648	109,2	31,2	0,0563	110,1
Trung bình = 111,5%; n = 6; RSD = 1,77%				Trung bình = 110,4%; n = 6; RSD = 1,72%		
Kết quả định lượng trung bình = 110,9%; n = 12; RSD = 1,74%						

Kết quả cho thấy phương pháp định lượng chymotrypsin có độ chính xác cao với độ lặp lại trong ngày là 1,77% và 1,72% (n = 6), độ lặp lại khác ngày là 1,74% (n = 12).

3.6. Khoảng xác định

Từ kết quả trong phần độ đúng, các nồng độ này đều nằm trong khoảng độ tuyến tính và đạt yêu cầu về độ lặp lại. Vì vậy đây chính là khoảng nồng độ xác định của phương pháp (từ 12,0 đến 16,0 đơn vị USP/ml).

4. Kết luận

Qua khảo sát chúng tôi đã xây dựng và thẩm định được phương pháp định lượng chymotrypsin trong viên nén Alpha Ktal bằng phương pháp đo quang động học. Nguyên lý của phương pháp dựa vào độ biến thiên độ hấp thụ của dung dịch cơ chất N-acetyl-L-tyrosin ethyl ester theo thời gian tại bước sóng 237 nm, nhiệt độ $25 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ khi có mặt của enzym chymotrypsin. Phương pháp được thẩm định về tính đặc hiệu, độ thích hợp của hệ thống, độ tuyến tính, khoảng xác định, độ đúng, độ lặp lại và độ chính xác trung gian. Kết quả thẩm định cho thấy phương pháp hoàn toàn phù hợp cho việc định lượng chymotrypsin trong viên nén Alpha Ktal và hy vọng có thể áp dụng định lượng hoạt chất này trong các chế phẩm thuốc có thành phần tương tự.

Tài liệu tham khảo

1. Bộ Y tế (2017), *Dược điển Việt Nam*, lần xuất bản thứ năm, NXB Y học, Hà Nội.
2. Cục Quản lý Dược - Bộ Y tế, *Thông tư số 44/2014/TT-BYT* ngày 25/11/2014 của Bộ Y tế quy định về đăng ký thuốc.
3. *The British pharmacopoeia* (2017).
4. *The United states Pharmacopoeia 40* (2017).

SUMMARY

The method for determining the activity of Chymotrypsin in Alpha Ktal tablets by the action with N-acetyl-L-tyrosine ethyl ester and kinetic spectrophotometry method was developed. The Chymotrypsin unit was calculated based on rate of absorbance change within 3 minutes at 237 nm, $25 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$. The method was validated in specificity, linearity, range, accuracy and precision. The results showed that the method had liner over the concentration range of 12.0 – 16.0 USP unit/ml; the accuracy were within 95.1% - 102.2%; the precision had RSD < 5%. Validation results proved that the method was suitable for assay for Chymotrypsin in Alpha-Ktal tablets.

(Ngày nhận bài: 20/12/2017; Ngày phản biện: 07/09/2018 ; Ngày duyệt đăng: 02/01/2019)

XÂY DỰNG VÀ THẨM ĐỊNH PHƯƠNG PHÁP ĐỊNH LƯỢNG ĐỒNG THỜI MỘT SỐ SAPONIN TRONG DƯỢC LIỆU BÂY LÁ MỘT HOA VIỆT NAM BẰNG PHƯƠNG PHÁP HPLC

THÁI NGUYỄN HÙNG THU
Trường Đại học Dược Hà Nội

ĐỖ THỊ HÀ
Viện Dược liệu

CAO NGỌC ANH, MÃ VÂN KIỀU
Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương

Từ khóa: Bảy lá một hoa (PPC); Paris saponin I, II, VI, VII; HPLC; phân tích định lượng

1. Đặt vấn đề

Bảy lá một hoa (*Paris polyphylla* var. *chinensis* Franchet, họ Trong lâu Trilliaceae), còn có các tên gọi khác là Thát diệp nhất chi hoa, Táo hưu, Cú dô (H'Mông) [1]. Bảy lá một hoa là cây thuốc quý và hiếm ở Việt Nam, hiện chỉ còn có ở một vài khu rừng nguyên sinh vùng núi cao, trong đó có ở Vườn Quốc gia Pù Mát (Nghệ An), Vườn Quốc gia Hoàng Liên (Lào Cai). Trên thế giới, chi *Paris* hiện đã biết có 22 loài, phân bố ở Bhutan, Trung Quốc, Ấn Độ, Nhật Bản, Hàn Quốc, Lào, Mongolia, Myanmar, Nepal, Nga, Thái Lan, Việt Nam,...

Thành phần hóa học chủ yếu của Bảy lá một hoa là các saponin steroid và polyphillin, trong đó thành phần hóa học chính và có nhiều hoạt tính sinh học được công bố cho đến thời điểm hiện nay là các saponin steroid có aglycon là diosgenin và penogenin. Diosgenin saponin có các hợp chất đáng chú ý: diosgenin, chonglou saponin I (polyphillin D, paris saponin I), chonglou saponin II (paris saponin II, paris II, polyphillin II), dioscin (paris saponin III), paris IV, paris V, gracillin, polyphillin C, E, F, trillin,... Penogenin saponin gồm có các hợp chất đáng chú ý là: chonglou saponin VI (paris saponin VI, paris VI), chonglou saponin VII (paris saponin VII, paris VII, Tg), paris saponin H (paris H) [2],[3].

Bảy lá một hoa (*Paris chinensis*) đã được chứng minh có các tác dụng điều trị ung thư, giảm đau, chống viêm, kích thích miễn dịch, chữa rắn độc cắn,... Đóng góp phần đánh giá tiềm năng và tiêu chuẩn hóa dược liệu này, chúng tôi nghiên cứu xây dựng phương pháp định lượng một số chất phân lập được của cây Bảy lá một hoa.

2. Thực nghiệm

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

2.1.1. Thiết bị và dụng cụ

Sử dụng các thiết bị của Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương được hiệu chuẩn đáp ứng yêu cầu theo ISO/IEC 17025 và GLP:

- Máy sắc ký lỏng hiệu năng cao Agilent 1260;
- Bảng siêu âm ELMAS 180/H (Đức);
- Bộ lọc dung môi, lọc mẫu với màng lọc 0,45 µm;

- Cân phân tích MS 105 Mettler Toledo (Thụy Sĩ) có độ chính xác 0,01 mg và cân phân tích XS-204 Mettler Toledo (Thụy Sĩ) có độ chính xác 0,1 mg.

2.1.2. Hóa chất và chất chuẩn

- *Dung môi, hóa chất:* acetonitril, methanol (Merck – Đức); cồn 96%, nước cất hai lần, n-hexan, ethyl acetate, cloroform, aceton, dichloromethane,... đạt tiêu chuẩn tinh khiết dùng cho phân tích hoặc cho HPLC.

- *Các chất chuẩn được cung cấp bởi Chengdu Biopurify PhytoChemicals Ltd (Trung Quốc) gồm:*

+ Paris saponin I (PS I) (lô PRF8051026, hàm lượng 99,92%, độ ẩm 1,38%);

+ Paris saponin II (PS II) (lô PRF8051027, hàm lượng 99,78%, độ ẩm 1,34%);

+ Paris saponin VI (PS VI) (lô PRF8051211, hàm lượng 99,95%, độ ẩm 1,20%);

+ Paris saponin VII (PS VII) (lô: PRF8041822, hàm lượng 99,37%, độ ẩm 1,12%).

2.2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Đối tượng nghiên cứu

Dược liệu: Mẫu nghiên cứu được sử dụng để xây dựng và thẩm định tiêu chuẩn là phần thân rễ cây Bảy lá một hoa thu hái tại Lào Cai vào tháng 11 năm 2017 (PPC 01). Một số mẫu khác được thu hái tại các vùng khác ở Việt Nam gồm Cao Bằng, Lai Châu, Lào Cai. Các mẫu nghiên cứu đã được giám định tên khoa học tại Khoa Tài nguyên Dược liệu - Viện Dược liệu (ThS. Nguyễn Quỳnh Nga) và Bộ môn Dược liệu - Trường Đại học Dược Hà Nội (PGS.TS. Nguyễn Hoàng Tuấn). Mã số tiêu bản thu tại Cao Bằng, Lai Châu, Lào Cai được trình bày trong Bảng 4.

2.2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.2.1. Điều kiện sắc ký

Pha động: Hỗn hợp methanol – nước (có 0,1% acid formic), acetonitril – nước (có 0,1% acid formic), acetonitril – nước (có 0,1% acid phosphoric), methanol – nước (có 0,1% acid phosphoric) với tỷ lệ thành phần khác nhau. Cột C18 (250 x4,6 mm, 5 µm); Detector DAD đặt ở chế độ quét phổ từ 200 - 400 nm; Tốc độ dòng: 0,8 - 1,2 ml/phút; Nhiệt độ cột: 30°C và 40°C; Thể

tích tiêm mẫu: 10 µl và 20 µl.

2.2.2.2. Chuẩn bị mẫu

Dung dịch thử: Mẫu dược liệu sau khi làm khô tự nhiên được nghiền nhỏ và xác định độ ẩm bằng phương pháp sấy trong tủ sấy ở áp suất thường (Dược điển Việt Nam V - Phụ lục 9.6). Sau đó tiến hành chiết hồi lưu với dung môi là methanol, cô dịch chiết thu được để có cẩn toàn phần. Xác định hiệu suất chiết. Cân chính xác khoảng 0,2 g cẩn, pha loãng và định mức trong bình 50 ml bằng methanol, lọc qua màng lọc 0,45 µm.

Dung dịch chuẩn gốc: Hòa tan 10,75 mg PS VII (tương ứng 10,55 mg PS VII khan); 10,10 mg PS VI (tương ứng 9,95 mg PS VI khan); 11,95 mg PS II (tương ứng 11,75 mg PS II khan) và 12,85 mg PS I (tương ứng 12,65 mg PS I khan) với lượng methanol thích hợp thu được các dung dịch chuẩn gốc tương ứng. Các dung dịch chuẩn gốc này được pha loãng với một lượng thích hợp methanol để thu được các dung dịch chuẩn và dung dịch hỗn hợp các chuẩn.

2.2.2.3. Xây dựng phương pháp phân tích

Lựa chọn bước sóng phát hiện, khảo sát dung môi và thành phần dung môi, tốc độ dòng, thể tích tiêm mẫu để tìm ra phương pháp định lượng phù hợp.

2.2.2.4. Thẩm định phương pháp phân tích

+ Tính chọn lọc của phương pháp: Tiến hành sắc ký dung dịch mẫu trắng, dung dịch chuẩn và dung dịch thử. Sắc ký đồ của mẫu trắng không xuất hiện pic có thời gian lưu tương ứng với thời gian lưu của pic chính trên sắc ký đồ của dung dịch chuẩn. Nếu có đáp ứng pic phải ≤ 1,0% so với đáp ứng pic của dung dịch chuẩn. Sắc ký đồ của dung dịch thử xuất hiện pic có thời gian lưu tương ứng với thời gian lưu của pic chính trên sắc ký đồ của dung dịch chuẩn;

+ Tính thích hợp của hệ thống sắc ký: Tiến hành sắc ký với dung dịch chuẩn có nồng độ chính xác. Độ lệch chuẩn tương đối của các thời gian lưu và diện tích pic từ 6 lần tiêm lặp lại không lớn hơn 2,0%;

+ Khoảng tuyển tính: Tiến hành sắc ký dây dung dịch chuẩn đã chuẩn bị, ghi nhận sắc ký đồ và xác nhận đáp ứng pic. Thiết lập phương trình hồi quy tuyển tính và hệ số tương quan tuyển tính giữa nồng độ chất chuẩn và diện tích pic tương ứng;

+ Độ đúng: Xác định bằng phương pháp thêm chuẩn;

+ Độ chính xác: Tiến hành trên 6 mẫu thử khác nhau;

+ Giới hạn phát hiện và giới hạn định lượng: Xác định dựa trên sắc ký đồ của dung dịch chuẩn so với nhiều đường nền.

2.2.2.5. Xử lý số liệu

Các kết quả sắc ký được xử lý bằng phần mềm Chemstation của thiết bị HPLC, tính toán và xử lý thống

kê với sự hỗ trợ của phần mềm Microsoft Excel phiên bản 2016.

3. Kết quả và bàn luận

3.1. Độ ẩm và hiệu suất chiết

Độ ẩm trung bình của dược liệu xác định được là 11,27%.

Cân 100,9438 g dược liệu phần thân rễ cây Bảy lá một hoa (độ ẩm 11,27%) đã được làm nhỏ, chiết hồi lưu 5 lần, mỗi lần chiết với 100 ml methanol trong thời gian 60 phút, thu dịch chiết, lọc, bốc hơi cách thủy dung môi trên tới cẩn. Cẩn được sấy ở áp suất giảm ở 60 °C đến khói lượng không đổi thu được 16,0042 g cẩn toàn phần, bảo quản ở 4-6 °C. Hiệu suất thu được cẩn toàn phần là 17,87%.

3.2. Lựa chọn điều kiện sắc ký

Trong số các cột khảo sát, chỉ có cột Waters -C18 (250 mm x 4,6 mm, 5 µm) là phù hợp, cho các pic tách khỏi nhau hoàn toàn, thời gian lưu hợp lý và nhiệt độ cột 40 °C là phù hợp nhất.

Chúng tôi tiến hành khảo sát pha động với các hệ dung môi: methanol – nước (có 0,1% acid formic), acetonitril – nước (có 0,1% acid formic), acetonitril – nước (có 0,1% acid phosphoric), methanol – nước (có 0,1% acid phosphoric) với tỷ lệ thành phần khác nhau. Kết quả khảo sát cho thấy sử dụng hệ pha động acetonitril (kênh A) và nước có 0,1% acid phosphoric (kênh B) với chế độ gradient dung môi cho kết quả tốt nhất. Đã chọn được chương trình chạy sắc ký có khả năng tách tốt cả 4 hợp chất cần phân tích, cho pic nhọn, cân đối và thời gian lưu hợp lý, thời gian phân tích không quá dài.

