

VIỆN KIỂM NGHIỆM THUỐC TRUNG ƯƠNG

ISSN 1859 - 0055

TẠP CHÍ

**KIỂM
NGHIỆM
thuốc**

JOURNAL OF DRUG QUALITY CONTROL

SỐ 1.2020

TẬP 18-SỐ 67

NATIONAL INSTITUTE OF DRUG QUALITY CONTROL

48 HAI BA TRUNG . HANOI - VIETNAM

TEL: 84.024.39363794 * FAX: 84.024.38256911 * E-MAIL: tapchiknt@yahoo.com.vn

ĐỊNH HƯỚNG CÔNG TÁC KIỂM TRA VÀ GIÁM SÁT CHẤT LƯỢNG THUỐC NĂM 2020

PGS.TS. ĐOÀN CAO SƠN

Viện trưởng Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương

Trong năm 2019, 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 hưởng ứng các phong trào thi đua, kết quả đã nhận được nhiều thành tích đáng khích lệ, cụ thể:

Hệ thống kiểm nghiệm Nhà nước đã bám sát chỉ tiêu kế hoạch được giao, khắc phục khó khăn, hợp tác với các phòng kiểm nghiệm của các doanh nghiệp, sự phối hợp chặt chẽ giữa Hệ thống Kiểm nghiệm - Quản lý dược - Thanh tra dược nhằm tăng cường công tác kiểm tra, giám sát chất lượng thuốc. Nhờ vậy, chất lượng thuốc trên thị trường vẫn ổn định và được kiểm soát, tỷ lệ thuốc không đạt chất lượng vẫn duy trì ở mức thấp (1,34%), tỷ lệ thuốc giả thấp hơn so với các nước trong khu vực (0,06%, không tính được liệu bị nhầm lẫn).

Hội đồng thi đua của Hệ thống kiểm nghiệm đã đề nghị Bộ Y tế tặng Cờ thi đua cho 5 Trung tâm Kiểm nghiệm (TTKN), gồm: TTKN Thuốc – Mỹ phẩm – Thực phẩm Hà Nội, TTKN Thuốc – Mỹ phẩm – Thực phẩm Hải Dương, TTKN Thanh Hóa, TTKN Thuốc – Mỹ phẩm – Thực phẩm Thành phố Hồ Chí Minh và TTKN Thuốc – Mỹ phẩm – Thực phẩm Cần Thơ. Đề nghị Bộ Y tế tặng Bằng khen cho 12 tập thể và 24 cá nhân; xét tặng giấy khen của Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương cho 17 tập thể và 39 cá nhân đã có thành tích xuất sắc trong công tác kiểm tra, giám sát và đảm bảo chất lượng thuốc năm 2019.

Báo cáo tổng kết công tác kiểm tra, giám sát chất lượng thuốc năm 2019 đã được gửi đến các đơn vị; đã đề ra định hướng công tác và các nhiệm vụ trọng tâm cho hệ thống kiểm nghiệm năm 2020.

1. Định hướng công tác

1.1. Duy trì 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. Hệ thống kiểm nghiệm Nhà nước chú trọng lấy mẫu có trọng tâm, trọng điểm. 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 2019 để các đơn vị trong hệ thống kiểm nghiệm có định hướng xây dựng kế hoạch lấy mẫu.

1.2. Tiếp tục 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. Tăng cường thiết lập chất chuẩn, chất đối chiếu để mở rộng danh mục hoạt chất được kiểm soát chất lượng.

1.4. 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.

1.5. Hoàn thành tốt các chức năng nhiệm vụ và kế hoạch được giao, đồng thời mở rộng hoạt động chuyên môn kỹ thuật theo hướng sau:

- Đối với Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương và Viện Kiểm nghiệm thuốc Thành phố Hồ Chí Minh:

ngoài các công việc kiểm nghiệm thường quy, 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 và enzym. 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 liên phòng và thử nghiệm thành thạo; quản lý phòng thí nghiệm theo tiêu chuẩn GLP và ISO/IEC-17025.

- Đối với các trung tâm kiểm nghiệm tuyến Tỉnh, Thành phố cần tiếp tục củng cố và tăng cường cơ sở vật chất kỹ thuật, đào tạo cán bộ về 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.

- Thực hiện nghiêm công tác phòng chống dịch Covid-19 theo hướng dẫn và yêu cầu của Bộ Y tế và các cơ quan chức năng.

2. Nhiệm vụ trọng tâm

2.1. Đối với Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương và Viện Kiểm nghiệm thuốc Thành phố 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.

- Củng cố và nâng cấp Trung tâm Đánh giá tương đương sinh học ở hai Viện theo chuẩn mực Quốc tế và Khu vực.

- Tăng cường thiết lập chất chuẩn, chất đối chiếu và dược 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 tuyến Tỉnh, 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.

- Các trung tâm tham gia đánh giá thuốc nhập khẩu trước khi lưu hành (tiền kiểm) cần bám sát vào tiêu chuẩn thuốc đăng ký, kiểm tra toàn bộ các chỉ tiêu chất lượng theo quy định.

- 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; 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 đã gửi cho các đơn vị, 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 số 32/2018/TT-BYT ngày 12/11/2018 của Bộ Y tế Quy định việc đăng ký lưu hành thuốc, nguyên liệu làm thuốc.

- Rà soát các tiêu chuẩn chất lượng thuốc cho phù hợp với Dược điển Việt Nam V và phiên bản mới của các Dược điển hiện hành.

- Cần thực sự chú trọng việc kiểm tra chất lượng nguyên liệu đầu vào, đặc biệt là các dược liệu để tránh sử dụng dược liệu nhầm lẫn và 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 và theo dõi đầy đủ độ ổn định của 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.

XÂY DỰNG VÀ THẨM ĐỊNH QUY TRÌNH ĐỊNH TÍNH, ĐỊNH LƯỢNG NGUYÊN LIỆU NYSTOSE BẰNG PHƯƠNG PHÁP HPLC

TRẦN VIỆT HÙNG

Viện Kiểm nghiệm thuốc
Thành phố Hồ Chí Minh

HỨA THỊ THU HUYỀN

Trung tâm Kiểm nghiệm
Bắc Kạn

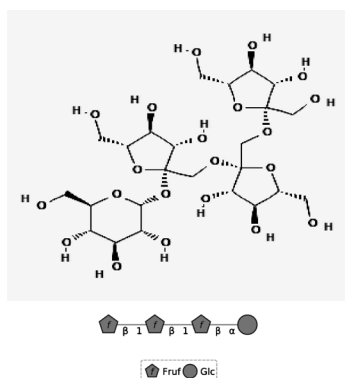
BẠCH THỊ THẨM, NGUYỄN TUẤN ANH,

TRẦN THỊ THU TRANG, PHẠM VĂN KIẾN,
ĐOÀN CAO SƠN

Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương

Từ khóa: Nystose, Ba kích, chất chuẩn, tán xạ ánh sáng bay hơi.

1. Đặt vấn đề



Công thức cấu tạo của Nystose

Nystose là một fructo-oligosaccharid (FOS) có cấu trúc một phân tử glucose liên kết với ba gốc fructose. Nystose (G3F) là một trong những hoạt chất chính có hoạt tính sinh học trong rễ cây Ba kích (*Morinda officinalis* How, họ Cà phê (Rubiaceae) [1],[2],[3],[5],[6]. Trong các phương thuốc cổ phương, rễ cây Ba kích (*Radix Morinda officinalis*) với tác dụng cường dương do dưỡng thận dương. Tuy nhiên gần đây, các nghiên cứu hiện đại đã chứng minh được nhiều tác dụng mới của nhóm hoạt chất FOS có trong rễ cây Ba kích. Các FOS có tác dụng chống suy nhược [7], kích thích tế bào tạo xương, ức chế tế bào hủy xương, tác dụng chống trầm cảm [9]. Thử nghiệm lâm sàng trên chuột cho thấy, nystose có khả năng điều chỉnh hệ sinh vật cũng như hệ thống miễn dịch đường ruột [8].

Trong Dược điển Trung Quốc năm 2015 và tiêu chuẩn dược liệu Hồng Kông Trung Quốc (Hong Kong Chinese Materia Medica Standards), định lượng nystose là một trong các chỉ tiêu để đánh giá chất lượng dược liệu Ba kích và để thực hiện yêu cầu này thì cần sử dụng đến chất chuẩn nystose [5],[6]. Ở Việt Nam, yêu cầu xác định hàm lượng nystose trong dược liệu Ba kích cũng đang được xem xét để đưa vào Dược điển. Nhận thấy nhu cầu cần thiết về việc sử dụng chuẩn nystose trong

Công thức phân tử: $C_{24}H_{42}O_{21}$.

Phân tử lượng: 666,579 g/mol.

Tên khoa học: (2R,3R,4S,5S,6R)-2-[(2S,3S,4S,5R)-2-[(2R,3S,4S,5R)-2-[(2R,3S,4S,5R)-3,4-dihydroxy-2,5-bis(hydroxymethyl) oxolan-2-yl] oxymethyl]-3,4-dihydroxy-5-(hydroxymethyl) oxolan-2-yl] oxymethyl]-3,4-dihydroxy-5-(hydroxymethyl) oxane-3,4,5-triol [10].

công tác kiểm tra, giám sát chất lượng dược liệu và các chế phẩm đông dược có chứa dược liệu Ba kích, Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương đã phối hợp với Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam tiến hành chiết xuất và phân lập nystose từ dược liệu Ba kích dùng làm nguồn nguyên liệu thiết lập chất chuẩn nystose.

Hiện nay, trong các Dược điển tham chiếu cũng như trong Dược điển Trung Quốc năm 2015 và tiêu chuẩn dược liệu Hồng Kông Trung Quốc đều chưa có chuyên luận riêng về nystose [5],[6]. Để đánh giá chất lượng nguyên liệu nystose chiết xuất và phân lập dược từ dược liệu Ba kích, chúng tôi đã tiến hành “Xây dựng và thẩm định quy trình định tính, định lượng nguyên liệu nystose bằng phương pháp HPLC”.