Khảo sát các tốc độ dòng khác nhau trong khoảng từ 0,8 - 1,2 ml/phút cho thấy tốc độ dòng 1,0 ml/phút là phù hợp cho kết quả tách tốt, pic cân đối, thời gian lưu hợp lý.

Dựa vào phổ hấp thụ của các chất đối chiếu, bước sóng 203 nm được lựa chọn cho các nghiên cứu tiếp theo để tất cả các chất đều có thể cho pic có diện tích đủ lớn.

Qua khảo sát chúng tôi đã lựa chọn được điều kiện sắc ký như sau:

- Cột: Cột Waters - C₁₈ (250 x 4,6 mm; 5 µm), nhiệt độ 40°C;

- Pha động: Sử dụng hệ pha động acetonitril (kênh A) và nước có 0,1% acid phosphoric (kênh B) với chương trình gradient dung môi:

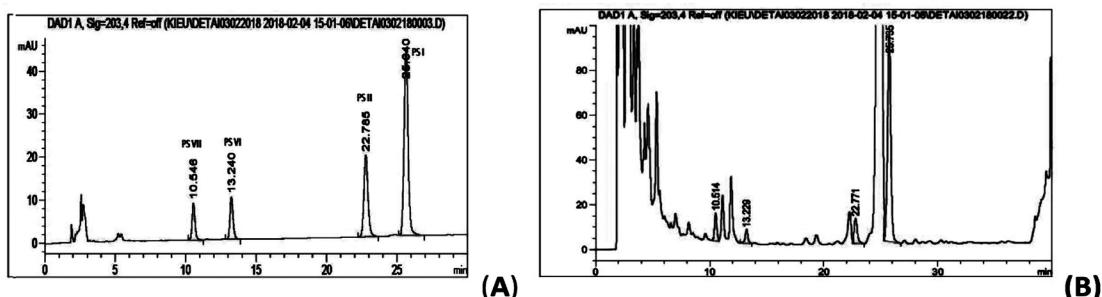
Thời gian (phút)	% Kênh A	% Kênh B
0	40	60
15	45	55
35	55	45
36	100	0
40	40	60

- Tốc độ dòng: 1,0 ml/phút.

- Bước sóng phát hiện $\lambda = 203$ nm.

- Thể tích tiêm: 10 μl .

Với điều kiện sắc ký như trên, các chất trong hỗn hợp chuẩn và trong mẫu thử chuẩn bị từ dịch chiết toàn phần PPC đều được tách tương đối tốt, pic cân đối, thời gian lưu hợp lý. Các SKĐ thu được như ở Hình 1.



Hình 1. Sắc ký đồ của hỗn hợp 4 chất đôi chiều (A) và dịch chiết PPC (B).

Tiến hành sắc ký với từng chất đôi chiều và so sánh với sắc ký đồ thu được của hỗn hợp 4 chất, xác định được thời gian lưu của các chất, PS VII, PS VI, PS II và PS I lần lượt là khoảng 10,5 phút; 13,2 phút; 22,7 phút và 25,6 phút.

Tiến hành so sánh phổ UV-VIS trên máy HPLC với detector DAD của các pic có cùng thời gian lưu trên sắc ký đồ với hỗn hợp chất đôi chiều và mẫu thử là dịch chiết Bảy lá một hoa. Kết quả thu được khi tiến hành chồng phổ UV – VIS với detector DAD của phổ chất đôi chiều và phổ mẫu thử với cùng thời gian lưu cho hệ số Match của các chất như sau: PS VII là 990,1; PS VI là 994,5; PS II là 996,7 và PS I là 998,3.

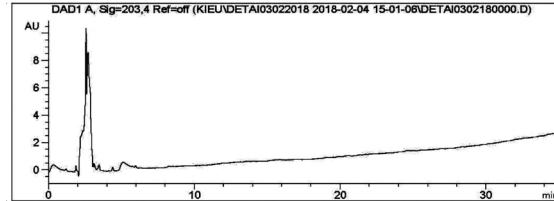
Từ kết quả trên chỉ ra rằng giữa phổ của mẫu thử trong dịch chiết *Paris polyphylla* var. *Chinensis* và phổ của các chất đôi chiều là khá tương đồng.

3.3. Thẩm định phương pháp định lượng

Tiến hành tiêm lặp lại 6 lần dung dịch đôi chiều đã được chuẩn bị, ghi lại các giá trị về thời gian lưu, diện tích pic. Thời gian lưu trung bình của PS VII là 10,521 phút; PS VI là 13,221 phút; PS II là 22,767 phút và PS I là 25,630 phút với độ lặp lại lần lượt là 0,23%; 0,15%; 0,08% và 0,04%. Độ lệch chuẩn tương đối của diện tích pic sau 6 lần sắc ký với các chất nghiên cứu lần lượt là 0,75%; 1,31%; 0,70% và 0,69%. Kết quả khảo sát cho thấy, độ lặp lại tương đối của thời gian lưu và diện tích pic của các chất chuẩn nghiên cứu đều nhỏ hơn 2%, chứng tỏ hệ thống sắc ký có độ lặp lại cao đối với các chất phân tích.

Bảng 1. Kết quả khảo sát khoảng tuyến tính

Chất nghiên cứu	% so với mức định lượng	Khoảng nồng độ (mg/ml)	Phương trình hồi quy tuyến tính	Hệ số tương quan tuyến tính
PS VII	40% - 200%	0,0211 - 0,1056	$y = 2288,3 x + 1,4$	0,9993
PS VI	40% - 200%	0,0199 - 0,0997	$y = 3099,7 x + 1,5$	0,9985
PS II	40% - 200%	0,0588 - 0,2941	$y = 2633 x + 2,2$	0,9997
PS I	40% - 200%	0,1266 - 0,6331	$y = 2850,5 x + 0,1$	0,9988



Hình 2. Sắc ký đồ của mẫu trắng

Độ lặp lại của phương pháp được kiểm tra qua 6 mẫu thử riêng biệt, mỗi mẫu thử tiêm lặp lại nhiều lần, tính hệ số F, lấy giá trị trung bình và RSD của hệ số F. Hệ số F là tỷ lệ giữa diện tích pic thu được trên sắc ký đồ với khối lượng cẩn được lấy để chuẩn bị mẫu và được tính riêng theo từng pic ứng với các hợp chất nghiên cứu. RSD của hệ số F với các hợp chất PS VII, PS VI, PS II và PS I thu được lần lượt là 1,23; 1,81; 1,86 và 1,86%. Kết quả khảo sát cho thấy chương trình sắc ký đã lựa chọn có độ lặp lại cao.

Từ dung dịch chuẩn gốc thu được pha thành dây các dung dịch chuẩn gồm 5 mẫu có nồng độ tăng dần trong khoảng thích hợp (Bảng 1). Hỗn hợp được tiêm vào hệ thống sắc ký để khảo sát khoảng tuyến tính.

Kết quả khảo sát cho thấy có sự tương quan tuyến tính chặt chẽ giữa diện tích pic và nồng độ chất phân tích trong khoảng nồng độ khảo sát.

Độ đúng được thẩm định bằng cách thêm vào mẫu thử một lượng chính xác chất đối chiếu sao cho tổng lượng hoạt chất có trong mẫu nằm trong khoảng tuyến tính.

Bảng 2. Tổng hợp kết quả khảo sát độ đúng của 4 hợp chất phân tích

STT	Hợp chất	Độ tìm lại (%)	
		Trung bình	min - max
1	PS VII	99,63	96,26 - 102,49
2	PS VI	100,12	97,65 - 104,86
3	PS II	98,75	95,38 - 102,38
4	PS I	102,26	99,08 - 104,96

Kết quả cho thấy phương pháp phân tích đã lựa chọn cho độ thu hồi tương đối tốt (nằm trong khoảng 95,0 đến 105,0%, đáp ứng yêu cầu về độ đúng của một phương pháp phân tích, nhất là trong một nền mẫu phức tạp như dược liệu).

Giới hạn phát hiện và giới hạn định lượng của các chất nghiên cứu:

Bảng 3. Kết quả khảo sát LOD và LOQ

	PS VII	PS VI	PS II	PS I
LOD ($\mu\text{g/ml}$)	1,060	0,998	1,470	2,500
LOQ ($\mu\text{g/ml}$)	3,500	3,290	4,850	8,250

Bảng 4. Thông tin mẫu nghiên cứu thu tại một số vùng khác nhau

STT	Ký hiệu mẫu phân tích	Bộ phận dùng (nghiên cứu)	Nơi thu hái	Thời gian thu hái	Mã số tiêu bản
1	PPC 04	Thân rễ	Cao Bằng	09/2017	TB-9006
2	PPC 05	Thân rễ	Lai Châu	12/2016	TB-122016
3	PPC 16	Thân rễ	Lào Cai	12/2017	TB-201217

Bảng 5. Kết quả định lượng các chất nghiên cứu trong các mẫu dược liệu Bảy lá một hoa

STT	Hàm lượng (g/100 g dược liệu khô)					
	Nơi thu hái	PS VII	PS VI	PS II	PS I	
1	Lào Cai PPC 16	0,223	0,000	0,101	0,521	
		0,228	0,000	0,103	0,476	
		0,215	0,000	0,096	0,476	
4	Trung bình Cao Bằng PPC 04	0,222	0,000	0,100	0,491	
		0,105	0,000	0,000	0,000	
		0,103	0,000	0,000	0,000	
		0,107	0,000	0,000	0,000	
7	Trung bình Lai Châu PPC 05	0,105	0,000	0,000	0,000	
		0,078	0,000	0,305	0,573	
		0,073	0,000	0,291	0,546	
8		0,070	0,000	0,298	0,564	
		0,074	0,000	0,298	0,561	

3.4. Áp dụng phương pháp đã xây dựng để xác định hàm lượng 4 hợp chất saponin trong mẫu PPC nghiên cứu và mẫu thu hái tại một số vùng khác nhau

+ Xác định hàm lượng các chất có trong dược liệu PPC (thân rễ)

Phương pháp đã thẩm định ở trên được áp dụng để xác định hàm lượng các hợp chất nghiên cứu trong mẫu thân rễ cây Bảy lá một hoa thu hái được (PPC 01).

Tiến hành cân một lượng chính xác khoảng 0,20 g cẩn toàn phần được chiết bằng methanol từ thân rễ cây Bảy lá một hoa thu hái được vào bình định mức 50 ml. Hòa tan và làm đầy bằng methanol, lọc qua màng lọc 0,45 μm . Tiến hành sắc ký song song mẫu thử với mẫu chuẩn hỗn hợp các chất đối chiếu. Nồng độ các chất nghiên cứu được tính theo phương pháp so sánh. Từ khôi lượng và độ ẩm dược liệu đem chiết cùng tổng lượng cẩn thu được tính ra hàm lượng từng chất có trong 100 g dược liệu ($n = 6$) như sau: PS VII: 0,32%; PS VI: 0,14%; PS II: 0,41% và PS I: 2,48%. Các số liệu trên chỉ là sơ bộ, cần tiến hành thêm trên nhiều mẫu khác để có số liệu chính xác hơn về hàm lượng các chất trên trong dược liệu Bảy lá một hoa.

+ Xác định hàm lượng 4 saponin trong một số dược liệu PPC thu hái tại một số vùng khác nhau

Tiến hành kiểm tra sơ bộ sự có mặt của các chất nghiên cứu trong một số mẫu thu hái được như sau:

Quá trình chiết xuất các chất từ dược liệu là thân rễ của cây Bảy lá một hoa được tiến hành tương tự như mẫu PPC 01. Cân chính xác khoảng 0,20 g cẩn, hòa tan và định mức thành 50 ml bằng methanol, lọc qua màng lọc 0,45 μm . Tiến hành sắc ký song song mẫu thử và mẫu chuẩn hỗn hợp các chất đối chiếu. Từ hiệu suất cẩn thu được, hàm lượng các chất nghiên cứu có trong 100 g dược liệu được trình bày ở Bảng 5.

Kết quả phân tích hàm lượng 4 paris saponin I, II, VI, VII trong một số mẫu thân rễ cây Bảy lá một hoa thu tại 3 vùng nghiên cứu là Lào Cai, Cao Bằng, Lai Châu (Bảng 5) cho thấy hợp chất paris saponin VI không phát hiện thấy trong 3 mẫu dược liệu này trong khi đó hàm lượng các saponin khác dao động lớn tùy từng vùng (từ 0 đến 0,561 g/100 g dược liệu PPC khô).

4. Kết luận

Đã xây dựng phương pháp định lượng đồng thời 4 hợp chất phân lập được từ dược liệu Bảy lá một hoa bằng phương pháp HPLC. Phương pháp đã được áp dụng để sơ bộ xác định hàm lượng các chất nghiên cứu trong dược liệu Bảy lá một hoa thu hái tại Lào Cai, Cao Bằng và Lai Châu. Kết quả cho thấy phương pháp xây dựng hoàn toàn có thể áp dụng với các mẫu nghiên cứu khác nhau của dược liệu Bảy lá một hoa.

Tài liệu tham khảo

- Đỗ Huy Bích, Đặng Quang Chung, Bùi Xuân Chương, Nguyễn Thượng Đồng, Đỗ Trung Đàm, Phạm Văn Hiển, Vũ Ngọc Lô, Phạm Duy Mai, Phạm Kim Mân, Đoàn Thị Nhu, Nguyễn Tập, Trần Toàn (2006), *Cây Thuốc và động vật làm thuốc ở Việt Nam*, Tập I, NXB Khoa học và kỹ thuật, 182 – 184.
- Wei J.C., Gao W.Y., Yan X.D. et al (2014), “Chemical constituents of plants from the Genus Paris”, *Chemistry & Biodiversity*. 11(9), 1277-1297.
- Huang Y., Wang Q., Ye W. C., (2005b). “A new homo-cholestane glycoside from *Paris polyphylla* var. *chinensis*”, *Chinese Journal of Natural Medicines*, 3, 138-140.

SUMMARY

This study has established a HPLC procedure for determination of several saponins in *Paris polyphylla* var. *chinensis* (PPC) based on a basic chromatographic system with Water C18 column, gradient mobile phase of Acetonitrile and 0.1% Phosphoric acid, flow rate 1.0 ml/min. and UV detector at 203 nm. The result of method validation also confirmed that this procedure was suitable for studied purpose because it not only was a large linear, high selective and accurate method but also could detect all of studied saponins at low concentration (lower than 8.250 µg/ml) as well as the limit of detections for studied saponins. This assay procedure also applied for investigation of several PPC samples. Results showed that established procedure was appreciate for all samples and there were significant differences of studied saponins following plant distribution.

(Ngày nhận bài: 22/11/2017 ; Ngày phản biện: 24/8/2018 ; Ngày duyệt đăng: 02/01/2019)

NGHIÊN CỨU XÂY DỰNG PHƯƠNG PHÁP PHÁT HIỆN VÀ ĐỊNH LƯỢNG ĐỒNG THỜI HAI ĐỒNG PHÂN BUTYLPARABEN VÀ ISOBUTYLPARABEN TRONG MỘT SỐ MỸ PHẨM

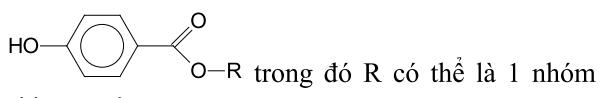
THÁI NGUYỄN HÙNG THU
Trường Đại học Dược Hà Nội

LÊ THỊ HƯỜNG HOA, NGÔ THỊ DUYÊN
Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương

Từ khóa: Định lượng đồng thời, đồng phân, Butylparaben, Isobutylparaben, mỹ phẩm

1. Đặt vấn đề

Paraben được tạo ra từ phản ứng ester hóa acid p-hydroxy benzoic, có công thức hóa học chung:



alkyl hay aryl.

Paraben được sử dụng trong mỹ phẩm, dược phẩm và các sản phẩm chăm sóc sức khỏe khác, có tác dụng làm chậm sự phát triển của nấm và vi khuẩn, hạn chế sự phân hủy của dược chất. Tuy nhiên, một số nghiên cứu cho thấy các paraben có thể gây ra những rối loạn nội tiết, hình thành và phát triển ung thư vú, các nghiên

cứu invitro cũng chỉ ra rằng các paraben còn có thể kích thích việc tăng sinh các tế bào ung thư [2]. Như vậy việc kiểm soát paraben trong các sản phẩm mỹ phẩm là rất cần thiết vì mỹ phẩm thường được sử dụng lâu dài, không có quy định về liều lượng và thời gian sử dụng.

Tại kỳ họp lần thứ 21, Hội đồng Mỹ phẩm ASEAN đã đưa isobutylparaben vào danh mục các chất bị cấm sử dụng trong mỹ phẩm [1]. Isobutylparaben (IBuP) và butylparaben (BuP) là 2 hợp chất thuộc nhóm paraben có cùng công thức hóa học $C_{11}H_{14}O_2$, chỉ khác nhau về cấu trúc mạch nhánh, vì butylparaben có cấu trúc mạch thẳng, ít độc hơn, được phép dùng riêng trong mỹ phẩm với nồng độ tối đa là 0,14% (dưới dạng acid) [2]. Hiện

nay chưa có tài liệu chính thống nào đưa ra phương pháp phát hiện và định lượng đồng thời cả 2 đồng phân này mà một chất bị cấm, một chất lại có giới hạn sử dụng. Để góp phần phục vụ cho công tác kiểm tra chất lượng mỹ phẩm, chúng tôi đã thực hiện nghiên cứu xây dựng phương pháp phát hiện và định lượng đồng thời hai đồng phân butylparaben và isobutylparaben trong một số mỹ phẩm.

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

Tất cả các thiết bị và dụng cụ phân tích được hiệu chuẩn theo quy định của ISO/IEC 17025 và GLP gồm:

- Máy sắc ký lỏng hiệu năng cao Agilent 1260.
- Cân phân tích Mettler Toledo có độ chính xác 0,01 mg.
- Máy lắc siêu âm.
- Bình định mức và các dụng cụ thủy tinh có độ chính xác phù hợp.

2.1.2. Hóa chất, chất chuẩn

* Chất đối chiếu:

- Isobutylparaben (Canada), Lô: 3-SCC-165-1, hàm lượng: 98%

- Butylparaben (Sigma-Aldrich), Lô: BCBM9217V, hàm lượng: 99,1%.

* Dung môi, hóa chất: Đạt tiêu chuẩn tinh khiết dùng cho HPLC.

2.2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Các mẫu sử dụng để xây dựng và thẩm định phương pháp

- Mẫu sữa rửa mặt cao cấp Benew Snail sản xuất tại

Hàn Quốc;

- Mẫu nước súc miệng Colgate Plax Peppermint fresh sản xuất tại Thái Lan;
- Mẫu son dưỡng có màu LipIce sheer color sản xuất tại Công ty TNHH Rohto - Mentholatum (Việt Nam);

- Các mẫu mỹ phẩm khác dùng để kiểm tra khả năng áp dụng phương pháp đã xây dựng.

2.2.2. Phương pháp nghiên cứu

Sử dụng 3 mẫu đại diện cho các nhóm sản phẩm là sữa rửa mặt, nước súc miệng và son môi để xây dựng và thẩm định phương pháp. Khảo sát thực nghiệm để tìm ra điều kiện sắc ký và quy trình xử lý mẫu phù hợp. Phương pháp xây dựng được thẩm định trên các chỉ tiêu: sự phù hợp của hệ thống sắc ký, độ lặp lại, độ tuyến tính, khoảng xác định, độ đúng, giới hạn phát hiện (LOD) và giới hạn định lượng (LOQ) [3],[4].

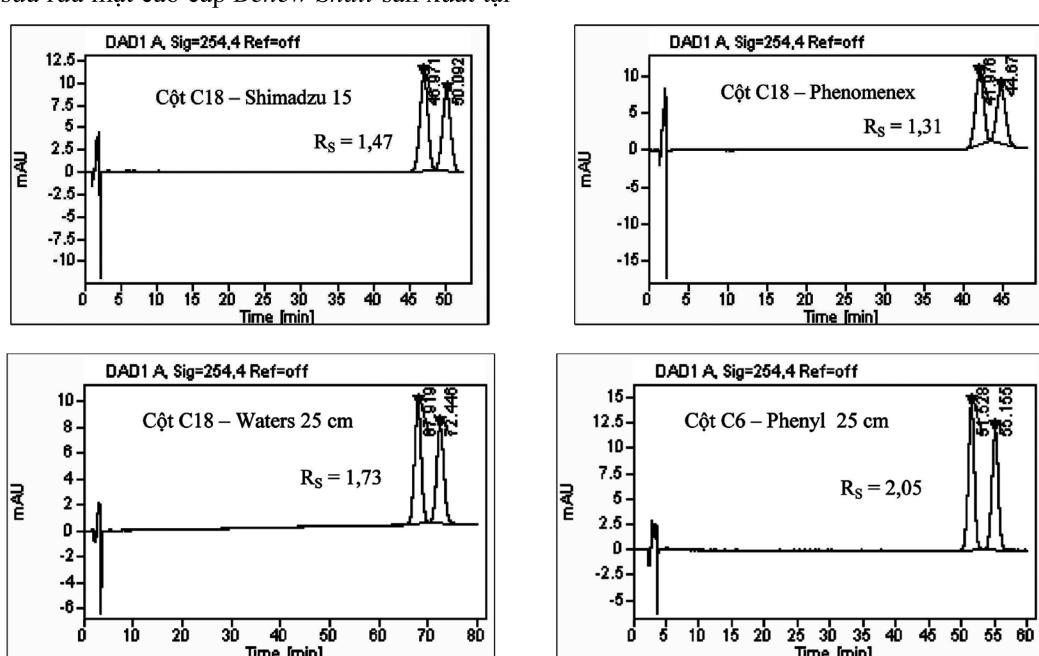
Các kết quả thực nghiệm được tính toán và xử lý thống kê trên Microsoft Excel với các hàm thống kê thông dụng.

3. Kết quả và bàn luận

3.1. Khảo sát xây dựng quy trình

3.1.1. Khảo sát lựa chọn cột

Tiến hành sắc ký dung dịch hỗn hợp chuẩn của 2 chất nghiên cứu isobutylparaben (IBuP) và butylparaben (BuP) với pha động là hỗn hợp acetonitril (ACN) - nước tỷ lệ 30:70 trên các cột C₁₈ - Phenomenex, cột C₁₈ - Shimadzu, cột C₁₈ - Waters và cột C₆ - Phenyl.



Hình 1. SKĐ của chuẩn hỗn hợp IBuP và BuP trên các cột khác nhau

Kết quả thu được như ở Hình 1 cho thấy:

- Trên cột C₁₈ – Phenomenex và cột C₁₈ – Shimadzu: các pic được rửa giải sớm, tuy nhiên độ phân giải thu được thấp ($R_s = 1,31$ và $R_s = 1,47$), pic doãng.

- Trên cột C₁₈ – Water: độ phân giải giữa 2 pic cao hơn ($R_s = 1,73$) nhưng pic được rửa giải muộn và doãng.

- Trên cột C₆-Phenyl: độ phân giải thu được tốt nhất ($R_s = 2,05$), pic cân đối và đẹp, chiều cao pic tốt nhất, phù hợp với việc phân tích các chất cám (cần giới hạn phát hiện thấp).

Như vậy, cột C₆-Phenyl được chọn để tiếp tục nghiên cứu.

3.1.2. Khảo sát lựa chọn pha động

- *Khảo sát chọn thành phần pha động:*

Thử nghiệm trên cột C₆-Phenyl với các hỗn hợp pha động là methanol (MeOH) – nước và acetonitril - nước ở các tỷ lệ khác nhau. Kết quả thử nghiệm cho thấy với pha động MeOH - nước (52:48) và ACN - nước (33:67) thời gian rửa giải và khả năng tách 2 pic tương đương nhau, tuy nhiên ở pha động ACN - nước (33:67) dáng pic gọn, đẹp và cân đối hơn. Do đó pha động ACN - nước(33:67) được lựa chọn.

Tiếp tục thử nghiệm với các pha động là ACN - nước; ACN - Dung dịch đậm có pH khác nhau ở cùng tỷ lệ 33:67. Kết quả cho thấy với pha động ACN - Dung dịch đậm pH 7,0 cho sắc ký đồ có nhiều nhược điểm nhất (pic xấu, doãng, không đổi xứng và độ phân giải thấp nhất). Với pha động ACN - nước và ACN - Dung dịch đậm pH 2,5 cho pic tương tự nhau về thời gian lưu (t_R), hệ số phân giải (R_s) và độ đổi xứng của pic. Tuy nhiên, trên nền mẫu sữa rửa mặt, pha động ACN - nước thì đường nền gần pic sắc ký biến đổi làm xuất hiện pic “lạ”. Trong khi đó pha động có thành phần là ACN - Dung dịch đậm pH 2,5 không xuất hiện hiện tượng này nên được chọn để khảo sát tiếp về tỷ lệ các thành phần.

- *Khảo sát chọn tỷ lệ các thành phần:*

Pha động ACN - Dung dịch đậm pH 2,5 với các tỷ lệ 33:67; 35:65 và 37:63 đã được thử nghiệm. Dựa vào thời gian lưu và độ phân giải, pha động được lựa chọn là ACN - Dung dịch đậm pH 2,5 tỷ lệ 35:65 vì cho các pic tách hoàn toàn, cân xứng và thời gian lưu không quá dài.

3.1.3. Khảo sát dung môi pha mẫu

Sử dụng dung môi pha mẫu là MeOH và pha động (ACN - Dung dịch đậm pH 2,5, tỷ lệ 35:65), tiến hành sắc ký với các mẫu tự tạo trên một số nền mẫu. Kết quả cho thấy:

- Với dung môi pha mẫu là methanol, trên nền mẫu nước súc miệng Cogate: pic đẹp, cân đối, giống với pic thu được từ dung dịch chuẩn. Tuy nhiên trên hai nền mẫu sữa rửa mặt thì pic bị biến dạng hoặc tách thành hai pic.

- VỚI dung môi pha mẫu là pha động thì trên cả 3 nền mẫu pic đều đẹp và cân đối.

Do đó pha động là hỗn hợp ACN và dung dịch đậm pH 2,5 (35:65) được lựa chọn làm dung môi pha mẫu.

3.2. Xây dựng quy trình

Sau khi khảo sát và lựa chọn các điều kiện phân tích, chúng tôi đưa ra quy trình thử như sau:

3.2.1. Chuẩn bị mẫu thử

- *Mẫu nước súc miệng:* Cân chính xác khoảng 0,5 g nước súc miệng vào bình định mức 50 ml, thêm 4 ml methanol, lắc đều, thêm 30 ml pha động, lắc siêu âm 10 phút. Để nguội, thêm pha động vừa đủ đến vạch, lắc đều. Lọc qua màng lọc 0,45 µm.

- *Mẫu sữa rửa mặt:* Cân chính xác khoảng 0,5 g sữa rửa mặt vào cốc có mỗ 50 ml, thêm 4 ml methanol, dùng đũa thủy tinh phân tán chế phẩm đều trong cốc, thêm 20 ml pha động, lắc siêu âm 10 phút, chuyển vào bình định mức 50 ml. Tráng rửa cốc 3 lần với 15 ml pha động và chuyển vào bình định mức trên. Để nguội, thêm pha động vừa đủ đến vạch, lắc đều. Sau đó, ly tâm 10 phút với tốc độ 10000 vòng/phút, lấy lớp dịch trong phía trên lọc qua màng lọc 0,45 µm.