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 GLP và ISO/IEC 17025 gồm:

- Máy sắc ký lỏng hiệu năng cao Hitachi với detector tán xạ ánh sáng bay hơi (ELSD);

- Máy lắc siêu âm Elma S100;
- Cân phân tích Melter Toledo AB-2S, độ chính xác 0,1 mg;
- Cột RP18 Ultra (250 x 4,6 mm; 5 μ m);
- Các dụng cụ thủy tinh cần thiết cho quá trình thực nghiệm.

2.1.2. Hóa chất, dung môi, chất chuẩn:

- Chất chuẩn nystose ($C_{24}H_{42}O_{21}$) (Nguồn gốc: Sigma – Aldrich; SKS: BCBT3105; Hàm lượng: 99,6% nguyên trạng);
- Methanol (HPLC; Merck);
- Nước RO (VKNTTW).

2.2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Đối tượng nghiên cứu

Nguyên liệu nystose số lô 2019-NL01 do Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam chiết xuất, phân lập và tinh chế.

2.2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.2.1. Điều kiện sắc ký

- Cột RP18 ULTRA (5 μ m; 250 $\times$ 4,6 mm).
- Pha động: Methanol - nước (3 : 97) (tt/tt).
- Detector tán xạ ánh sáng bay hơi (ELSD) SEDEX 85 với các thông số sau:

- + Nhiệt độ hóa hơi: 90 $^{\circ}$ C
- + Độ phát hiện: Gain 6
- + Áp suất khí nitơ: 3,5 bar

- Tốc độ dòng: 0,8 ml phút
- Thể tích tiêm mẫu: 10 μ l

2.2.2.2. Chuẩn bị các dung dịch chuẩn, dung dịch thử

- **Dung dịch chuẩn:** Cân chính xác khoảng 10 mg nystose (Chất chuẩn) vào bình định mức 10 ml, hòa tan và thêm vừa đủ đến vạch bằng pha động, lắc đều được dung dịch chuẩn gốc. Từ dung dịch chuẩn gốc tiến hành pha dãy dung dịch chuẩn trong pha động để được các dung dịch chuẩn có nồng độ lần lượt khoảng 200 μ g/ml; 400 μ g/ml; 600 μ g/ml.

- **Dung dịch thử:** Cân chính xác khoảng 10 mg chế phẩm vào bình định mức 25 ml, thêm 20 ml pha động, lắc siêu âm 20 phút, để nguội, thêm vừa đủ đến vạch bằng pha động, lắc đều, thu được dung dịch tiêm sắc ký.

Tiêm riêng biệt 10 μ l mỗi dung dịch chuẩn và dung dịch thử vào hệ thống sắc ký. Tiến hành sắc ký theo điều kiện đã nêu, ghi thời gian lưu và diện tích của pic

nystose. Xây dựng đường hồi quy biểu diễn mối tương quan giữa logarit (ln) của nồng độ (μ g/ml) và logarit (ln) của diện tích pic nystose.

Hàm lượng (%) nystose ($C_{24}H_{42}O_{41}$), nguyên trạng được tính theo công thức:

$$X(\%) = e^{(\ln S - b)/a} \times \frac{25}{m} \times \frac{100}{1000}$$

Trong đó:

S: Diện tích pic nystose thu được từ sắc ký đồ của dung dịch thử.

a, b: Là hệ số góc và hệ số chặn trong phương trình hồi qui tuyến tính ($y = ax + b$) thu được từ đường chuẩn của nystose.

m: Khối lượng cân mẫu thử (mg).

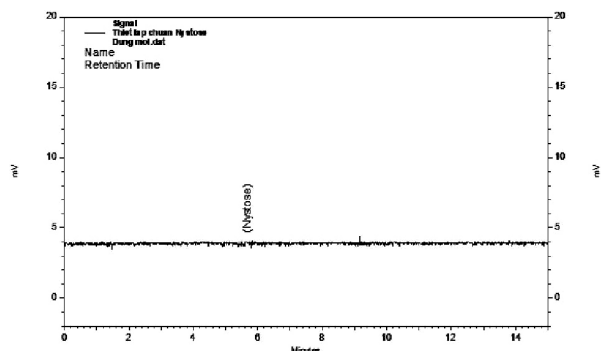
2.2.2.3. Thẩm định phương pháp định lượng:

Thẩm định các chỉ tiêu: Độ đặc hiệu, tính thích hợp của hệ thống sắc ký, độ tuyến tính, độ đúng, độ lặp lại, độ chính xác trung gian.

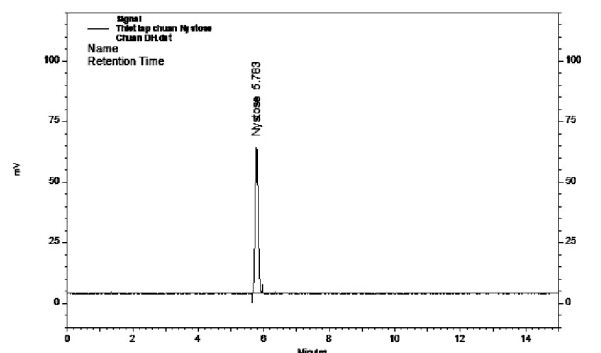
3. Kết quả và bàn luận

3.1. Độ đặc hiệu

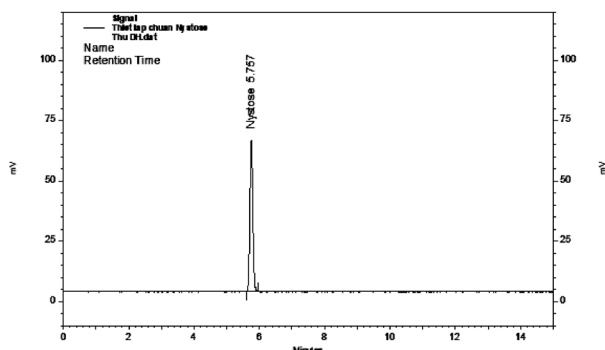
Tiến hành tiêm vào hệ thống sắc ký lần lượt dung môi pha mẫu (pha động), dung dịch chuẩn và dung dịch thử. Kết quả phân tích cho thấy:



Hình 1. Sắc ký đồ của dung môi pha mẫu



Hình 2. Sắc ký đồ của dung dịch chuẩn Nystose



Hình 3. Sắc ký đồ của dung dịch thử

Sắc ký đồ của dung dịch thử cho pic có thời gian lưu tương ứng pic nystose trên sắc ký đồ của dung dịch chuẩn, pic nystose nhọn, cân xứng với số đĩa lý thuyết khoảng 19000. Sắc ký đồ của dung môi pha mẫu không xuất hiện pic có thời gian lưu tương ứng với thời gian lưu của nystose. Kết quả cho thấy phương pháp đạt yêu cầu về tính đặc hiệu.

3.2. Tính thích hợp của hệ thống sắc ký

Tiêm 6 lần dung dịch chuẩn có nồng độ khoảng 400 µg/ml. Ghi lại các sắc ký đồ và xác định thời gian lưu, diện tích pic nystose. Kết quả được thể hiện ở Bảng 1.

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

STT	Thời gian lưu (phút)	Diện tích pic (mV.s)	Ln (Diện tích pic)	Số đĩa lý thuyết
1	5,732	390054	12,8740	19188
2	5,720	374751	12,8340	19826
3	5,727	406781	12,9160	19907
4	5,700	415190	12,9365	18225
5	5,688	426549	12,9635	20082
6	5,688	421085	12,9506	19496
Trung bình	5,709	405735	12,9124	
RSD %	0,34		0,38	

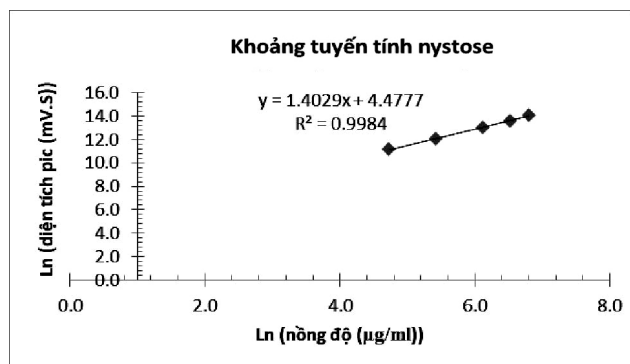
Kết quả khảo sát cho thấy, độ lệch chuẩn tương đối (RSD) của thời gian lưu và logarit diện tích pic đều nhỏ hơn 1%. Số đĩa lý thuyết tính theo pic nystose lớn hơn 2000. Như vậy, hệ thống sắc ký phù hợp để định tính, định lượng nguyên liệu nystose.

3.3. Độ tuyến tính

Khảo sát trên dãy các dung dịch chuẩn nystose pha trong pha động với 5 nồng độ khác nhau. Cách chuẩn bị các dung dịch chuẩn và kết quả được thể hiện trong Bảng 2 và Hình 4.

Bảng 2. Kết quả khảo sát khoảng tuyến tính

Chuẩn	Lượng cân chuẩn (mg)	Độ pha loãng	Nồng độ (µg/ml)	Diện tích pic (mV.s)	Ln (Nồng độ)	Ln (Diện tích pic)
1	11,35	10 x 1000/100	113,046	69412	4,7278	11,1478
2		10 x 1000/200	226,092	168711	5,4209	12,0359
3		10 x 1000/400	452,184	467757	6,1141	13,0557
4		10 x 1000/600	678,276	787113	6,5196	13,5761
5		10 x 1000/800	904,368	1307759	6,8072	14,0838
Hệ số góc (slope):			1,4029			
Hệ số chắn (intercept):			4,4777			
Phương trình hồi quy y = 1,4029 x + 4,4777;				Hệ số tương quan r = 0,9992		



Hình 4. Đồ thị biểu diễn mối tương quan tuyến tính giữa logarit (nồng độ) và logarit (diện tích pic) nystose

Kết quả cho thấy với điều kiện sắc ký đã lựa chọn, trong khoảng nồng độ đã khảo sát, có sự tương quan tuyến tính chặt chẽ giữa logarit (nồng độ) và logarit (diện tích pic) nystose với hệ số tương quan $r = 0,9992$.