- *Mẫu son môi:* Cân chính xác khoảng 0,5 g son vào cốc có mỗ 50 ml, thêm 4 ml methanol, dùng đũa thủy tinh phân tán đều son trong cốc, thêm 20 ml pha động, để trong cách thủy nóng (70 – 80°C) đến khi son rã hết, lắc siêu âm 10 phút, chuyển vào bình định mức 50 ml. Tráng rửa cốc 3 lần với 20 ml pha động và chuyển vào bình định mức trên. Để nguội, thêm pha động vừa đủ đến vạch, lắc đều. Để lạnh trong nước đá 10 phút. Lọc phần dung dịch trong qua màng lọc 0,45 µm.

3.2.2. Chuẩn bị mẫu chuẩn hỗn hợp

Cân chính xác khoảng 10 mg chất chuẩn isobutylparaben và 10 mg chuẩn butylparaben vào bình định mức 100 ml, thêm 70 ml methanol, lắc cho tan. Thêm methanol vừa đủ đến vạch, lắc đều. Hút chính xác 4,0 ml dung dịch trên pha loãng thành 50,0 ml bằng pha động. Lọc qua màng lọc 0,45 µm.

3.2.3. Điều kiện sắc ký

- Cột Phenomenex C₆ Phenyl (250 x 4,6 mm, 5 µm).

- Pha động: Acetonitril - Dung dịch đậm kali dihydrophosphat (KH₂PO₄) pH 2,5 (35:65). Điều chỉnh tỷ lệ nếu cần.

Dung dịch đậm KH₂PO₄ 0,05M, pH 2,5 được chuẩn bị như sau: Cân 3,4 g kali dihydrophosphat hòa tan trong 900 ml nước, điều chỉnh đến pH 2,5 bằng acid phosphoric (H₃PO₄), sau đó thêm nước vừa đủ 1000 ml.

- Bước sóng phát hiện: 254 nm

- Tốc độ dòng: 1,0 ml/phút
- Thể tích tiêm: 20 µl.

3.2.4. Ứng dụng phương pháp để phân tích mẫu

- **Định tính:** So sánh thời gian lưu của pic thu được từ dung dịch thử và pic thu được từ dung dịch chuẩn và so sánh phổ UV-VIS của pic thu được từ dung dịch thử có thời gian lưu tương ứng với pic thu được từ dung dịch chuẩn và hệ số chòng phỗ của các pic này phải không được nhỏ hơn 0,99.

- **Định lượng:** Từ các giá trị diện tích pic, lượng cân mẫu chuẩn và mẫu thử, độ pha loãng tính ra hàm lượng các chất bảo quản có trong chế phẩm.

3.3. Đánh giá quy trình

3.3.1. Tính thích hợp của hệ thống sắc ký

Tiến hành tiêm lặp lại 6 lần dung dịch chuẩn hỗn hợp trong mục 3.2.2 vào hệ thống sắc ký, kết quả thể hiện ở Bảng 1.

Bảng 1. Tính thích hợp của hệ thống sắc ký

STT	<i>Isobutylparaben</i>			<i>Butylparaben</i>			<i>Hệ số phân giải</i>	<i>Số đĩa lý thuyết (IBP)</i>
	<i>Thời gian lưu (phút)</i>	<i>Diện tích pic (mA.U.s)</i>	<i>Hệ số bất đối</i>	<i>Thời gian lưu (phút)</i>	<i>Diện tích pic (mA.U.s)</i>	<i>Hệ số bất đối</i>		
1	30,361	771,743	1,03	32,189	764,501	1,03	2,22	23040
2	30,334	772,193	1,03	32,164	764,270	1,02	2,24	23714
3	30,363	772,540	1,01	32,198	765,563	1,02	2,22	22907
4	30,338	773,685	1,02	32,180	766,581	1,02	2,23	23122
5	30,391	775,168	1,03	32,229	767,137	1,02	2,22	23088
6	30,386	775,373	1,01	32,214	767,432	1,03	2,20	22659
Trung bình	30,362	773,450	1,02	32,196	765,914	1,02	2,22	
RSD (%)	0,08	0,20		0,07	0,18			

Kết quả cho thấy hệ thống sắc ký có độ lặp lại tốt với RSD của thời gian lưu dưới 0,1% và diện tích pic dưới 0,3%, số đĩa lý thuyết trên 10000, hệ số bất đối xấp xỉ 1,0 và độ phân giải đều lớn hơn 2,0. Như vậy, hệ thống đạt yêu cầu để phân tích 2 đồng phân nêu trên.

3.3.2. Tính đặc hiệu

Tiến hành sắc ký theo điều kiện đã chọn các mẫu sau:

- Mẫu trắng là dung môi pha mẫu.
- Dung dịch mẫu nền (placebo) là mẫu nền nước súc miệng, sữa rửa mặt, son môi (đã được kiểm tra xác định là không chứa isobutylparaben và butylparaben) được xử lý theo mục 3.2.1.
- Mẫu chuẩn riêng biệt của IbuP và BuP, mẫu chuẩn hỗn hợp IBuP và BuP có nồng độ mỗi chất khoảng 8 µg/ml.
- 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 khoảng 8 µg/ml rồi xử lý theo quy trình.

Kết quả thu được cho thấy: Mẫu trắng và các mẫu

nền không xuất hiện pic ở thời gian lưu tương ứng với thời gian lưu của pic thu được từ mẫu chuẩn riêng biệt IBuP và BuP. Mẫu tự tạo xuất hiện 2 pic chính có thời gian lưu tương ứng với thời gian lưu của 2 pic thu được từ sắc ký đồ của dung dịch mẫu chuẩn hỗn hợp, 2 pic này tách khỏi nhau và tách rõ khỏi nền mẫu. Kết quả so sánh phổ UV – VIS của 2 chất giữa mẫu tự tạo và mẫu chuẩn cho hệ số chòng phỗ cao (với isobutylparaben là 0,99997 và butylparaben là 0,99998).

3.3.3. Khoảng tuyển tính

Chuẩn bị một dãy các dung dịch chuẩn hỗn hợp IBuP và BuP để thu được các dung dịch có nồng độ từ giới hạn định lượng đến 200% so với nồng độ định lượng dự kiến (8 µg/ml). Tiến hành sắc ký và thu được kết quả như ở Bảng 2 và Hình 2.

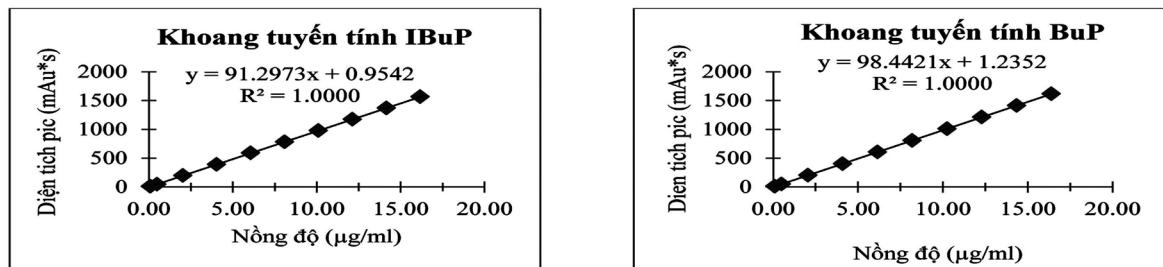
Kết quả thu được cho thấy có sự tương quan tuyển tính chặt chẽ giữa diện tích pic và nồng độ của IBuP và BuP trong khoảng nồng độ khảo sát với hệ số tương quan là 1,0000 và % hệ số chấn tại nồng độ 100% nhỏ hơn 2,0%.

Bảng 2. Kết quả xác định khoảng nồng độ tuyến tính của IBuP và BuP

STT	IBuP		BuP	
	Nồng độ ($\mu\text{g/ml}$)	Diện tích pic (mAU.s)	Nồng độ ($\mu\text{g/ml}$)	Diện tích pic (mAU.s)
1	0,10	10,052	0,10	10,399
2	0,49	47,731	0,49	50,136
3	2,02	197,67	2,05	204,256
4	4,04	389,52	4,10	402,643
5	6,07	590,034	6,15	608,303
6	8,09	781,776	8,20	806,992
7	10,11	979,919	10,25	1010,768
8	12,13	1175,054	12,30	1212,889
9	14,15	1369,225	14,35	1413,63
10	16,18	1564,998	16,40	1615,482

$$y = 91,2973x + 0,9542; r = 1,0000; \text{Y-intercept} = 0,12\%$$

$$y = 98,4421x + 1,2352; r = 1,0000; \text{Y-intercept} = 0,15\%$$



Hình 2. Sự phụ thuộc giữa diện tích pic và nồng độ của IBuP và BuP

3.3.4. Độ đúng

Độ đúng được đánh giá trên mẫu tự tạo: Thêm chính xác các lượng chuẩn IBuP và BuP vào nền mẫu, sao cho sau khi xử lý theo qui trình phân tích nồng độ dung dịch cuối cùng đem sắc ký phải nằm trong khoảng từ 75 – 125% so với nồng độ định lượng dự kiến. Tiến hành ở 3 mức nồng độ khác nhau: mức 75%, mức 100% và mức 125%, mỗi nồng độ thực hiện 3 lần. Dựa vào diện tích pic của chất tương ứng trong dung dịch chuẩn hỗn hợp để tính ra lượng chất chuẩn tìm thấy. Kết quả tỷ lệ phần trăm thu hồi thể hiện ở Bảng 3.

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

Mức nồng độ	Tỷ lệ thu hồi (%)					
	Sữa rửa mặt		Nước súc miệng		Son môi	
	IBuP	BuP	IBuP	BuP	IBuP	BuP
75%	1	100,48	98,38	99,38	98,97	100,80
	2	101,38	99,24	99,43	99,06	100,92
	3	100,72	98,64	99,28	98,56	101,22
	Trung bình	100,86	98,75	99,36	98,86	100,98
	RSD (%)	0,46	0,44	0,08	0,27	0,21
100%	1	101,93	99,70	98,91	98,65	101,20
	2	101,55	99,34	99,13	98,90	101,41
	3	101,40	99,09	99,03	98,62	101,54
	Trung bình	101,63	99,38	99,02	98,72	101,38
	RSD (%)	0,27	0,31	0,12	0,15	0,17
125%	1	101,13	98,88	100,37	100,09	100,65
	2	101,08	98,83	99,32	99,01	101,69
	3	100,57	98,30	100,40	99,77	101,48
	Trung bình	100,92	98,67	100,03	99,63	101,28
	RSD (%)	0,30	0,32	0,61	0,56	0,54

Kết quả cho thấy phương pháp có độ đúng tương đối tốt với cả 3 nền mẫu với tỷ lệ thu hồi cao (từ 98,3 đến 101,9%) và RSD không vượt quá 2%.

3.3.5. Độ chính xác

Độ lặp lại được tiến hành trên 6 mẫu tự tạo được chuẩn bị như mục 3.3.2. Kết quả được đánh giá trên độ lệch chuẩn tương đối của phần trăm thu hồi. Độ chính xác trung gian được đánh giá trên 12 mẫu tự tạo được phân tích bởi 2 kiêm nghiệm viên ở 2 ngày khác nhau. Các kết quả thu được như ở Bảng 4.

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

Thời gian	STT	Sữa rửa mặt		Nước súc miệng		Son môi	
		IBuP	BuP	IBuP	BuP	IBuP	BuP
Ngày 1	1	100,32	100,28	98,59	98,77	101,28	101,20
	2	99,02	98,90	98,75	98,85	101,14	100,98
	3	100,32	100,14	98,83	98,68	101,25	101,13
	4	100,34	100,40	100,84	100,74	101,14	101,19
	5	98,97	98,81	98,99	99,02	101,46	101,26
	6	99,02	98,86	99,72	99,65	101,59	101,55
	Trung bình (%)	99,66	99,58	99,29	99,29	101,31	101,22
	RSD (%)	0,73	0,77	0,86	0,80	0,18	0,19
Ngày 2	1	102,50	100,14	100,94	98,71	100,93	101,27
	2	102,88	100,65	100,87	98,77	99,77	100,03
	3	101,95	99,74	101,37	99,19	100,61	100,83
	4	101,46	99,20	101,29	98,96	100,71	100,58
	5	101,51	99,15	102,40	100,27	100,70	100,73
	6	101,69	99,39	101,14	98,94	101,30	101,29
	Trung bình (%)	102,00	99,71	101,34	99,14	100,67	100,79
	RSD (%)	0,56	0,59	0,55	0,58	0,50	0,47
Trung bình (%), n = 12		100,83	99,64	100,31	99,21	100,99	101,00
RSD (%), n = 12		1,36	0,65	1,27	0,67	0,49	0,40

Kết quả cho thấy phương pháp có độ lặp lại tốt, độ chính xác tương đối cao trên cả 3 nền mẫu.

3.3.6. Giới hạn phát hiện và giới hạn định lượng

Pha loãng dần dung dịch chuẩn hỗn hợp đến nồng độ thấp nhất sao cho khi tiêm vào hệ thống sắc ký tín hiệu thu được gấp 3 lần so với nhiễu đường nền. Từ đó thu được giới hạn phát hiện của phương pháp với isobutylparaben là 3,3 ($\mu\text{g/g}$) và butylparaben là 3,2 ($\mu\text{g/g}$).

Giới hạn định lượng xác định theo công thức $\text{LOQ} = 3,3 \times \text{LOD}$ cụ thể với isobutylparaben là 10,89 $\mu\text{g/g}$ và butylparaben là 10,56 $\mu\text{g/g}$.

3.6. Ứng dụng

Ứng dụng quy trình vừa xây dựng để kiểm tra 10 mẫu mỹ phẩm trên thị trường.

Bảng 5. Kết quả kiểm tra một số mẫu mỹ phẩm

TT	Tên mẫu	IBuP	BuP	TT	Tên mẫu	IBuP	BuP
1	Sữa rửa mặt làm sạch da	-	-	6	Sữa rửa mặt POND'S pure white	-	-
2	Sữa rửa mặt ngừa mụn Esunvy	-	-	7	Sữa rửa mặt cao cấp Benew Snail	-	-
3	Gel rửa mặt làm mát da Hydra vegetal	-	-	8	Nước súc miệng Listerine Total Care	-	-
4	Sữa rửa mặt Naive	-	-	9	Nước súc miệng Listerine natural green tea	-	-
5	Sữa rửa mặt trắng da Nivea Pearl Caring Whip	-	-	10	Nước súc miệng Colgate Plax peppermint fresh	-	-

Kết quả thu được cho thấy quy trình phân tích xây dựng hoàn toàn có thể áp dụng để phân tích 10 mẫu mỹ phẩm này và kết quả không phát hiện mẫu nào có chứa isobutylparaben và butylparaben (Bảng 5).

4. Kết luận

- Đã lựa chọn được dung môi, phương pháp xử lý mẫu cho phép chiết hoàn toàn cả IBuP và BuP, nên mẫu sạch. Đã khảo sát và lựa chọn được điều kiện sắc ký lỏng hiệu năng cao phù hợp về cột, pha động, detector, tốc độ dòng, thể tích tiêm mẫu cho phép định tính, định lượng đồng thời 2 chất bảo quản có cấu trúc gần giống nhau IBuP và BuP trong nền mẫu sữa rửa mặt, nước súc miệng và son môi. Các pic IBuP và BuP tách riêng biệt và tách rõ khỏi nền mẫu. Thời gian phân tích ngắn trên nền mẫu mỹ phẩm phức tạp. Điều kiện sắc ký đơn giản, dễ dàng dòng, dễ thực hiện.

- Phương pháp xây dựng đã được đánh giá về độ thích hợp của hệ thống sắc ký, tính đặc hiệu, khoảng tuyến tính, độ lặp lại, độ đúng, giới hạn phát hiện và giới hạn định lượng của cả 2 chất IBuP và BuP. Kết quả đạt yêu cầu để phát hiện và định lượng đồng thời 2 chất nhóm paraben này.

Tài liệu tham khảo

1. Bộ Y tế (2015), Công văn số 6577/QLD-MP ngày 13/4/2015 của Cục Quản lý Dược Việt Nam về việc cập nhật qui định về các chất dùng trong mỹ phẩm.
2. Tạ Mạnh Hùng, Đoàn Cao Sơn (2012), “Hướng dẫn chung thẩm định qui trình phân tích bằng phương pháp HPLC”, Tạp chí Kiểm nghiệm thuốc, 10 (38), trang 1-8.
3. Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương (2010), Đảm bảo chất lượng thuốc và một số phương pháp kiểm nghiệm thuốc, (Tài liệu đào tạo nâng cao về kiểm nghiệm thuốc).
4. ASEAN (2014), The 21st Meeting of the ASEAN Cosmetic Committee (ACC), Annex V.

SUMMARY

A HPLC method was developed for simultaneous identification and determination 2 Parabens in cosmetics (Isobutylparaben and Butylparaben). Parabens are extracted by mobile phase to concentration about 2 to 40 µg/ml. Pass a portion of the solution through a filter membrane pore size 0.45 µm, then determined by HPLC.

Chromatographic conditions are as follows: The liquid chromatograph is equipped with a 254 nm detector and a Phenomenex C₆ Phenyl (250 x 4.6 mm, 5 µm) column, mobile phase is a mixture of Acetonitrile and Phosphate buffer solution pH 2.5 (35:65), the flow rate about 1.0 ml/minute, run time 35 minutes, injection volume is 20 µl, temperature: ambient.

The method was validated about the specificity, linear range, precision, accuracy, LOD, LOQ, and validation results proved that this method was suitable for determination of 2 parabens in cosmetics.

The method was applied to control 10 cosmetic samples (cleansing milk, mouthwash samples, lipstick). The result show that not detected Isobutylparaben and Butylparaben in 10 samples.

(Ngày nhận bài: 13/8/2018; Ngày phản biện: 19/11/2018; Ngày duyệt đăng: 02/01/2019)

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

TẠ MẠNH HÙNG, PHAN THỊ NGHĨA, NGUYỄN THỊ CHÂM
Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương

Từ khóa: Fexofenadin, tương đương sinh học, huyết tương, thẩm định phương pháp, LC-MS/MS

1. Đặt vấn đề

Fexofenadin là thuốc kháng histamin thế hệ hai, có tác dụng đối kháng đặc hiệu và chọn lọc trên thụ thể H₁ ngoại vi. Ở mức liều khuyến nghị sử dụng 60 mg, nồng độ tối đa trong huyết tương người khoảng 142 ng/ml [1]. Hiện nay, một số doanh nghiệp dược đã và đang nghiên cứu sản xuất các chế phẩm chứa fexofenadin nên nhu cầu nghiên cứu tương đương sinh học là điều cần thiết

và xuất phát từ thực tế. Dựa vào trang thiết bị hiện có và tham khảo một số phương pháp phân tích đã được các tác giả công bố [3],[4] đồng thời dựa trên nguyên lý của phương pháp sắc ký lỏng - khói phổ, chúng tôi đã tiến hành nghiên cứu định lượng fexofenadin trong huyết tương người bằng phương pháp LC-MS/MS.

2. Thực nghiệm

2.1. Nguyên vật liệu

- Chất chuẩn:

+ Fexofenadin hydrochlorid (FEXO): Chuẩn Dược điển Việt Nam, SKS: 0114301.01, hàm lượng: 98,62%, độ ẩm: 0,23%.

+ Diphenhydramin hydrochlorid: Chất đối chiếu hóa học Quốc gia, SKS: 0101120, hàm lượng: 100,00%, độ ẩm: 0,07%, được dùng làm chuẩn nội (IS) trong phương pháp phân tích.

- *Dung môi, hóa chất*: Acetonitril, tert-butylmethylether, methanol, acid formic đạt tiêu chuẩn tinh khiết dùng cho phân tích hoặc sắc ký.

- *Huyết tương (HT) trắng*: Không có FEXO của Viện Huyết học và Truyền máu Trung ương.

2.2. Thiết bị và dụng cụ phân tích

2.2.1. Thiết bị

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

- Máy sắc ký lỏng khói phô TSQ Quantum (Thermo Scientific – Mỹ);

- Cân phân tích Sartorius CP224S (Thụy Sỹ, độ chính xác $d = 0,1$ mg);

- Tủ lạnh sâu $-35^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ (Sanyo – Nhật Bản);

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

- Máy lọc nước...

2.2.2. Dụng cụ

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

2.3. Điều kiện phân tích

2.3.1. Điều kiện sắc ký

- Cột sắc ký: C18; 150 x 4,6 mm; 5 μm . Nhiệt độ cột 40°C .

- Pha động: Acetonitril - acid formic 0,1% (tỷ lệ thích hợp).

- Tốc độ dòng: 0,65 ml/phút.

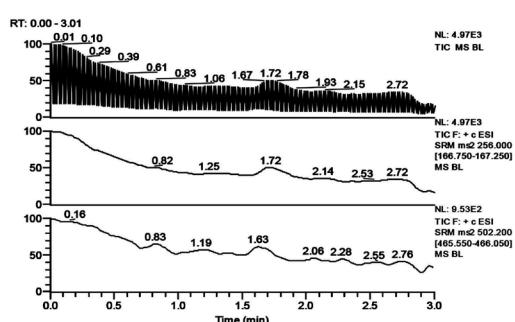
- Detector: TSQ quantum ultra

- Thể tích tiêm: 5 μl .

- Nhiệt độ autosampler: 20 $^{\circ}\text{C}$.

2.3.2. Điều kiện khói phô

Kiểu khói phô hai lần (MS/MS), nguồn ion hóa ESI (+).



Hình 1. SKĐ mẫu HT trắng

Các thông số của thiết bị khói phô để phát hiện FEXO và diphenhydramin được trình bày ở Bảng 1.

Bảng 1. Các thông số của detector khói phô dùng để định lượng FEXO và diphenhydramin

<i>Thông số</i>	<i>Hoạt chất</i>	<i>Fexofenadin</i>	<i>Diphenhydramin (IS)</i>
Chế độ ion	ESI (+)	ESI (+)	
Thế ion hóa (V)	3500	3500	
Nhiệt độ nguồn phun ($^{\circ}\text{C}$)	100	100	
Áp suất khí mang (psi)	30	30	
Áp suất khí bơm (psi)	10	10	
Áp suất khí quét (psi)	2	2	
Nhiệt độ mao quản ($^{\circ}\text{C}$)	360	360	
Thể thau kính hội tụ (V)	111	111	
Năng lượng bắn phá (V)	26	22	
Mành ion mệ (Dalton)	m/z = 502,2	m/z = 256,0	
Mành ion con (Dalton)	m/z = 465,8	m/z = 167,0	

2.3.3. Phương pháp xử lý mẫu

Thêm 50 μl dung dịch chuẩn nội (nồng độ chính xác khoảng 0,5 $\mu\text{g/ml}$) vào 0,5 ml mẫu huyết tương (HT) đã rã đông ở nhiệt độ phòng. Thêm 4 ml tert-butylmethylether, lắc ngang cơ học 5 phút, ly tâm 3000 vòng/phút x 5 phút. Hút 1 ml lớp phía trên, bắc hơi dưới dòng khí nitơ tại nhiệt độ 40 $^{\circ}\text{C}$, thu được cản. Thêm 1 ml pha động. Lắc xoáy 30 giây để hòa tan cản, lọc qua màng lọc 0,45 μm . Tiêm vào hệ thống sắc ký.

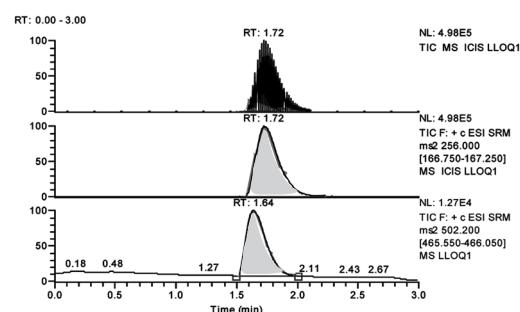
2.3.4. Phương pháp tính kết quả

Xác định nồng độ FEXO có trong các mẫu thử (chưa biết nồng độ) dựa vào tỷ lệ diện tích pic FEXO/IS thu được từ sắc ký đồ của mẫu thử và đường chuẩn biểu thị mối tương quan giữa nồng độ FEXO có trong các mẫu chuẩn với tỷ lệ diện tích pic FEXO/IS của mẫu chuẩn. Tiến hành thẩm định phương pháp phân tích theo quy định của US-FDA và EMA [2],[5].

3. Kết quả và bàn luận

3.1. Độ đặc hiệu - chọn lọc của phương pháp

Phân tích các mẫu HT trắng, mẫu HT tự tạo chứa chuẩn nội và FEXO nồng độ khoảng 10 ng/ml theo phương pháp đã xây dựng và ghi lại sắc ký đồ (SKĐ) (Hình 1, 2).



Hình 2. SKĐ mẫu HT trắng có IS và FEXO nồng độ 10 ng/ml

Trên SKĐ của mẫu HT trắng (Hình 1), tại các thời điểm 1,64 và 1,72 phút (trùng với thời gian lưu của FEXO và IS trong SKĐ của mẫu chuẩn - Hình 2) không xuất hiện các pic có các mảnh phô khối m/z = 502,2 → 465,8 (FEXO) và m/z = 256,0 → 167,0 (IS). Do vậy, phương pháp phân tích có độ đặc hiệu-chọn lọc với FEXO và IS theo các quy định của phương pháp phân tích thuốc trong dịch sinh học [2],[5].

3.2. Đường chuẩn và khoảng tuyến tính

Phân tích các mẫu HT chứa chuẩn nội và chuẩn FEXO có nồng độ khoảng 10 ng/ml đến 1000 ng/ml theo quy trình đã xây dựng. Xác định sự tương quan giữa nồng độ FEXO có trong mẫu và tỉ lệ diện tích pic FEXO/IS thu được trên SKĐ bằng phương pháp hồi qui tuyến tính, sử dụng hệ số tỷ trọng 1/(nồng độ)².

Kết quả xác định mối tương quan này được trình bày ở Bảng 2.

Bảng 2. Kết quả thẩm định khoảng tuyến tính của phương pháp

Mẫu chuẩn Nồng độ (ng/ml)	Độ đúng (%)				
	Đường chuẩn 1	Đường chuẩn 2	Đường chuẩn 3	Đường chuẩn 4	Đường chuẩn 5
10,1	105,0	98,3	101,2	100,9	101,2
20,2	92,2	104,6	101,6	100,8	97,0
50,5	95,3	96,2	90,4	94,4	100,9
101,0	96,0	98,8	94,7	97,4	100,2
252,6	102,9	107,4	109,1	100,6	102,6
505,1	101,2	99,2	101,8	100,9	99,7
707,2	101,9	101,1	98,5	98,6	98,0
1010,2	105,5	94,4	102,6	106,4	100,5
Phương trình hồi quy (y = ax + b)*	y = 0,0021 x - 0,0024	y = 0,0020 x - 0,0008	y = 0,0020 x - 0,0015	y = 0,0020 x - 0,0014	y = 0,0021 x - 0,0018
Hệ số r	0,9984	0,9988	0,9979	0,9992	0,9998

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

Kết quả thẩm định cho thấy trong khoảng nồng độ từ 10 ng/ml đến 1000 ng/ml có sự tương quan tuyến tính giữa nồng độ FEXO và tỷ lệ diện tích pic FEXO/IS với hệ số tương quan xấp xỉ bằng 1.

Nồng độ FEXO xác định từ đường chuẩn so với nồng độ lý thuyết đều nằm trong giới hạn cho phép (80 - 120% đối với nồng độ thấp nhất, 85 - 115% đối với các nồng độ còn lại) theo quy định của phương pháp phân tích thuốc trong dịch sinh học [2],[5].