3.4. Độ đúng

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

- **Chuẩn bị mẫu chuẩn:** Dùng dãy chuẩn ở mục 3.3. Độ tuyến tính

- **Chuẩn bị dung dịch chuẩn gốc thêm vào độ đúng (A):** Cân 51,89 mg chất chuẩn nystose vào bình định mức 50 ml, hòa tan và pha loãng đến vạch bằng pha động, lắc đều.

- **Chuẩn bị các mẫu thử:**

+ **Mẫu tự tạo có nồng độ 80% (Chuẩn bị 3 mẫu):**
Cân chính xác khoảng 5 mg mẫu thử và hút chính xác 3 ml dung dịch chuẩn gốc (A) vào bình định mức 25 ml, thêm 17 ml pha động, lắc siêu âm 20 phút, để nguội, thêm vừa đủ đến vạch bằng pha động, lắc đều, thu được dung dịch tiêm sắc ký.

+ **Mẫu tự tạo có nồng độ 100% (Chuẩn bị 3 mẫu):**
Cân chính xác khoảng 5 mg mẫu thử và hút chính xác 5 ml dung dịch chuẩn gốc (A) vào bình định mức 25 ml, thêm 15 ml pha động, lắc siêu âm 20 phút, để nguội, thêm vừa đủ đến vạch bằng pha động, lắc đều, thu được dung dịch tiêm sắc ký.

+ **Mẫu tự tạo có nồng độ 120% (Chuẩn bị 3 mẫu):**
Cân chính xác khoảng 5 mg mẫu thử và hút chính xác 7 ml dung dịch chuẩn gốc (A) vào bình định mức 25 ml, thêm 13 ml pha động, siêu âm 20 phút, để nguội, thêm vừa đủ đến vạch bằng pha động, lắc đều, thu được dung dịch tiêm sắc ký.

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

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

Mẫu	Lượng cân thử (mg)	Lượng nystose trong thử (µg)	Lượng chuẩn nystose thêm vào (µg)	Diện tích pic (mV.s)	Ln (Diện tích pic)	Ln (nồng độ tìm thấy)	Lượng nystose tìm lại (µg)	% Thu hồi	
								%	Trung bình
80%	5,38	5256,62	3022,66	304064	12,6250	5,8075	8319,79	101,3	101,4% RSD = 0,4%
80%	5,12	5002,58	3022,66	290680	12,5800	5,7754	8057,07	101,1	
80%	5,42	5295,70	3022,66	306790	12,6339	5,8139	8372,89	101,8	
100%	5,71	5579,05	5037,77	431027	12,9739	6,0562	10669,19	101,0	101,0%; RSD = 0,8%
100%	5,45	5325,02	5037,77	418658	12,9448	6,0355	10450,04	101,7	
100%	5,34	5217,54	5037,77	408393	12,9200	6,0178	10266,75	100,2	
120%	5,65	5520,43	7052,88	545036	13,2086	6,2235	12611,94	100,6	100,5% RSD = 0,8%
120%	5,01	4895,11	7052,88	503902	13,1301	6,1676	11925,86	99,7	
120%	5,55	5422,72	7052,88	541811	13,2027	6,2193	12558,70	101,2	

Kết quả tính theo phương trình hồi quy: $y = 1,4029x + 4,4777$

Kết quả thu được trong Bảng 3 cho thấy tỉ lệ thu hồi nystose đạt từ 99,7% đến 101,8% và RSD nhỏ hơn 2%. Như vậy phương pháp phân tích có độ đúng tốt.

3.5. Độ chính xác

3.5.1. Độ lặp lại

Tiến hành định lượng nystose trong nguyên liệu thiết lập chất chuẩn trên 6 mẫu thử độc lập được chuẩn bị theo mục 2.2.2.2. Kết quả được trình bày ở Bảng 4 cho thấy phương pháp có độ lặp lại tốt với RSD là 1,1% (Nhỏ hơn 2,0%).

3.5.2. Độ chính xác trung gian

Kiểm nghiệm viên (KNV) 2 tiến hành định lượng nystose trên cùng một mẫu chế phẩm vào một ngày khác. Cách tiến hành như phần độ lặp lại. Kết quả được trình bày ở Bảng 4.

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

Ngày 1, KNV 1					Ngày 2, KNV 2				
Phương trình hồi quy: y = 1,4029 x + 4,4777					Phương trình hồi quy: y = 1,3968 x + 4,6634				
Stt	Khối lượng cân mẫu thử (mg)	Diện tích pic (mV.s)	Ln (Diện tích pic)	Hàm lượng (%) nguyên trạng	Stt	Khối lượng cân mẫu thử (mg)	Diện tích pic (mV.s)	Ln (Diện tích pic)	Hàm lượng (%) nguyên trạng
1	10,08	379241	12,8459	96,62	1	10,63	482012	13,0857	97,73
2	10,82	419806	12,9475	96,77	2	10,82	497401	13,1172	98,20
3	10,92	435786	12,9849	98,47	3	10,53	470062	13,0606	96,90
4	10,85	428230	12,9674	97,88	4	10,90	501272	13,1249	98,02
5	10,95	426456	12,9633	96,70	5	10,74	488089	13,0983	97,60
6	10,22	400765	12,9011	99,12	6	10,35	469313	13,0590	98,47
Trung bình = 97,59%; n = 6; RSD = 1,09%					Trung bình = 97,82%; n = 6; RSD = 0,56%				
Kết quả định lượng trung bình = 97,71%; n = 12; RSD = 0,83%									

Kết quả cho thấy phương pháp định lượng nystose có độ chính xác cao với độ lặp lại trong ngày là 1,1% và 0,6% (n = 6), độ lặp lại khác ngày là 0,8% (n = 12).

4. Kết luận

Xây dựng được phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao với detector tán xạ ánh sáng bay hơi (ELSD) để định lượng nguyên liệu nystose. Phương pháp sử dụng cột ULTRA RP 18 (250 x 4,6 mm; 5 μ m); Tốc độ dòng 0,8

ml/phút; Thể tích tiêm 10 μ l. Pha động là methanol – nước (3 : 97). Detector ELSD với điều kiện nhiệt độ hóa hơi 90°C, độ phát hiện Gain 6. Phương pháp đã được thẩm định về tính đặc hiệu, độ thích hợp của hệ thống, độ tuyến tính, độ đúng, độ lặp lại và độ chính xác trung gian. Kết quả thẩm định cho thấy phương pháp HPLC đã xây dựng hoàn toàn phù hợp cho việc định lượng $C_{24}H_{42}O_{21}$ trong nguyên liệu nystose.

Tài liệu tham khảo

- Bộ Y Tế (2017), *Dược Điển Việt Nam V*, Nhà xuất bản Y học.
- Viện Dược liệu (2004), *Cây thuốc và động vật làm thuốc ở Việt Nam*, tập 2, Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật, trang 325.
- Đỗ Tất Lợi (1999), *Những cây thuốc và vị thuốc Việt nam*, Nhà xuất bản Y học, trang 358.
- Chang M., et al. (2008), “Cytoprotective effects of *Morinda officinalis* against hydrogen peroxide-induced oxidative stress in Leydig TM3 cells”, *Asian J. Androl*, 10(4), pp. 667-674.
- Chinese Pharmacopoeia Commission* (2015), *Pharmacopoeia of the People's Republic of China*, vol. 1, pp. 284-285.
- Hong Kong Chinese Materia Medica Standards*, Department of Health, The Government of Hong Kong Special Administrative Region.

7. Feng F., et al. (2012), "Study on oligosaccharides from *Morinda officinalis*", *Zhong Yao Cai*, 35(8), pp.1259-1262.
8. Noboru Yoshida, Wakako Satou, Shuko Hata... (2006), "Effects of 1-Kestose and Nystose on the Intestinal Microorganisms and Immune System in Mice", *Journal of Applied Glycoscience*, Volume 53, Issue 3, Pages 175-180.
9. X.J. Li, S.Y. Ma, D. Cheng, H.S. Chang, L.L. Li, Y. Lu (2017), "Research of *Morinda officinalis* How's oligosaccharide extraction and antidepressant effects", *Bulgarian Chemical Communications*, Volume 49, Special Edition K2, pp. 162 – 167.
10. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Nystose>.

SUMMARY

A Reverse-phase HPLC-ELSD method was developed for assay Nystose material. The method was carried by using a column ULTRA RP18 (250 × 4.6 mm; 5 μm); The flow rate is maintained at 0.8 ml/min, injection volume is 10 μl. A mixture of methanol – water (3 : 97) as mobile phase. ELSD detector: The temperature 90°C; gain: 6.

The method was validated about the system suitability, specificity, linear range, precision, accuracy and the validation results proved that this method was suitable for identification and quantification of $C_{24}H_{42}O_{21}$ in nystose material.

(Ngày nhận bài: 22/08/2019 ; Ngày phản biện: 29/08/2019 ; Ngày duyệt đăng: 23/12/2019)

XÂY DỰNG PHƯƠNG PHÁP HPLC ĐỂ ĐỊNH LƯỢNG MELOXICAM TRONG HUYẾT TƯƠNG NGƯỜI VÀ ỨNG DỤNG TRONG ĐÁNH GIÁ TƯƠNG ĐƯƠNG SINH HỌC

LÊ THỊ KIM ANH, NGUYỄN VĂN BẠCH

Học viện Quân Y

TẠ MẠNH HÙNG, PHAN THỊ NGHĨA,
NGUYỄN THỊ CHÂM, ĐOÀN CAO SƠN

Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương

Từ khóa: Meloxicam, tương đương sinh học, huyết tương, HPLC.