3.3. Giới hạn định lượng dưới của phương pháp

Phân tích các mẫu HT trắng và mẫu HT chứa chuẩn nội và chuẩn FEXO có nồng độ chính xác khoảng 10 ng/ml (mẫu LLOQ). Xác định nồng độ FEXO có trong các mẫu LLOQ từ các đường chuẩn tiến hành làm song song trong cùng điều kiện.

Kết quả thẩm định giới hạn định lượng dưới của phương pháp được trình bày ở Bảng 3.

Bảng 3. Kết quả xác định giá trị LLOQ của phương pháp

STT	Mẫu trắng	Mẫu chuẩn (10 ng/ml)			
		Diện tích pic	Diện tích pic FEXO	Diện tích pic IS	Nồng độ FEXO tìm thấy (ng/ml)
1	0	129218	6507655	9,0	88,8
2	0	124525	6763213	8,3	81,9
3	0	136345	6476267	9,6	94,6
4	0	123029	6393830	8,7	85,9
5	0	127024	6417014	8,9	88,5
6	0	146106	6503077	10,2	101,4
TB	0	131041			90,2
CV (%)					7,6
Đáp ứng trung bình của mẫu trắng /LLOQ					0

Kết quả thẩm định cho thấy trong các mẫu trắng không xuất hiện pic tạp có cùng thời gian lưu của pic FEXO trong các mẫu LLOQ. Tỷ lệ giữa nồng độ FEXO xác định từ đường chuẩn so với nồng độ lý thuyết có trong các mẫu LLOQ nằm trong khoảng 81,9% - 101,4% (trung bình = 90,2% và CV = 7,6%), đáp ứng yêu cầu giới hạn định lượng dưới của phương pháp phân tích thuốc trong dịch sinh học [2],[5].

3.4. Xác định độ đúng, độ lặp lại của phương pháp

Tiến hành thẩm định độ đúng, độ lặp lại trên 4 lô mẫu LLOQ, LQC, MQC, HQC chứa FEXO có nồng độ tương ứng là 10 ng/ml; 30 ng/ml; 400 ng/ml, 800 ng/ml. Xác định hàm lượng FEXO có trong các mẫu bằng đường chuẩn phân tích trong cùng điều kiện. Độ đúng của phương pháp là tỷ lệ % giữa nồng độ xác định được so với nồng độ lý thuyết. Độ lặp lại của phương pháp được biểu thị bằng giá trị CV%. Kết quả xác định độ đúng, độ lặp lại của phương pháp được trình bày ở Bảng 4.

Bảng 4. Kết quả thẩm định độ đúng, độ lặp lại trong ngày và khác ngày

Độ đúng, độ lặp lại	LLOQ (\approx 10 ng/ml)		LQC (\approx 30 ng/ml)		MQC (\approx 400 ng/ml)		HQC (\approx 800 ng/ml)	
	Độ đúng (%)	CV (%)	Độ đúng (%)	CV (%)	Độ đúng (%)	CV (%)	Độ đúng (%)	CV (%)
Trong ngày	107,9	4,0	106,5	2,6	100,7	2,1	103,9	2,2
Khác ngày	100,3	10,1	107,4	4,2	103,2	4,4	100,8	3,5

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

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

Tiến hành nghiên cứu độ ổn định của FEXO trong HT trên các lô mẫu LQC và HQC. Đánh giá độ ổn định của FEXO trong HT bằng cách so sánh nồng độ FEXO có trong các mẫu được bảo quản và các mẫu có nồng độ tương ứng được phân tích ngay sau khi hòa tan chuẩn FEXO vào HT trắng. Kết quả nghiên cứu độ ổn định của FEXO được trình bày trong Bảng 5.

Bảng 5. Kết quả nghiên cứu độ ổn định của FEXO trong huyết tương

Độ ổn định	Mẫu	Nồng độ ban đầu (ng/ml; n = 6)	Nồng độ sau bảo quản (ng/ml; n = 6)	% Sai khác
3 chu kì đông - rã	LQC	30,2	28,1	-6,8%
	HQC	760,4	734,5	-3,4%
Độ ổn định thời gian ngắn (5 giờ, nhiệt độ phòng)	LQC	27,5	27,8	1,1%
	HQC	729,6	744,4	2,0%
Độ ổn định trong autosampler (41 giờ/20°C)	LQC	33,9	29,5	-13,2%
	HQC	841,9	723,8	-14,0%
Độ ổn định dài ngày (-35°C ± -5°C, 84 ngày)	LQC	30,2	26,9	-10,8%
	HQC	760,4	701,3	-7,8%

4. Kết luận

Nghiên cứu đã xây dựng được phương pháp định lượng Fexofenadin trong huyết tương người bằng phương pháp LC-MS/MS. Kết quả thẩm định cho thấy, phương pháp có giá trị giới hạn định lượng dưới nhỏ (10 ng/ml); khoảng tuyển tính rộng (từ 10 ng/ml đến 1000 ng/ml); độ đúng dao động trong khoảng 100,3%-107,9%; độ lặp lại với giá trị CV% nhỏ (2,1%-10,1%), thời gian phân tích ngắn (3,0 phút cho mỗi mẫu), đáp ứng yêu cầu đối với phương pháp phân tích thuốc trong dịch sinh học của US-FDA và EMA [2],[5]. Phương pháp đã xây dựng có thể ứng dụng trong các nghiên cứu đánh giá tương đương sinh học đối với chế phẩm chứa hoạt chất Fexofenadin.

Tài liệu tham khảo

1. Bộ Y tế (2015), *Dược thư quốc gia Việt Nam*, lần xuất bản thứ 2, Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật, trang 657-658.
2. European Medicines Agency, Committee for Medicinal Products for Human Use (2011): *Guideline on Bioanalytical Method Validation*.
3. Chen, Y., Chou, H., Chang, W., & Hsu, K. (2013). Determination of fexofenadine in human plasma by LC-MS/MS and its application in pharmacokinetic study. *Journal of Chinese Pharmaceutical Sciences*, 22(5), 409-414. DOI: 10.5246/jcps.2013.05.059.
4. T. Özden, S. Özilhan, S. Toptan (2007), “Quantitative Determination of Fexofenadine in Human Plasma by HPLC-MS”. *Chromatographia An International Journal for Separation Science*, Volume 66, Supplement 1, pp 109–113.
5. U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration (2013): *Guidance for Industry - Bioanalytical Method Validation*.

SUMMARY

A high throughput and specific method using ultra performance liquid chromatography tandem mass spectrometry was developed for determination of Fexofenadine in human plasma. The FEXO and IS were separated from human plasma by liquid - liquid extract technique. Analytes were chromatographed on a C18 column (150 x 4.6 mm; 5 µm) with isocratic elution using detector TSQ. The mobile phase consists of acetonitrile and formic acid solution with suitable ratio. The assay was linear over the concentration range of 10 - 1000 ng/ml. The LLOQ was 10 ng/ml. The intra-day and inter-day accuracy were within 100.3% - 107.9%. This method can be used for BE studies of Fexofenadine preparations.

(Ngày nhận bài: 30/05/2018 ; Ngày phản biện: 04/03/2019 ; Ngày duyệt đăng: 09/04/2019)

NGHIÊN CỨU TINH CHẾ GINSENOSID RB1 TỪ CẮN THU ĐƯỢC SAU PHÂN LẬP SAPONIN TOÀN PHẦN CỦA TAM THẤT ĐỂ LÀM CHẤT CHUẨN

ĐỖ THỊ BÍCH THUẬN, NGUYỄN THỊ LAN PHƯƠNG,
NGUYỄN VIỆT THÚY, BẠCH THỊ THẢM, NGHIÊM THỊ MAI
Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương

Từ khóa: Ginsenosid Rb1, tinh ché, chất chuẩn, saponin, Tam thất

1. Đặt vấn đề

Ginsenosid Rb1 (G-Rb1) là một saponin có phần aglycon là 20(S) protopanaxatriol. G-Rg1 có nhiều trong các dược liệu quý như Tam thất (*Radix Panasis notoginseng*) và Nhân sâm (*Radix Ginseng*) với các công dụng chính: bồi bổ cơ thể, hỗ trợ điều trị liệt dương, lãnh dục, kích thích tiêu hóa, chống stres, chống lão hóa...[2],[3].

Hiện nay G-Rb1 cũng là hoạt chất được đưa vào để định tính, định lượng trong hai chuyên luận dược liệu Nhân sâm và Tam thất của Dược điển Việt Nam V [1], Dược điển Trung Quốc 2015 [4], Dược điển Mỹ,... Bên cạnh đó chất chuẩn G-Rb1 hiện nay đang có giá thành

rất cao và nguồn cung cấp thường không ổn định. Xuất phát từ nhu cầu thực tiễn cần có chất chuẩn để kiểm tra giám sát các dược liệu Nhân sâm, Tam thất chúng tôi đã tiến hành nghiên cứu tinh chế ginsenosid Rb1 từ cắn thu được sau phân lập saponin toàn phần của Tam thất để làm nguyên liệu thiết lập chất chuẩn.

2. Thực nghiệm

2.1. Thiết bị, hóa chất, chất chuẩn

2.1.1. Thiết bị, dụng cụ

Các thiết bị, dụng cụ của Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương (đã được hiệu chuẩn theo quy định của ISO/IEC 17025 và GLP) và Viện Hóa học – Viện Hàn lâm Khoa học và công nghệ Việt Nam, gồm:

- Máy HPLC SHIMADZU UFLC;
 - Máy HPLC HITACHI;
 - Máy sắc ký lỏng khói phô LC ESI orbitrap (THERMO LTQ Orbitrap XL);
 - Máy cộng hưởng từ hạt nhân NMR-BRUKER-500MHz;
 - Máy đo điểm chảy ELECTROTHEMAL IA 6304;
 - Máy đo phô hồng ngoại NILOLET NEXUS 670FT-IR;
 - Cân kỹ thuật SARTORIUS BSA 224S;
 - Cân phân tích METTLER TOLEDO;
 - Tủ sấy MEMMERT UL 40;
 - Tủ bảo quản lạnh TOSHIBA;
 - Máy lắc siêu âm ELMASONIC S100;
 - Cột sắc ký Inertsil RP 18 (250 x 4,6 mm, 5 µm);
 - Nồi cách thủy, bộ cát quay chân không BÜCHI V-850;
- Tú hốt, bộ lọc dung môi cỡ màng lọc 0,45 µm, bộ dụng cụ sinh hàn, pipet chính xác,...

2.1.2. Hóa chất

- Dicloromethan (PA; Merck);
- Cloroform (PA; Merck);
- Acid sulfuric (PA; Merck);
- N-Butanol (PA; Merck);
- Ethyl acetat (PA; Merck);
- Methanol (HPLC; Merck);
- Acetonitril (HPLC; Merck);
- Ethanol tuyệt đối (PA; Việt Nam).

Điều kiện sắc ký lớp mỏng (SKLM)	Điều kiện sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) [4]															
<p>* Phương pháp pha thuận [1]:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Bán mỏng silicagel 60 GF 254 (Merck). - Hệ dung môi: Cloroform - ethyl acetat - methanol - nước (15:40:22:10). - Phát hiện vết: Dung dịch acid sulfuric 10% trong ethanol, sấy ở 105°C trong 5 phút. <p>* Phương pháp pha đảo:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Bán mỏng silicagel 60 RP-18 GF 254 (Merck) - Hệ dung môi: Aceton – nước (2:1) Aceton – nước (1:1) Aceton – nước (1:2) - Phát hiện vết: Dung dịch acid sulfuric 10% trong ethanol, sấy ở 105°C trong 5 phút. 	<p>- Cột sắc ký RP-18, 5 µm (25 cm x 4,6 mm).</p> <p>- Detector diod array với bước sóng phát hiện 203 nm.</p> <p>Pha động: Acetonitril – nước theo chương trình gradient:</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Thời gian (phút)</th> <th>Acetonitril (%)</th> <th>Nước (%)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0 → 12</td> <td>19</td> <td>81</td> </tr> <tr> <td>12 → 60</td> <td>19 → 36</td> <td>81 → 64</td> </tr> <tr> <td>60 → 70</td> <td>36 → 19</td> <td>64 → 81</td> </tr> <tr> <td>70 → 75</td> <td>19</td> <td>81</td> </tr> </tbody> </table> <ul style="list-style-type: none"> - Tốc độ dòng: 1,5 ml/phút - Thể tích tiêm: 20 µl 	Thời gian (phút)	Acetonitril (%)	Nước (%)	0 → 12	19	81	12 → 60	19 → 36	81 → 64	60 → 70	36 → 19	64 → 81	70 → 75	19	81
Thời gian (phút)	Acetonitril (%)	Nước (%)														
0 → 12	19	81														
12 → 60	19 → 36	81 → 64														
60 → 70	36 → 19	64 → 81														
70 → 75	19	81														

2.2.2.3. Xác định cấu trúc, nhận dạng và đánh giá độ tinh khiết của G-Rb1 tinh chế được

- Xác định cấu trúc và nhận dạng: Kết hợp các phương pháp phân tích khói phô và cộng hưởng từ hạt nhân, phân tích dữ liệu từ hai loại phô này, so sánh với dữ liệu phô trong các bài báo khoa học đã công bố để khẳng định cấu trúc chất đem đo phù hợp với cấu trúc của G-Rb1.

- Định tính, định lượng và đánh giá độ tinh khiết: So

2.1.3. Chất chuẩn

- Ginsenosid Rb1 của Trung Quốc; SKS: G-Rb1. Ref.012011; Hàm lượng: 99,17% tính theo nguyên trạng).

2.2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Đối tượng nghiên cứu

Cần thu được sau khi phân lập từ saponin toàn phần của Tam thất:

- Tên La tinh: *Panax Notoginsenosides*; Lô: 150402

- Công ty sản xuất: World-Way Biotech InC (Trung Quốc).

Địa chỉ: Room 2901, 1st Building of Vaya Garden, 35 Melin street, Yuhua District, Changsha, 410019, China.

2.2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.2.1. Tinh chế

Mẫu thử được hòa tan trong methanol, sau đó được phân lập bằng phương pháp sắc ký cột pha đảo với pha tĩnh là hạt C18 của Merck, khảo sát hệ dung môi chạy cột thích hợp. Kiểm tra các phân đoạn bằng sắc ký lớp mỏng, lựa chọn phân đoạn có G-Rb1, đem bốc hơi chân không lấy cẩn khô. Kiểm tra G-Rb1 tinh chế được bằng sắc ký lớp mỏng, so sánh với chuẩn G-Rb1 về giá trị R_f và màu sắc vết thu được. Xác định hàm lượng G-Rb1 tinh chế được bằng phương pháp HPLC.

2.2.2.2. Phương pháp phân tích G-Rb1 được sử dụng trong quá trình tinh chế

Thời gian (phút)	Acetonitril (%)	Nước (%)
0 → 12	19	81
12 → 60	19 → 36	81 → 64
60 → 70	36 → 19	64 → 81
70 → 75	19	81

- Tốc độ dòng: 1,5 ml/phút
- Thể tích tiêm: 20 µl

sánh phô IR của chất chuẩn G-Rb1 và G-Rb1 tinh chế được để định tính và kiểm tra độ tinh khiết của chất tinh chế được. Sử dụng phương pháp sắc ký lỏng: So sánh thời gian lưu kết hợp chồng phô UV-VIS của pic G-Rb1 tinh chế được và pic G-Rb1 chuẩn theo điều kiện sắc ký đã lựa chọn để định tính G-Rb1 tinh chế được; dựa vào diện tích pic của G-Rb1 trong sắc ký đồ của dung dịch thử và dung dịch chuẩn để xác định hàm lượng của G-Rb1 tinh chế được.

3. Kết quả và bàn luận

3.1. Tinh chế

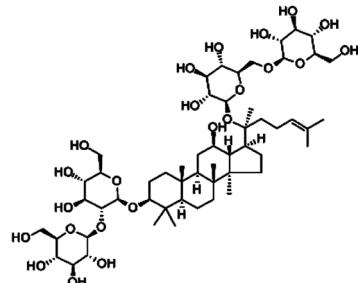
Qua nghiên cứu các tài liệu tham khảo, chúng tôi nhận thấy có thể sử dụng phương pháp sắc ký cột với pha tĩnh là hạt Rp-18 để tinh chế G-Rb1 thành chất tinh khiết với quy trình tinh chế như sau: Hòa tan cẩn sau khi phân lập trong methanol, chuyển dung dịch này lên cột thủy tinh trung tính có kích thước 60 cm x 4 cm, chừa 100 g chất nhồi silicagel pha đảo Rp-18 (cỡ hạt 140 µm) đã được hoạt hóa với hỗn hợp dung môi aceton - nước với tỷ lệ lần lượt 7:3; 5:5; 2:8. Rửa giải bằng hỗn hợp dung môi aceton - nước với tỷ lệ dung môi aceton tăng dần từ 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70% để rửa giải, tốc độ rửa giải khoảng 0,5 ml/phút. Hứng dịch rửa giải vào bình hứng 100 ml, mỗi bình hứng 40 ml dịch rửa giải. Phân đoạn xác định sự có mặt G-Rb1 là aceton 50%, gộp dung dịch các bình được lựa chọn có chứa G-Rb1, cất thu hồi dung môi thu được sản phẩm là G-Rb1 có dạng bột vô định hình, màu trắng, hàm lượng 90,2% (HPLC) [4].

3.2. Xác định cấu trúc, nhận dạng và cấu trúc của chất tinh chế được

Sản phẩm cuối cùng của quá trình tinh chế được phân tích bằng các thông số:

- Tính chất: Bột vô định hình màu trắng.
- Phổ hồng ngoại (IR) trùng với các phổ của chất chuẩn G-Rb1 (hệ số march là 0,9595), đồng thời cho các đỉnh hấp thụ đặc trưng cho các nhóm (-OH) ở 3390, (-CH) ở 2942, (-CO) ở 1642 cm⁻¹ và các đỉnh hấp thụ mạnh đặc trưng cho (-CH=CH-) vòng thơm ở 1388, 1077, 890, 628 cm⁻¹.
- Phổ cộng hưởng từ hạt nhân: Phổ cộng hưởng từ hạt nhân của cẩn thu được sau tinh chế được so với chuẩn G-Rb1 giống nhau ở cả 2 phổ: phổ ¹³C-NMR, phổ

¹H-NMR. Kết quả phân tích phổ NMR hoàn toàn chính xác và phù hợp với cấu trúc của phân tử G-Rb1 như sau:



- Phổ khối: Kết quả đã ghi được phổ khối chứa mảnh ion phân tử có giá trị $[M+Na]^+$ m/z = 1131,54 dalton. Như vậy số khối m/z của chất tinh chế được là 1131,54 - 23 = 1108,54 dalton. Do z = 1 nên khối lượng phân tử của chất tinh chế được là 1108,54 dalton, xấp xỉ 1109, phù hợp với công thức phân tử của G-Rb1 là C₅₄H₉₂O₂₃.

Từ kết quả phân tích các dữ liệu phổ IR, NMR và MS kết hợp so sánh với tài liệu tham khảo có thể khẳng định chất chiết được là ginsenosid Rb1 có hàm lượng 90,2% (HPLC).

4. Kết luận

Đã xây dựng được qui trình tinh chế ginsenosid Rb1 từ cẩn thu được sau khi phân lập từ saponin toàn phần của Tam thất được mua trên thị trường. Các quy trình này đều dễ tiến hành, tiết kiệm thời gian, sử dụng các loại dung môi rẻ tiền, dễ kiểm và ít độc.

Đã tiến hành xác minh cấu trúc của ginsenosid Rb1 tinh chế được dựa trên các phương pháp phổ cộng hưởng từ hạt nhân, phương pháp phân tích khối phổ, phương pháp quang phổ hồng ngoại. Kết quả thực nghiệm đã khẳng định công thức phân tử cũng như cấu trúc của G-Rb1 tinh chế được là phù hợp với các kết quả nghiên cứu đã được công bố.

Tài liệu tham khảo

1. Bộ Y tế (2017), *Dược điển Việt Nam V*, tập 2, Nhà xuất bản Y học, trang 1279.
2. Trường Đại Học Dược Hà Nội (1998), *Bài giảng Dược liệu*, tập 1, trang 165.
3. Viện Dược liệu (2003), *Cây thuốc và động vật làm thuốc ở Việt Nam*, tập 2, Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật, trang 775.
4. *Pharmacopoeia of The People's Republic of China* (2015), volume I, page 491.

SUMMARY

The purification of Ginsenoside-Rb1 from the residue that obtained after isolating from Panax notoginseng saponins. Ginsenoside-Rb1 was purified by chromatographic column method using reverse phases silica gel (Rp-18) as station phases with the suitable resolution solvent-systems.

The Ginsenoside Rb1 structure of final products is confirmed by IR, MS and NMR spectrography. The content of Ginsenoside Rb1 obtained is 90.2% (determined by HPLC). This product can be used to control the quality of herbal materials and drugs which contain the Ginsenoside Rb1.

(Ngày nhận bài: 30/12/2017 ; Ngày phản biện: 05/03/2018 ; Ngày duyệt đăng: 04/07/2018)

NGHIÊN CỨU ĐẶC ĐIỂM HÌNH THÁI VÀ VI HỌC CỦA CÂY BÌM BÌM BA RĂNG [(*XENOSTEGIA TRIDENTATA* (L.) D. F. AUSTIN ET STAPLES], HỘ KHOAI LANG (CONVOLVULACEAE)

TRẦN THỊ KIM NINH, VÕ THỊ HƯỜNG, BÙI THÁI THẢO LY
Trung tâm Kiểm nghiệm Dược phẩm – Mỹ phẩm Bình Định

Từ khóa: Giải phẫu hình thái, vi học, Bìm bìm ba răng, Dây lưỡi đồng

1. Đặt vấn đề

Bìm bìm ba răng hay còn được gọi Dây lưỡi đồng có tên khoa học *Xenostegia tridentata* (L.) D. F. Austin et Staples là một loài mộc hoang ở nhiều nơi trên thế giới. Ở Ấn Độ, cây và rễ sắc uống dùng chữa thấp khớp, liệt nửa người, trĩ, sưng phù và các rối loạn đường tiết niệu. Ở Campuchia, nhân dân một số nơi sử dụng toàn cây để chế một loại thuốc dùng trị đau minh mây. Ở nước ta, nhân dân sử dụng phối hợp với các vị thuốc khác dùng chữa sốt rét và chữa ban xuất huyết [2], sắc uống trị tê thấp, bán thân bất toại, đái khó [3]. Ở Bình Định, dân gian dùng cây già đắp nhiều lần trong ngày chữa bệnh Zona.

Tuy nhiên, chưa có nghiên cứu đầy đủ về đặc điểm hình thái và giải phẫu của loài này ở Việt Nam. Vì vậy chúng tôi tiến hành nghiên cứu đặc điểm hình thái và vi học của cây Bìm bìm ba răng để cung cấp cơ sở dữ liệu cho công tác giám định và tiêu chuẩn hóa dược liệu, đồng thời cũng là để mở đầu cho những nghiên cứu tiếp theo về hóa học và tác dụng sinh học.

2. Thực nghiệm

2.1. Hóa chất, thiết bị

- Kính hiển vi quang học;
- Máy ảnh kỹ thuật số Sony 16.1;
- Các hóa chất và dụng cụ thủy tinh cần thiết.

2.2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Đối tượng nghiên cứu:

Mẫu Bìm bìm ba răng được thu hái tươi vào tháng 10 năm 2017 tại núi Vũng Chua – Quy Nhơn – Bình Định, có đủ thân, lá, hoa và quả.

2.2.2. Phương pháp nghiên cứu

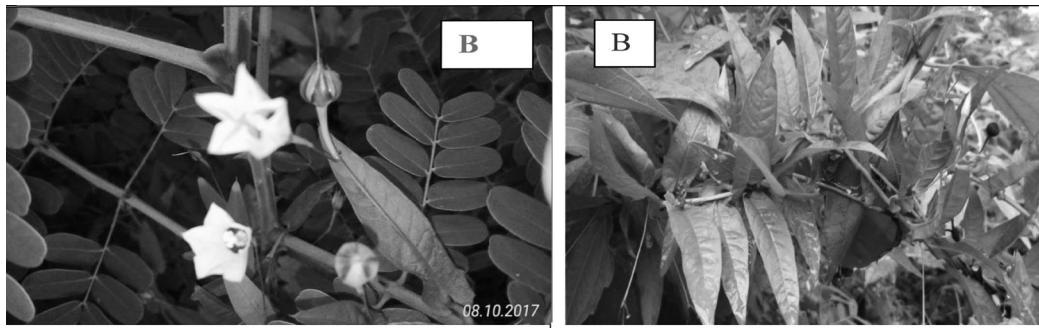
- **Khảo sát đặc điểm hình thái:** Các đặc điểm hình thái được quan sát bằng mắt thường, mô tả chụp ảnh các đặc điểm khảo sát. Tên khoa học của loài được xác định bằng cách dựa vào đặc điểm hình thái đã phân tích của cây so với các tài liệu [2],[3],[5].

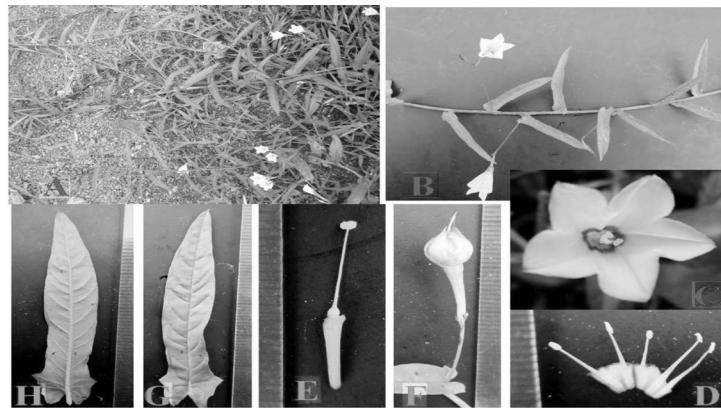
- **Khảo sát đặc điểm giải phẫu:** Cắt ngang thân, lá thành lát mỏng bằng dao lam. Thân cây được cắt ở phần lóng không sát máu, phiến lá được cắt ở khoảng 1/3 phía dưới của phiến nhưng không sát cuống. Nhuộm kép [1]. Bột dược liệu: lá, thân, hoa, quả được phơi héo tự nhiên, sau đó đem sấy ở 60°C cho đến khô, nghiên, rây qua rây có cỡ mắt rây 25 µm. Quan sát vi phẫu bằng kính hiển vi quang học (Nikon YS100) chụp bằng máy ảnh (hiệu Sony 16.1) và mô tả các thành phần.

3. Kết quả và bàn luận

3.1. Đặc điểm hình thái

Cây leo thuộc thảo hoặc bò lan dưới đất, thân quấn. Thân mịn, phần thân già tiếp xúc nhiều với ánh nắng mặt trời có màu nâu nhạt. Lá thuôn hẹp, chóp nhọn, gốc hình tim và có hai tai ở hai bên, mỗi tai có ba răng. Mặt trên và dưới của lá đều không có lông, cuống lá rất ngắn hoặc không có. Cụm hoa gồm 1-2 hoa ở nách lá, hoa đều lưỡng tính, hoa có 5 cánh. Đài hoa màu xanh hoặc màu tía, chia làm 5 thùy, cuống hoa dài, hoa màu vàng sữa hoặc màu trắng, ở tâm có màu đỏ nâu hay tía, lá đài bằng nhau, hình trứng hay hình mũi mác. Có 5 nhị, đinh gần gốc ống trắng, 5 nhị bằng nhau, chỉ nhị gốc và bao phấn màu trắng, phần gốc không lông. Nhụy cao hơn nhị, đầu nhụy hình đầu dạng cuộn não, chia làm hai thùy, đầu nhụy màu xanh lục nhạt, bầu nhụy không lông. Quả nang, hạt đen, không lông.