1. Đặt vấn đề

Meloxicam là dẫn xuất của oxycam có tác dụng chống viêm, giảm đau, hạ sốt. Meloxicam ức chế cyclooxygenase (COX) làm giảm tổng hợp prostaglandin, chất trung gian có vai trò quan trọng trong cơ chế bệnh sinh của quá trình viêm, sốt, đau [1].

Meloxicam hấp thu tốt qua đường tiêu hóa, sinh khả dụng đường uống đạt 89% so với tiêm tĩnh mạch, thức ăn rất ít ảnh hưởng đến sự hấp thu. Sự hấp thu dưới dạng viên nén, viên nang đạt được nồng độ tối đa trong máu sau 6 giờ. Nửa đời thải trừ của thuốc trung bình là 20 giờ [1].

Một số phương pháp phân tích để định lượng nồng độ meloxicam trong huyết tương người đã được các tác giả công bố bằng phương pháp LC-MS, HPLC [3],[4]. Chúng tôi đã xây dựng được phương pháp định lượng meloxicam trong các mẫu huyết tương người bằng phương pháp HPLC có độ nhạy, độ đặc hiệu cao, tin cậy

và phù hợp với trang thiết bị phòng thí nghiệm. Phương pháp đã được áp dụng trong nghiên cứu đánh giá tương đương sinh học trên người tình nguyện khỏe mạnh ở Việt Nam.

2. Thực nghiệm

2.1. Thiết bị

Máy sắc ký lỏng cao áp (HPLC) với detector PDA và hệ tiêm mẫu tự động. Thiết bị được hiệu chuẩn và quản lý theo các quy định của GLP và ISO/IEC – 17025.

2.2. Dung môi, hóa chất, chất chuẩn và thuốc nghiên cứu

- Chất chuẩn meloxicam, Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương, SKS: 0209243, hàm lượng: 99,40% (nguyên trạng); độ ẩm: 0,03%;

- Chất chuẩn piroxicam, Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương, SKS: 0102132, hàm lượng: 99,49%;

độ ẩm: 0,07% (sử dụng làm chất chuẩn nội – IS trong phương pháp phân tích);

- Methanol, acetonitril đạt tiêu chuẩn tinh khiết HPLC của Merck, Đức;

- Diethylether, cloroform, kali dihydrophosphat, acid phosphoric đạt mức độ phân tích của Merck, Đức;

- Huyết tương trắng: Không có meloxicam của Viện Huyết học và Truyền máu Trung ương;

- Thuốc thử: Viên nén meloxicam STADA® 15 mg (Batch No: 010718) do Chi nhánh Công ty TNHH Liên doanh Stada Việt Nam sản xuất;

- Thuốc chứng: Viên nén Mobic® 15 mg (Batch No: 744569) do Công ty Boehringer Ingellheim Ελλάς A.E., Hy Lạp sản xuất.

2.3. Chuẩn bị dung dịch chuẩn

- Hòa tan chất chuẩn meloxicam trong methanol thu được dung dịch chuẩn gốc có nồng độ meloxicam khoảng 50 µg/ml.

- Chuẩn nội piroxicam có nồng độ chính xác khoảng 25 µg/ml trong methanol.

2.4. Quy trình xử lý mẫu meloxicam trong huyết tương người

Mẫu huyết tương để rã đông ở nhiệt độ phòng. Hút chính xác 1 ml mẫu huyết tương, thêm 50 µl dung dịch chuẩn nội và 250 µl dung dịch acid phosphoric 1M, sau đó thêm 5 ml hỗn hợp dung môi diethylether - cloroform (8 : 2). Lắc, ly tâm 3000 vòng/phút trong 5 phút. Hút lớp dung môi phía trên, bốc hơi ở nhiệt độ 45°C dưới dòng khí nitơ, thu được cặn. Hòa tan cặn trong 0,5 ml pha động, tiêm sắc ký.

2.5. Đường chuẩn và mẫu QC

Từ dung dịch chuẩn làm việc trong methanol, đường chuẩn được chuẩn bị trong huyết tương tại các nồng độ: 0,05; 0,1; 0,2; 0,4; 0,8; 1,25; 2,0; 2,5 µg/ml. Các mẫu được xử lý như mục 2.4. Các mẫu trắng và mẫu trắng có IS được thực hiện cùng mẫu chuẩn.

Tổng số lượng mẫu QC ở ba mức nồng độ LQC, MQC, HQC lần lượt là 0,15; 1,0; 2,05 µg/ml không được ít hơn 10% số mẫu thử người tình nguyện trong một lô phân tích.

2.6. Thẩm định phương pháp

Tiến hành thẩm định theo các hướng dẫn thẩm định phương pháp định lượng thuốc trong dịch sinh học của EMA và US-FDA [2],[5].

2.6.1. Độ đặc hiệu, chọn lọc của phương pháp

Phân tích mẫu huyết tương trắng từ sáu lô khác nhau, mẫu huyết tương tự tạo có meloxicam (0,05 µg/ml) và IS theo phương pháp đã xây dựng, ghi lại sắc ký đồ. Tại thời điểm trùng với thời gian lưu của meloxicam, đáp ứng pic của từng mẫu LLOQ phải gấp ít nhất 5 lần đáp ứng pic của mẫu trắng tương ứng; tại thời điểm trùng với thời gian lưu của IS, đáp ứng pic của từng mẫu LLOQ phải gấp ít nhất 20 lần đáp ứng pic của mẫu trắng tương ứng.

2.6.2. Khoảng tuyến tính và LLOQ

Phân tích các mẫu huyết tương chứa chuẩn meloxicam có nồng độ 0,05; 0,1; 0,2; 0,4; 0,8; 1,25; 2,0; 2,5 µg/ml theo qui trình đã xây dựng. Xác định sự tương quan giữa nồng độ meloxicam (x) có trong mẫu và tỷ lệ diện tích pic meloxicam/IS (y) bằng phương trình hồi quy tuyến tính $y = ax + b$, sử dụng hệ số tỷ trọng ($1/x^2$).

Độ lệch của các điểm đường chuẩn so với giá trị thực của các nồng độ phải không lớn hơn 15%, trừ tại điểm LLOQ được chấp nhận 20%.

2.6.3. Độ đúng và độ lặp lại

Tiến hành thẩm định độ đúng, độ lặp lại trên 4 lô mẫu LLOQ, LQC, MQC và HQC chứa meloxicam có nồng độ tương ứng là 0,05; 0,15; 1,0; 2,05 µg/ml. Mỗi nồng độ QC chuẩn bị 6 mẫu, xác định tỷ lệ % giữa nồng độ xác định được từ đường chuẩn so với nồng độ lý thuyết. Xác định độ lặp lại trong 3 ngày ở mỗi nồng độ QC. Độ lệch của độ đúng và độ lặp lại không được lớn hơn 15%, trừ tại điểm LLOQ được chấp nhận 20%.

2.6.4. Tỷ lệ thu hồi

Xác định tỷ lệ thu hồi meloxicam và IS ở ba khoảng nồng độ LQC, MQC, HQC bằng cách so sánh diện tích pic meloxicam và IS trong các lô mẫu có qua chiết tách và không qua chiết tách (mẫu pha trong nền mẫu), mỗi lô mẫu gồm 6 mẫu độc lập.

2.6.5. Độ ổn định

Độ ổn định được đánh giá ở các điều kiện khác nhau trong quá trình phân tích mẫu. Độ ổn định của dung dịch meloxicam gốc và dung dịch IS gốc ở 2°C - 8°C và ở nhiệt độ phòng. Độ ổn định của dung dịch làm việc ở nhiệt độ phòng. Độ ổn định autosampler; độ ổn định của mẫu huyết tương ở nhiệt độ phòng, ở -35°C ± 5°C, sau 3 chu kỳ đông - rã đông. Tiến hành đánh giá độ ổn định của mẫu huyết tương ở hai mức nồng độ LQC và HQC.

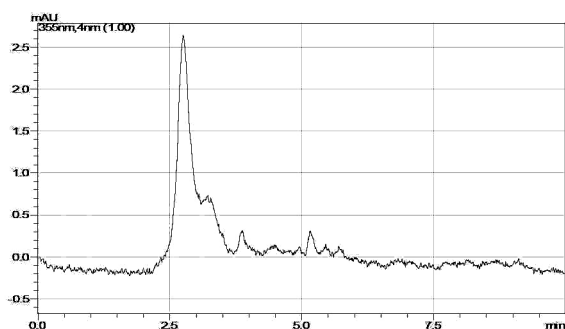
2.7. Ứng dụng phương pháp trong thực hiện đánh giá tương đương sinh học

Chúng tôi đã thực hiện nghiên cứu đánh giá tương đương sinh học trên 24 người tình nguyện khỏe mạnh ở Việt Nam có độ tuổi từ 18 đến 45 với chỉ số BMI từ 18,0 – 30,0 kg/m². Tất cả người tình nguyện phải viết bản cam kết tham gia nghiên cứu sau khi được phổ biến đầy đủ thông tin nghiên cứu, đặc biệt là những tác dụng phụ của thuốc có thể xảy ra. Đề cương nghiên cứu được hội đồng đạo đức phê duyệt phù hợp với công bố Helsinki và SOP nội bộ hiện hành.