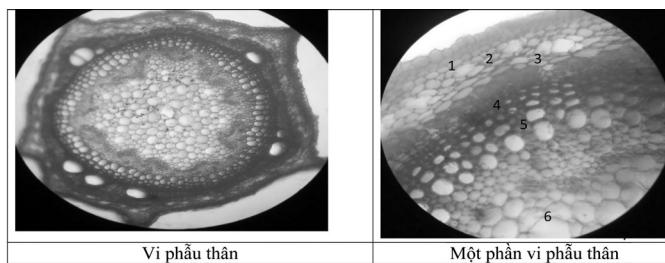


Hình 1. Đặc điểm hình thái Cây Bìm bìm ba răng *Xenostegia tridentata* (L.) [4]
A. Dạng cây sống; B. Cành mang hoa; C. Hoa ; D. Nhị; E. Nhụy; F. Quả; H,G. Lá.

3.2. Đặc điểm giải phẫu

3.2.1. Thân

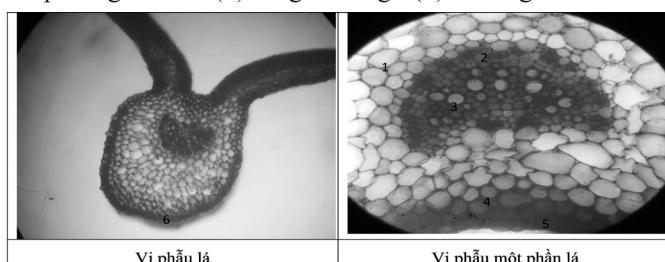
Mặt cắt tiêu bản hình tròn có góc lồi, từ ngoài vào trong: Biểu bì gồm 1 lớp tế bào hình trứng phía ngoài hóa cutin (1). Mô dày nằm sát lớp biểu bì (2) ở các góc lồi có nhiều lớp tế bào mô dày. Mô mềm vỏ (3) gồm 4-5 lớp tế bào hình đa giác hay bầu dục, kích thước không đều nhau, xếp lộn xộn. Mô cứng (4) nằm nối nhau tạo thành vành đai xung quanh gỗ. Gỗ (5) xếp liên tiếp tạo thành vòng tròn khép kín hướng tâm. Libe (6) xếp thành vách uốn lượn quanh mô mềm ruột. Mô mềm ruột (7).



Hình 2. Vị phẫu thân cây Bìm bìm ba răng (*Xenostegia tridentata* (L.))

3.2.2. Lá

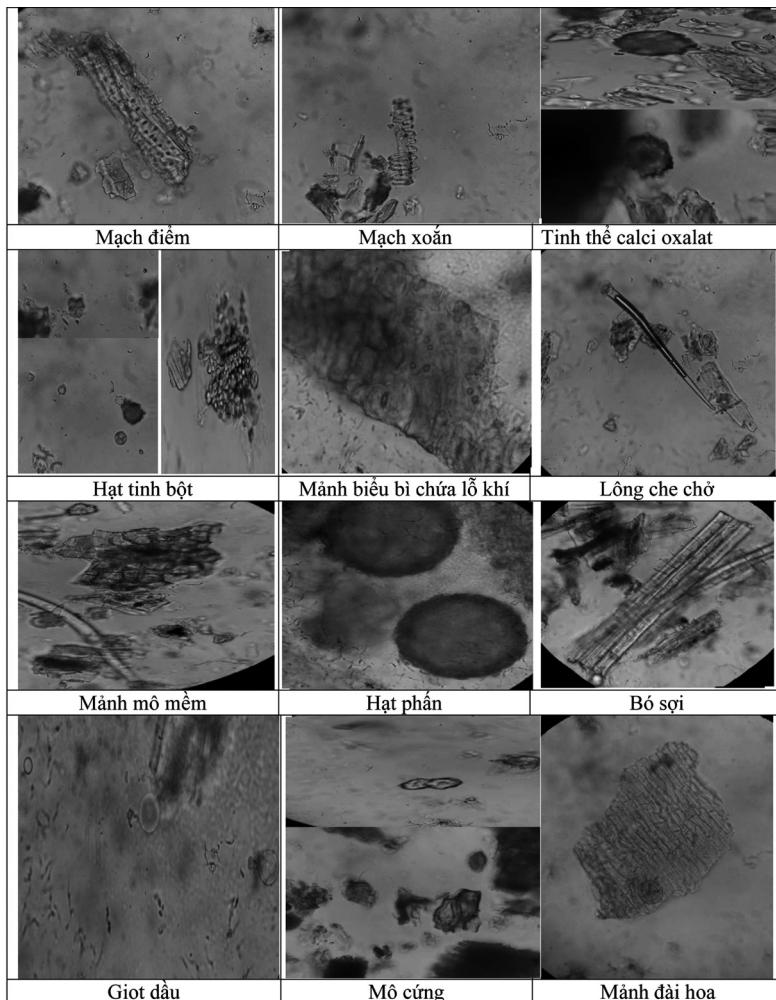
Gân lá có biểu bì dưới (6) hơi lồi, biểu bì trên (5) lõm được cấu tạo bởi một hàng tế bào hình trứng xếp nối tiếp nhau. Mô dày (4). Mô mềm (1) gồm các tế bào bầu dục, hình đa giác sắp xếp lộn xộn, kích thước không đều nhau. Bó libe – gỗ sáp xếp liên tục khép kín gồm libe (2) ở ngoài và gỗ (3) ở trong.



Hình 3. Vị phẫu lá cây Bìm bìm ba răng (*Xenostegia tridentata* (L.))

3.2.3. Đặc điểm bột dược liệu

Bột màu xanh xám, không mùi, vị đắng. Soi kính hiển vi thấy: Mạch điêm, mạch xoắn, rải rác có tinh thể calci oxalat hình cầu gai; hạt tinh bột hình tròn đứng riêng lẻ hay kép 2, kép 3, hay hơn nữa, nằm trong mô mềm; mảnh biểu bì chứa lỗ khí; lõng che chở; mảnh mô mềm; bó sợi mảng dày, khoang rộng; hạt phấn hình cầu, bề mặt có nhiều vân; giọt dầu; tế bào cường mô hình gần tròn, khoang hơi rộng; mảnh dài hoa ngoặc ngoèo, mang lông tiết đa bào đầu hình cầu.



Hình 4. Các đặc điểm bột được liệu Bìm bìm ba răng

4. Kết luận

Mẫu nghiên cứu là cây Bìm bìm ba răng được thu hái tại núi Vũng chua, Quy Nhơn, Bình Định năm 2017. Kết quả nghiên cứu đã mô tả đặc điểm hình thái của thân, lá, hoa, quả, hạt và đặc điểm vi phẫu thân, lá của cây Bìm bìm ba răng. Đã xác định đặc điểm bột được liệu của cây Bìm bìm ba răng (*Xenostegia tridentata* (L.) D. F. Austin et Staples), góp phần phục vụ cho công tác kiểm nghiệm và tiêu chuẩn hóa được liệu.

Tài liệu tham khảo

1. Bộ Y tế (2017), *Dược điển Việt Nam V*, Phụ lục 12.18 Định tính dược liệu và các chế phẩm bằng kính hiển vi, PL-283.
2. Võ Văn Chi (2012), *Từ điển cây thuốc Việt Nam*, NXB Y học, tập 1, trang 163.
3. Phạm Hoàng Hộ (2003), *Cây cỏ Việt Nam*, NXB Trẻ, quyển 2, trang 783.
4. Trần Ngọc Hồng, *Nghiên cứu Đặc điểm và Sinh thái họ Bìm bìm (Convolvulaceae Juss. 1789)* tại Thành phố Hồ Chí Minh, trang 83.
5. Zang Z.Y., Lu A. M., et al (1995), *Flora of China*, p.300.

SUMMARY

The plant species in same vernacular name of “Bìm bìm ba rang” growing in Vung Chua mountain – Bình Định (Vietnam) was identified as *Xenostegia tridentata* (L.) D. F. Austin et Staples by morphological characterization for taxonomical classification. In morphology, the plant was characterized as: A twining herb, leaf blade margins with 2-5 teeth on each side, darker reddish or brownish centre of corolla, ridges on the back of black glabrous fruits, black grain. In herb powder: spherical pollen, oil, calcium oxalate crystals, spiral and reticulate vessels, anomocytic stomata. Morphological characteristics and anatomical features of the plant were investigated and described in detail.

(Ngày nhận bài: 30/7/2018; Ngày phản biện: 08/09/2018; Ngày duyệt đăng: 24/12/2018)

MỤC LỤC

	Trang
• Quản lý - Trao đổi nghiệp vụ	
- Định hướng công tác kiểm tra và giám sát chất lượng thuốc năm 2019. <i>PGS. TS. ĐOÀN CAO SON – VIỆN TRƯỞNG VIỆN KIỂM NGHIỆM THUỐC TW</i>	1
• Nghiên cứu khoa học	
- Xây dựng và thẩm định quy trình định lượng nguyên liệu bán tổng hợp Exemestan bằng kỹ thuật sắc ký lỏng pha đảo. <i>CAO ĐỨC TUẤN, ĐẶNG VĂN CHỨC, BẠCH THỊ NHƯ QUỲNH, LÊ HỒNG THU, HOÀNG THỊ HỒNG LIÊN, LÊ QUANG THÁO, NGUYỄN VĂN HÙNG</i>	2
- Thẩm định quy trình định lượng Chymotrypsin trong chế phẩm viên nén bằng phương pháp đo quang động học. <i>TRẦN THỊ THANH HUẾ, NGUYỄN THỊ HỒNG VINH, NGUYỄN THỊ HẰNG, NGUYỄN THỊ LIÊN, VŨ QUÝ CHIÊN, ĐOÀN CAO SON</i>	8
- Xây dựng và thẩm định phương pháp định lượng đồng thời một số Saponin trong dược liệu Bảy lá một hoa Việt Nam bằng phương pháp HPLC. <i>CAO NGỌC ANH, MÃ VÂN KIỀU, ĐỖ THỊ HÀ, THÁI NGUYỄN HÙNG THU</i>	12
- Nghiên cứu xây dựng phương pháp phát hiện và định lượng đồng thời hai đồng phân Butylparaben và Isobutylparaben trong một số mỹ phẩm. <i>LÊ THỊ HƯỜNG HOA, NGÔ THỊ DUYÊN, THÁI NGUYỄN HÙNG THU</i>	16
- Nghiên cứu định lượng Fexofenadin trong huyết tương người bằng phương pháp LC-MS/MS. <i>TẠ MẠNH HÙNG, PHAN THỊ NGHĨA, NGUYỄN THỊ CHÂM</i>	22
- Nghiên cứu tính chất Ginsenosid Rb1 từ cǎn thu được sau phân lập saponin toàn phần của Tam thất để làm chất chuẩn. <i>ĐỖ THỊ BÍCH THUẬN, NGUYỄN THỊ LAN PHƯƠNG, NGUYỄN VIỆT THÚY, BẠCH THỊ THẨM, NGHIỆM THỊ MAI</i>	26
- Nghiên cứu đặc điểm hình thái và vi học của cây Bìm bìm ba răng [<i>Xenostegia tridentata</i> (L.) D. F. Austin et Staples], họ Khoai lang (Convolvulaceae). <i>TRẦN THỊ KIM NINH, VÕ THỊ HƯỜNG, BÙI THÁI THÁO LY</i>	29

CONTENTS

	Page
• Management - Professional exchange	
- Objectives and activities of the drug quality control and monitoring for the year 2019. <i>Associate Prof. ĐOÀN CAO SON, Ph.D., Director of NIDQC</i>	1
• Scientific researches	
- Development and validation of Reverse-phase Liquid Chromatography technique for the determination of Exemestane semi-synthetic material. <i>CAO ĐỨC TUẤN, ĐẶNG VĂN CHỨC, BẠCH THỊ NHƯ QUỲNH, LÊ HỒNG THU, HOÀNG THỊ HỒNG LIÊN, LÊ QUANG THÁO, NGUYỄN VĂN HÙNG</i>	2
- Validation of the procedure for determination of Chymotrypsin in tablets by kinetic spectrophotometry method. <i>TRẦN THỊ THANH HUẾ, NGUYỄN THỊ HỒNG VINH, NGUYỄN THỊ HẰNG, NGUYỄN THỊ LIÊN, VŨ QUÝ CHIÊN, ĐOÀN CAO SON</i>	8
- Development and validation of HPLC method for the simultaneous assay of several Saponins in <i>Paris polyphylla var. chinensis</i> in Vietnam. <i>CAO NGỌC ANH, MÃ VÂN KIỀU, ĐỖ THỊ HÀ, THÁI NGUYỄN HÙNG THU</i>	12
- Development the method of simultaneous identification and determination two isomers of Butylparaben and Isobutylparaben in some cosmetics. <i>LÊ THỊ HƯỜNG HOA, NGÔ THỊ DUYÊN, THÁI NGUYỄN HÙNG THU</i>	16
- Study on determination of Fexofenadine in human plasma by LC-MS/MS method. <i>TẠ MẠNH HÙNG, PHAN THỊ NGHĨA, NGUYỄN THỊ CHÂM</i>	22
- Study on purification of Ginsenoside Rb1 from the residue after isolation of total saponins of the <i>Panax notogingseng</i> to as a standard substance. <i>ĐỖ THỊ BÍCH THUẬN, NGUYỄN THỊ LAN PHƯƠNG, NGUYỄN VIỆT THÚY, BẠCH THỊ THẨM, NGHIỆM THỊ MAI</i>	26
- Study on the morphological and anatomical characteristics of the plant named “Bìm bìm ba răng” [<i>Xenostegia tridentata</i> (L.) D. F. Austin et Staples], (Fam. Convolvulaceae). <i>TRẦN THỊ KIM NINH, VÕ THỊ HƯỜNG, BÙI THÁI THÁO LY</i>	29