Thực hiện nghiên cứu chéo, ngẫu nhiên, đơn liều, hai thuốc, hai trình tự, hai giai đoạn. Mỗi người tình nguyện uống một liều đơn meloxicam 15 mg của thuốc thử hoặc thuốc chứng với 240 ml nước sau khi nhịn đói qua đêm ít nhất 10 giờ. Mẫu máu được lấy tại các thời điểm: 0; 1; 2; 3; 3,5; 4; 4,5; 5; 6; 7; 8; 10; 12; 24; 48; 72 giờ. Mẫu máu sau khi lấy được cho vào ống chứa chất chống đông EDTA, được ly tâm với tốc độ 4000 vòng/phút trong 10 phút. Tách lấy lớp huyết tương và bảo quản ngay ở nhiệt độ -35°C ± 5°C.

2.8. Xác định các thông số dược động học và phân tích thống kê

Phân tích thống kê sử dụng phần mềm WinNonlin.



Hình 1. SKĐ mẫu HT trắng

Trên SKĐ của mẫu HT trắng (Hình 1), tại thời điểm 7,0 và 7,9 phút (trùng với thời gian lưu của IS và MELO trong SKĐ mẫu chuẩn - Hình 2) không xuất hiện các pic. Do vậy, phương pháp phân tích có độ đặc hiệu-chọn lọc với MELO 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 MELO có nồng độ khoảng 0,05 µg/ml đến 2,5 µg/ml theo quy trình đã xây dựng. Xác định sự tương quan giữa nồng độ MELO có trong mẫu và tỷ lệ diện tích pic MELO/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 1.

Diện tích dưới đường cong nồng độ-thời gian được xác định theo mô hình dược động học không ngăn. Để so sánh giá trị C_{max} và AUC, phân tích ANOVA, xác định khoảng tin cậy 90% (CI) cho tỷ lệ thuốc thử so với thuốc chứng, tính trên số liệu đã chuyển logarit, hai thuốc là tương đương sinh học khi giá trị C_{max} và AUC trung bình nằm trong giới hạn 80,00 – 125,00%. Đối với giá trị t_{max}, so sánh theo phương pháp phân tích phi tham số của Wilcoxon.

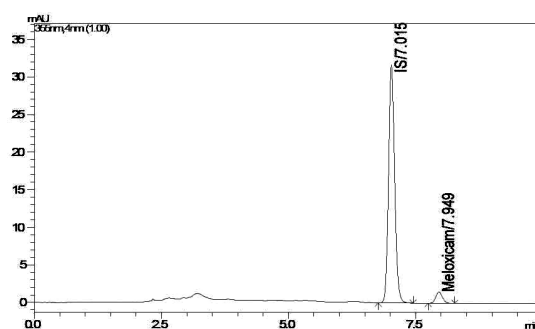
2.9. Đánh giá phương pháp trên mẫu người tình nguyện

Sau khi hoàn thành quá trình phân tích, lựa chọn ngẫu nhiên 7% tổng số lượng mẫu của người tình nguyện tham gia nghiên cứu xung quanh C_{max} và ở pha thải trừ. Phân tích theo qui trình đã ban hành. Tính độ lệch của kết quả phân tích kiểm tra phương pháp với kết quả phân tích cuối cùng được chấp nhận. Phương pháp có độ lặp lại tốt nếu có trên 67% tổng số lượng mẫu được chọn có độ lệch dưới 20% [5].

3. Kết quả và bàn luận

3.1. Độ đặc hiệu - chọn lọc của phương pháp

Phân tích các mẫu huyết tương (HT) trắng, mẫu HT tự tạo chứa chuẩn IS và meloxicam (MELO) nồng độ khoảng 0,05 µg/ml theo phương pháp đã xây dựng và ghi lại sắc ký đồ (SKĐ) - Hình 1 và 2.



Hình 2. SKĐ mẫu HT trắng có IS và MELO nồng độ 0,05 µg/ml

Bảng 1. Kết quả thẩm định khoảng tuyến tính của phương pháp

Mẫu chuẩn Nồng độ (µg/ml)	Độ đúng (%)				
	Đường chuẩn 1	Đường chuẩn 2	Đường chuẩn 3	Đường chuẩn 4	Đường chuẩn 5
0,050	99,1	101,6	101,7	102,7	100,7
0,101	103,9	98,9	98,7	94,6	98,1
0,202	96,2	95,7	96,0	99,6	101,5
0,403	99,9	99,4	98,0	99,2	98,7
0,806	98,0	99,0	100,6	101,5	98,7
1,260	99,7	100,1	101,5	101,3	99,9
2,016	100,1	101,2	101,9	100,3	100,7
2,520	103,1	104,1	101,5	100,8	101,5
Phương trình hồi quy* ($y = a x + b$)	$y = 0,9808 x + 0,0057$	$y = 0,9730 x + 0,0094$	$y = 0,9775 x + 0,0060$	$y = 0,9778 x + 0,0049$	$y = 0,9843 x + 0,0037$
Hệ số tương quan (r)	0,9996	0,9996	0,9997	0,9996	0,9999

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

Kết quả thẩm định cho thấy trong khoảng nồng độ từ 0,05 µg/ml đến 2,5 µg/ml có sự tương quan tuyến tính giữa nồng độ MELO và tỷ lệ diện tích pic MELO/IS với hệ số tương quan xấp xỉ bằng 1. Nồng độ MELO 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 MELO có nồng độ chính xác khoảng 0,05 µg/ml (mẫu LLOQ). Xác định nồng độ MELO 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 2.

Bảng 2. Kết quả xác định giá trị LLOQ của phương pháp

STT	Mẫu trắng	Mẫu chuẩn (0,051 µg/ml)		
	Diện tích pic	Tỷ lệ diện tích pic MELO/IS	Nồng độ MELO tìm thấy (µg/ml)	Độ đúng (%)
1	0	0,050	0,047	94,7
2	0	0,052	0,049	97,2
3	0	0,057	0,054	108,6
4	0	0,053	0,050	100,9
5	0	0,054	0,051	102,7
6	0	0,057	0,054	108,9
Trung bình	0	0,054	0,051	102,2
CV (%)			5,7	5,7
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 MELO trong các mẫu LLOQ. Tỷ lệ giữa nồng độ MELO xác định từ đường chuẩn so với nồng độ lý thuyết có trong các mẫu LLOQ nằm trong khoảng từ 94,7% - 108,9% (trung bình = 102,2% và CV = 5,7%), 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 MELO có nồng độ tương ứng là 0,05 µg/ml; 0,15 µg/ml; 1,0 µg/ml, 2,05 µg/ml. Xác định hàm lượng MELO 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 (giá trị trung bình) được trình bày ở Bảng 3.

Bảng 3. Kết quả thẩm định độ đúng, độ lặp lại trong ngày và khác ngày

Độ đúng, độ lặp lại	LLOQ ($\approx 0,05 \mu\text{g/ml}$)		LQC ($\approx 0,15 \mu\text{g/ml}$)		MQC ($\approx 1,0 \mu\text{g/ml}$)		HQC ($\approx 2,05 \mu\text{g/ml}$)	
	Độ đúng (%)	CV (%)	Độ đúng (%)	CV (%)	Độ đúng (%)	CV (%)	Độ đúng (%)	CV (%)
Trong ngày (n = 6)	102,2	5,7	98,4	2,0	99,2	1,1	99,9	1,1
Khác ngày (n = 3)	97,7	6,7	97,5	3,4	98,9	1,4	101,2	1,8

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 xấp xỉ 100%; độ lặp lại trong ngày và khác ngày với giá trị CV nhỏ hơn 10%.

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

Tiến hành nghiên cứu độ ổn định của MELO trong HT trên các lô mẫu LQC và HQC. Đánh giá độ ổn định của MELO trong HT bằng cách so sánh nồng độ MELO có trong các mẫu được bảo quản và các mẫu có nồng độ tương ứng được phân tích ngay sau khi hòa tan chuẩn MELO vào HT trắng. Kết quả nghiên cứu độ ổn định của MELO được trình bày trong Bảng 4.

Bảng 4. Kết quả nghiên cứu độ ổn định của MELO trong huyết tương

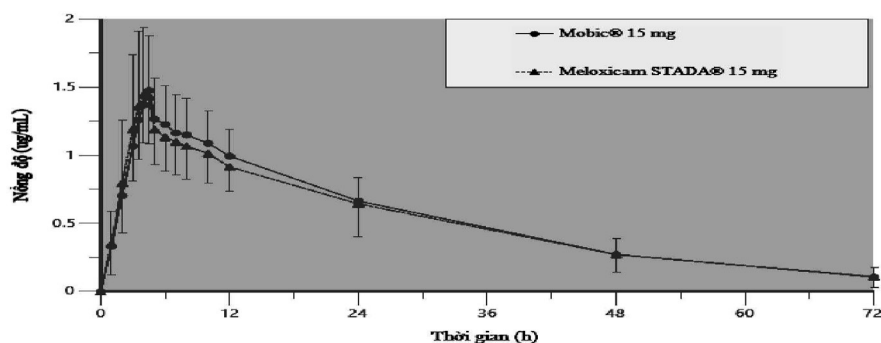
Độ ổn định	Mẫu	Nồng độ ban đầu ($\mu\text{g/ml}$; n = 6)	Nồng độ sau bảo quản ($\mu\text{g/ml}$; n = 6)	% Sai khác
3 chu kỳ đông – rã đông	LQC	0,154	0,141	-8,1
	HQC	1,935	1,886	-2,5
Độ ổn định trong thời gian ngắn (5 giờ; nhiệt độ phòng)	LQC	0,154	0,154	0,4
	HQC	1,935	1,935	-0,01
Độ ổn định trong autosampler (29 giờ; nhiệt độ phòng)	LQC	0,150	0,156	4,2
	HQC	2,109	2,125	0,8
Độ ổn định trong thời gian dài (-35°C $\pm$ 5°C, 149 ngày)	LQC	0,154	0,150	-2,6
	HQC	1,935	2,035	5,1

3.6. Ứng dụng phương pháp trong đánh giá tương đương sinh học

Sau khi phân tích xác định nồng độ của 24 người tình nguyện, tính các thông số dược động học và thống kê của nghiên cứu. Đường cong nồng độ trung bình của MELO trong huyết tương của 24 người tình nguyện được biểu diễn ở Hình 3. Các thông số dược động học được trình bày ở Bảng 5. Kết quả nghiên cứu các thông số dược động học tương tự nghiên cứu đã công bố [3]. So sánh giá trị $C_{\max}$ và AUC, khoảng tin cậy 90% của thuốc thử so với thuốc chứng, tính trên giá trị $C_{\max}$ và AUC trung bình đều nằm trong giới hạn 80,00% – 125,0%. Giá trị $t_{\max}$ của thuốc thử và thuốc chứng khác nhau không có ý nghĩa thống kê khi giá trị tổng xếp hạng dương và giá trị tổng xếp hạng âm đều lớn hơn giá trị tra bảng.

Bảng 5. Thông số dược động học trung bình của 24 người tình nguyện

Thông số	Thuốc thử	Thuốc chứng
$C_{\max}$ ($\mu\text{g/ml}$)	$1,493 \pm 0,348$	$1,571 \pm 0,470$
$t_{\max}$ (giờ)	$4,1 \pm 0,5$	$4,3 \pm 0,6$
$t_{1/2}$ (giờ)	$19,11 \pm 4,95$	$18,45 \pm 3,49$
AUC_{0-t} ($\mu\text{g.giờ/ml}$)	$36,558 \pm 11,488$	$37,665 \pm 10,256$
$AUC_{0-\infty}$ ($\mu\text{g.giờ/ml}$)	$40,268 \pm 13,708$	$41,104 \pm 11,809$



Hình 3. Đường cong nồng độ trung bình của meloxicam trong huyết tương của 24 người tình nguyện

4. Kết luận

Nghiên cứu đã xây dựng được phương pháp định lượng meloxicam trong huyết tương người bằng HPLC với giá trị giới hạn định lượng dưới thấp, khoảng tuyến tính rộng, độ đúng và độ lặp lại cao, phương pháp xử lý mẫu nhanh, đơn giản và thời gian phân tích ngắn. Phương pháp phân tích đã được ứng dụng trong các nghiên cứu đánh giá tương đương sinh học chế phẩm thuốc chứa meloxicam.

Tài liệu tham khảo

1. Bộ Y tế (2015), *Dược thư quốc gia Việt Nam*, nhà xuất bản Khoa học và kỹ thuật.
2. European Medicines Agency, Committee for Medicinal Products for Human Use (2012), *Guideline on Validation of Bioanalytical Methods*.
3. JAAFAR J. I. AL-TAMIMI (2015), “Development and validation of HPLC/UV method for determination of meloxicam in human plasma and application in pharmacokinetic studies”, *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, Vol 7, Issue 1.
4. Mani Ganesh (2013), “Estimation of meloxicam in human plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS)”, *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 36, pp. 867-880.
5. U.S Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (2013), *Guidance for Industry – Bioanalytical Method Validation*.

SUMMARY

A sensitive and selective method using high-performance liquid chromatography (HPLC) to determine the concentration of Meloxicam in human plasma samples was developed and validated. Piroxicam was chosen as the internal standard (IS). The chromatography was performed on a Phenomenex C18 column (250 x 4.6 mm i.d., 5.0 μm) within 10 min, using acetonitrile with pH 3.5 buffer (45:55, v/v) as mobile phase at flow rate of 1.0 ml/min. The linearity range of this method was found to be within the concentration range of 0.05 - 2.5 $\mu\text{g/ml}$ ($r = 0.9996$) for meloxicam in human plasma. The accuracy of this measurement was between 97.5% and 101.2%. The extracted recovery efficiency was from 104.6% to 109.9% at three concentration levels. This method was also successfully applied in pharmacokinetics and bioequivalence studies in Vietnamese volunteers.

(Ngày nhận bài: 12/12/2019 ; Ngày phản biện: 20/01/2020 ; Ngày duyệt đăng: 24/03/2020)

NGHIÊN CỨU XÂY DỰNG QUY TRÌNH ĐỊNH TÍNH ĐỒNG THỜI 9 PARABEN TRONG MỘT SỐ MỸ PHẨM BẰNG PHƯƠNG PHÁP HPLC

THÁI NGUYỄN HÙNG THU

VÕ TRẦN NGỌC HÙNG

LÊ THỊ HƯỜNG HOA,
NGUYỄN THỊ VIỆT ÁI, HOÀNG THANH TÂM

*Trường Đại học
Đuọc Hà Nội*

*Trung tâm Kiểm nghiệm
Thuốc – Mỹ phẩm – Thực phẩm
Quảng Trị*

Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương

Từ khóa: Định tính đồng thời 9 paraben, HPLC, paraben trong mỹ phẩm.

1. Đặt vấn đề

Từ lâu, các dẫn chất của paraben đã được sử dụng làm chất bảo quản, chủ yếu là trong các sản phẩm chăm sóc cá nhân, dược phẩm và thực phẩm, chúng đã từng được coi là một trong những chất bảo quản an toàn. Tuy nhiên, khi liên tục tiếp xúc với nhiều paraben khác nhau ở các nồng độ nhất định, thậm chí ở các nồng độ dưới mức tác dụng có hại, hỗn hợp các chất này cũng có thể gây tác dụng bất lợi tiềm tàng không thể bỏ qua. Nhiều nước đã đưa ra những hạn chế bổ sung, cấm sử dụng một số paraben trong các sản phẩm chăm sóc cá nhân. Theo hướng dẫn về mỹ phẩm của Hiệp hội các quốc gia Đông Nam Á về việc cập nhật quy định đối với các chất dùng trong mỹ phẩm, trong đó có công bố danh sách 5 paraben không được dùng trong mỹ phẩm là isopropylparaben (IPP), isobutylparaben (IBP), phenylparaben (PhP), benzylparaben (BzP) và pentylparaben (PeP) [1]. Từ năm 2015, Việt Nam cũng đã cho ngừng lưu hành các sản phẩm mỹ phẩm chứa 5 loại paraben cấm trên [2]. Một số paraben khác như methylparaben (MP), ethylparaben (EP), propylparaben (PP), butylparaben (BP) vẫn được sử dụng trong mỹ phẩm nhưng có giới hạn cần kiểm soát. Do vậy cần phải xác định paraben được sử dụng trong mẫu phân tích thuộc loại cấm sử dụng hay sử dụng có giới hạn và có hàm lượng vượt quá giới hạn cho phép không.

Trong các nghiên cứu trước đây của chúng tôi đã xây dựng được 2 quy trình phân tích 5 paraben cấm sử dụng trong mỹ phẩm kể trên [3]. Tuy nhiên cần có một quy trình định tính nhằm xác định các paraben có trong mẫu mỹ phẩm để có thể chọn ra quy trình phù hợp, nhằm xác định chính xác hàm lượng của chúng trong mẫu. Nghiên cứu này nhằm giải quyết yêu cầu trên với nhiệm vụ phát hiện một số paraben có thể có trong mẫu mỹ phẩm.

2. Thực nghiệm

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 đã được hiệu chuẩn theo quy định của ISO/IEC 17025 và GLP.

- Máy sắc ký lỏng Shimadzu LC – 2030C 3D;
- Máy sắc ký lỏng Agilent gồm: bơm, detector DAD, module điều khiển, bộ phận loại khí;
- Cân phân tích Mettler Toledo có độ chính xác 0,1 mg;
- Máy lắc siêu âm;
- Dụng cụ thủy tinh: bình định mức, cốc thủy tinh, đĩa thủy tinh, bình cầu, ống đong, phễu lọc,...

2.1.2. Hóa chất, chất chuẩn

2.1.2.1. Các chất đối chiếu

- Isobutylparaben (IBP), lô: 3-SCC-165-1, hàm lượng 98,0%; Pentylparaben (PeP), lô: 10-RCD-146-5, hàm lượng 97,0%; Isopropylparaben (IPP), lô: Lot#2-PLL-65-3, hàm lượng 98,0%; Benzylparaben (BzP), lô: Lot#4-JTN-11-1, hàm lượng 98,0% của Canada;
- Phenylparaben (PhP), lô: Lot#PEJFB-LM, hàm lượng 99,0% của Nhật Bản;
- Ethylparaben (EP), lô: BCBL7531V, hàm lượng 99,9%; Butylparaben (BP), lô: BCBM9217V, hàm lượng 99,1% của Sigma Aldrich;
- Methylparaben (MP), SKS: 0316108.03, hàm lượng 99,64%; Propylparaben (PP), lô: WS.0217138.02, hàm lượng 98,87% của Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương.

2.1.2.2. Dung môi hóa chất

- Acetonitril, ethanol, methanol, ... đạt tiêu chuẩn tinh khiết dùng cho HPLC.

2.2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Đối tượng nghiên cứu

Quy trình phân tích được khảo sát trên các nền mẫu mỹ phẩm là các mẫu đã khảo sát không chứa 9 paraben và được chọn làm mẫu placebo đại diện để xây dựng và thẩm định phương pháp, gồm các mẫu:

- Mẫu dầu rửa mặt, tẩy trang dạng bột 2 trong 1 Naïve (Kracie home products, Ltd., Nhật Bản), lô 7HN7.

- Mẫu nước súc miệng Colgate Plax Peppermint fresh (Thái Lan), lô 7188TH1123.

- Mẫu son dưỡng môi Nivea Strawberry Shine (Thái Lan), lô 63930822.

2.2.2. Phương pháp nghiên cứu

- Khảo sát điều kiện xử lý mẫu: Chọn dung môi và phương pháp chiết sao cho chiết được hoàn toàn chất phân tích từ nền mẫu, loại bỏ tối đa ảnh hưởng của nền mẫu dựa vào: tính tan của chất phân tích, đặc điểm nền mẫu, phương pháp phân tích.

- Khảo sát, xác định điều kiện sắc ký cho phép phân tích đồng thời 9 paraben nghiên cứu.

- Thẩm định phương pháp với quy trình phân tích định tính gồm: đánh giá tính thích hợp của hệ thống sắc ký, độ đặc hiệu, giới hạn phát hiện.

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 các điều kiện phân tích

3.1.1. Khảo sát dung môi pha mẫu

Tham khảo các tài liệu, methanol là dung môi được sử dụng nhiều nhất trong việc chiết xuất paraben từ các nền mẫu [3],[4],[5],[6], và dựa vào kết quả khảo sát thực nghiệm, dung môi pha mẫu được lựa chọn là hỗn hợp ethanol - nước (90 : 10) do hỗn hợp này vừa có khả năng hòa tan tốt các paraben, vừa ít độc hại và hạn chế được sự bay hơi của dung môi pha mẫu nếu chỉ dùng riêng ethanol hoặc methanol.

3.1.2. Khảo sát lựa chọn cột

- Kết quả sắc ký dung dịch chuẩn hỗn hợp 9 paraben nghiên cứu trên cột Thermo C₁₈ (250 × 4,6 mm; 5 μm) với pha động methanol - nước (47 : 53) có 2 pic bị trùng, không tách được BP và BzP nên sắc ký đồ chỉ còn 8 pic.

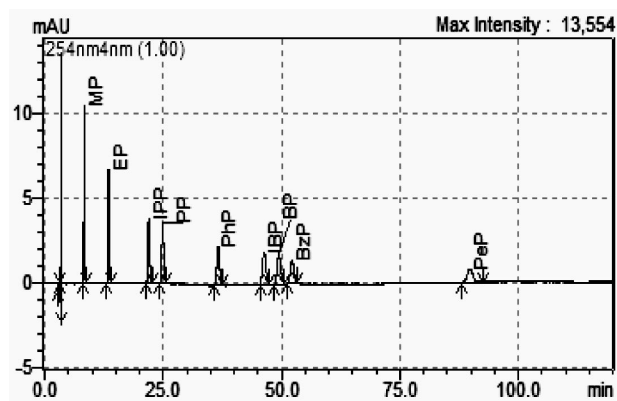
- Kết quả sắc ký trên cột Phenomenex Luna C₁₈ (250 × 4,6 mm; 5 μm), với pha động methanol - nước (47 : 53) hay acetonitril - nước (40 : 60) cả 9 paraben đều được tách ra khỏi nhau. Tuy nhiên pha động methanol - nước (47 : 53) các pic rửa giải chậm, thời gian cho 1 lần sắc ký trên 100 phút, còn với pha động acetonitril - nước (40 : 60) chỉ là 45 phút, 2 pic gần nhau nhất là BP và BzP cũng có R_s = 1,51.

Vì thế cột Phenomenex Luna C18 (250 × 4,6 mm; 5 μm) đã được lựa chọn để xây dựng quy trình định tính đồng thời 9 paraben.

3.1.3. Khảo sát lựa chọn pha động

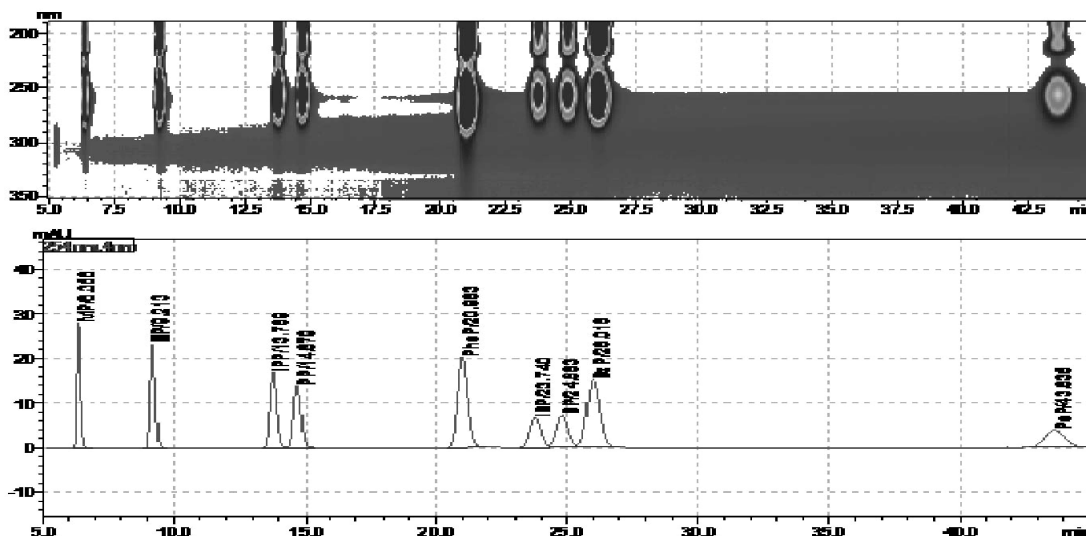
Tiến hành sắc ký dung dịch chuẩn hỗn hợp trên cột Phenomenex Luna C₁₈ (250 × 4,6 mm; 5 μm) với hai pha động methanol - nước và acetonitril - nước ở các tỷ lệ khác nhau. Kết quả cho thấy:

Với pha động methanol - nước, ở tỷ lệ 55 : 45, các pic rửa giải sớm (MP ra trước 5 phút) và giữa 2 pic gần nhau nhất (BP và PhP) có hệ số phân giải thấp R_s = 1,349, dễ có nguy cơ bị bao phủ bởi các chất trong nền mẫu. Ở tỷ lệ 45 : 55, pic rửa giải chậm hơn, hệ số phân giải của 2 pic gần nhau nhất thu được cao hơn (R_s = 1,607), tuy nhiên thời gian phân tích kéo dài hơn 100 phút, pic cuối PeP ra muộn dễ bị tù, độ nhạy giảm. Ở tỷ lệ methanol - nước (50 : 50) đáng pic gọn, đẹp và cân đối, các pic đã tách khỏi nhau (Rs nhỏ nhất là 1,535), thời gian phân tích vẫn dài (khoảng 90 phút). Do đó pha động methanol - nước (50 : 50) có thể được lựa chọn làm pha động. Sắc ký đồ của dung dịch hỗn hợp 9 chuẩn paraben thu được như Hình 1.



Hình 1. Sắc ký đồ của chuẩn hỗn hợp với pha động methanol - nước (50 : 50)

Với pha động acetonitril - nước ở tỷ lệ (35 : 65) thì các paraben tách khỏi nhau hoàn toàn nhưng thời gian phân tích lại kéo dài đáng kể (BzP rửa giải ở 45 phút, PeP rửa giải sau cùng khoảng 60 phút, pic doãng, độ nhạy kém). Ở tỷ lệ 50 : 50, các paraben được rửa giải sớm nhưng một số pic không tách được khỏi nhau (IPP và PP, IBP và BP). Còn ở tỷ lệ 45 : 55 thì chỉ 30 phút là rửa giải hết cả 9 chất, nhưng BzP và BP không tách được khỏi nhau và cùng ra ở thời gian lưu 17 phút nên chỉ còn 8 pic. Với tỷ lệ acetonitril - nước (40 : 60), các paraben được tách rời khỏi nhau hoàn toàn, thời gian phân tích vừa phải (45 phút). Do đó acetonitril - nước (40 : 60) là pha động phù hợp có thể được lựa chọn. Sắc ký đồ của dung dịch hỗn hợp 9 chất chuẩn của các paraben thu được như ở Hình 2.



Hình 2. Sắc kí đồ hỗn hợp các chất chuẩn của 9 paraben trên cột Phenomenex Luna C_{18} với pha động acetonitril - nước (40 : 60).

3.2. Xây dựng quy trình phân tích

Sau khi khảo sát và lựa chọn các điều kiện phân tích, quy trình phân tích được dự kiến 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 khoảng 25 ml dung môi pha mẫu (ethanol - nước = 90 : 10), lắc đều, lắc siêu âm 10 phút. Để nguội, thêm dung môi pha mẫu vừa đủ đến vạch, lắc đều. Lọc qua màng lọc 0,45 μ m.

- **Mẫu sữa rửa mặt:** Cân chính xác khoảng 0,5 g sữa rửa mặt vào cốc có mỏ 50 ml, phân tán mẫu trong khoảng 25 ml dung môi pha mẫu, lắc siêu âm 10 phút, chuyển vào bình định mức 50 ml. Tráng rửa cốc 3 lần, mỗi lần với 5 ml dung môi pha mẫu và chuyển vào bình định mức trên. Thêm dung môi pha mẫu vừa đủ đến vạch, lắc đều. Đun trong cách thủy 60°C trong 5 phút. Để trong nước đá 1 giờ. Sau đó ly tâm lạnh ở 15°C trong 10 phút với tốc độ 10000 vòng/phút, lấy lớp dịch trong phía trên lọc qua màng lọc 0,45 μ m.

- **Mẫu son môi:** Cân chính xác khoảng 0,5 g son vào cốc có mỏ 50 ml, thêm 25 ml dung môi pha mẫu, dùng thìa thủy tinh phân tán đều son trong cốc, 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, mỗi lần với 5 ml dung môi pha mẫu và chuyển vào bình định mức trên. Thêm dung môi pha mẫu vừa đủ đến vạch, lắc đều. Để trong nước đá lạnh 1 giờ. Sau đó, ly tâm lạnh ở 15°C trong 10 phút với tốc độ 10000 vòng/phút, lấy lớp dịch trong phía trên lọc qua màng lọc 0,45 μ m.

3.2.2. Chuẩn bị mẫu chuẩn

- **Chuẩn gốc đơn:** Cân chính xác khoảng 20,0 mg mỗi chất chuẩn paraben (MP, EP, IPP, PP, IBP, BP, PhP, BzP, PeP) vào các bình định mức 100 ml, thêm 70 ml dung môi pha mẫu, lắc cho tan. Thêm dung môi pha mẫu vừa đủ đến vạch, lắc đều.

- **Chuẩn hỗn hợp:** Hút chính xác 2,0 ml mỗi dung dịch chuẩn gốc đơn ở trên vào bình định mức 50 ml, thêm dung môi pha mẫu vừa đủ đến vạch, lắc đều. Lọc qua màng lọc 0,45 μ m.

- **Chuẩn đơn:** Từ dung dịch chuẩn gốc đơn tiến hành pha các chuẩn đơn riêng biệt, lọc qua màng lọc 0,45 μ m để xác định thứ tự rửa giải của các paraben.

3.2.3. Điều kiện sắc ký

- Cột Phenomenex Luna C_{18} (250 $\times$ 4,6 mm; 5 μ m), có sử dụng tiền cột.

- Nhiệt độ cột: 40°C.

- Pha động: Acetonitril - nước (40 : 60) hoặc methanol - nước (50 : 50), điều chỉnh tỷ lệ nếu cần.

- Tốc độ dòng: 1,0 ml/ phút.

- Bước sóng phát hiện: 254 nm.

- Thể tích tiêm: 10 μ l.

- Dung môi pha mẫu: Ethanol – nước (90 : 10).

3.2.4. Cách tiến hành

Tiến hành sắc ký khoảng 50 phút với dung dịch chuẩn hỗn hợp và dung dịch thử. Ghi lại các sắc ký đồ.

Yêu cầu tính thích hợp của hệ thống sắc ký:

- Hệ số phân giải giữa 2 pic gần nhau nhất không được nhỏ hơn 1,5.

- Hệ số bất đối của từng pic không được lớn hơn 1,5.

Cách đánh giá kết quả:

- Dựa vào thời gian lưu: So sánh thời gian lưu của pic thu được từ dung dịch thử và pic thu được từ dung dịch chuẩn.

- 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 chồng phổ của các pic này phải không được nhỏ hơn 0,98.

3.3. Đánh giá quy trình phân tích

3.3.1. Độ thích hợp của hệ thống sắc ký

Tiến hành sắc ký với dung dịch chuẩn hỗn hợp của 9 paraben ở mục 3.2.2.. Kết quả thể hiện ở Bảng 1.

Bảng 1. Kết quả thẩm định độ thích hợp của hệ thống sắc ký

TT	Thời gian lưu (phút)								
	MP	EP	IPP	PP	PhP	IBP	BP	BzP	PeP
1	6,358	9,213	13,769	14,679	20,983	23,740	24,863	26,016	43,635
2	6,362	9,210	13,762	14,688	20,933	23,670	24,812	25,906	43,533
3	6,356	9,203	13,745	14,662	20,900	23,610	24,750	25,814	43,422
4	6,354	9,195	13,738	14,649	20,880	23,580	24,731	25,795	43,381
Trung bình	6,3575	9,2053	13,7535	14,6695	20,9240	23,6500	24,7890	25,8828	43,4928
RSD %	0,05	0,09	0,10	0,12	0,22	0,30	0,24	0,39	0,26
Số đĩa lý thuyết	~11200	~12600	~13700	~13800	~13800	~14500	~14400	~14300	~15000
Hệ số đối xứng	1,26	1,19	1,14	1,12	1,11	1,10	1,08	1,07	1,08
Độ phân giải	-	10,0	11,4	1,9	10,4	3,7	1,53	1,51	15,3

Kết quả đánh giá độ thích hợp của hệ thống sắc ký trên dung dịch chuẩn hỗn hợp của 9 paraben với pha động acetonitril - nước (40 : 60) ở Bảng 1 cho thấy các paraben đã tách khỏi nhau hoàn toàn (hệ số phân giải thấp nhất là 1,51 giữa BP và BzP. Sau 4 lần sắc ký, độ lệch của thời gian lưu và diện tích pic đều rất thấp (RSD lớn nhất của thời gian lưu là 0,39% đối với BzP.

Đánh giá độ thích hợp của hệ thống trên dung dịch chuẩn hỗn hợp 9 paraben với pha động methanol - nước (50 : 50) cũng cho kết quả phù hợp.

3.3.2. Độ đặc hiệu:

Chuẩn bị các dung dịch sau:

- Mẫu trắng: Là dung môi pha mẫu (Ethanol – nước (90 : 10)).

- Dung dịch mẫu nền (placebo): Cân chính xác khoảng 0,5 g mẫu cho mỗi nền mẫu vào cốc có mỏ 50 ml rồi xử lý tương tự như mẫu thử cùng loại được mô tả ở trên.

- Mẫu chuẩn: được chuẩn bị gồm chuẩn gốc đơn, chuẩn hỗn hợp và chuẩn đơn.

- Mẫu tự tạo trên các nền mẫu: Cân riêng biệt chính xác khoảng 0,5 g mẫu đối với mỗi loại mẫu nền vào mỗi bình định mức 50 ml, thêm 2,0 ml dung dịch chuẩn gốc

hỗn hợp ở trên rồi xử lý tương tự với các nền mẫu đã mô tả ở trên để tạo ra 3 loại mẫu tự tạo cho các nền mẫu khác nhau.

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 các pic MP, EP, IPP, PP, IBP, BP, PhP, BzP, PeP thu được từ các dung dịch chuẩn đơn.

- Trên sắc ký đồ của mẫu chuẩn hỗn hợp xuất hiện các pic tương ứng với 9 paraben với thứ tự rửa giải như sau: MP → EP → IPP → PP → PhP → IBP → BP → BzP → PeP.

- Trên sắc ký đồ của các mẫu tự tạo xuất hiện 9 pic chính có thời gian lưu tương ứng với thời gian lưu của 9 pic chính thu được từ sắc ký đồ của dung dịch hỗn hợp và các chuẩn đơn, các pic này tách rõ khỏi nền mẫu và tách khỏi nhau.

3.3.3. Giới hạn phát hiện (LOD)

Tiến hành sắc ký các dung dịch chuẩn ở phân độ đặc hiệu đã được pha loãng dần đến khi sắc ký đồ của dung dịch có nồng độ thấp nhất còn quan sát được pic với tỷ lệ S/N (tín hiệu/nhiều nền) khoảng bằng 3, ở nồng độ này thu được giới hạn phát hiện của các chất. Kết quả giới

hạn phát hiện của phương pháp xác định được với từng paraben như sau:

- Methylparaben (MP): 0,040 µg/ml (tương ứng 4,0 µg/g mỹ phẩm).
- Ethylparaben (EP): 0,041 µg/ml (tương ứng 4,1 µg/g mỹ phẩm).
- Isopropylparaben (IPP): 0,085 µg/ml (tương ứng 8,5 µg/g mỹ phẩm).
- Propylparaben (PP): 0,084 µg/ml (tương ứng 8,4 µg/g mỹ phẩm).
- Isobutylparaben (IBP): 0,127 µg/ml (tương ứng 12,7 µg/g mỹ phẩm).
- Butylparaben (BP): 0,127 µg/ml (tương ứng 12,7 µg/g mỹ phẩm).
- Phenylparaben (PhP): 0,120 µg/ml (tương ứng 12,0 µg/g mỹ phẩm).
- Benzylparaben (BzP): 0,168 µg/ml (tương ứng 16,8 µg/g mỹ phẩm).
- Pentylparaben (PeP): 0,168 µg/ml (tương ứng 16,8 µg/g mỹ phẩm).

Quy trình đã được áp dụng để sàng lọc các paraben trên 59 mẫu mỹ phẩm. Kết quả được đánh giá bằng cách: xem xét độ tinh khiết pic và so sánh phổ DAD của chất nghi ngờ (có cùng thời gian lưu với chất đối chiếu) với phổ của chất đối chiếu, xác định hệ số chồng phổ. Kết quả là không có mẫu nào có paraben bị cấm, có 11 mẫu có propylparaben; 1 mẫu có 2 paraben (PP và BP).

4. Kết luận

Một phương pháp HPLC đơn giản, dễ dàng đã được xây dựng cho phép định tính nhằm phát hiện các paraben có thể có trong một số dạng mỹ phẩm. Phương pháp đã được thẩm định đầy đủ các tiêu chí yêu cầu của một phép thử định tính. Quy trình định tính có xử lý mẫu đơn giản, sử dụng các trang thiết bị cũng như dung môi phổ biến, thời gian phân tích phù hợp. Có thể áp dụng quy trình này để sàng lọc các paraben trong mỹ phẩm trước khi xác định hàm lượng của chúng bằng các quy trình định lượng thích hợp.

Tài liệu tham khảo

1. ASEAN (2003), *Hiệp định hệ thống hòa hợp ASEAN trong quản lý mỹ phẩm*, Bản dịch của Cục Quản lý Dược, 2008.
2. Cục Quản lý Dược Việt Nam, Bộ Y tế (2015), *Công văn số 6577/QLD-MP*, ngày 13/4/2015.
3. Võ Trần Ngọc Hùng, Nguyễn Thị Việt Ái, Lê Thị Hường Hoa, Thái Nguyễn Hùng Thu (2018), “Xây dựng phương pháp phân tích một số paraben bị cấm dùng trong mỹ phẩm”, *Tạp chí Dược học*, 4/2018 (504), 57-62.
4. Guo, Y., Wang, L., Kannan, K. (2014), “Phthalates and parabens in personal care products from China: concentrations and human exposure”, *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 66, 113–119.
5. Liao, C., Chen, L., Kannan, K., (2013), “Occurrence of parabens in foodstuffs from China and its implications for human dietary exposure”, *Environ. Int.* 57–58, 68–74.
6. Liao, C., Kannan, K. (2014), “Concentrations and composition profiles of parabens in currency bills and paper products including sanitary wipes”, *Sci. Total Environ.*, 475, 8–15.

SUMMARY

Development of an HPLC method for identification of 9 parabens in some cosmetic products:

An HPLC method was proposed to identification simultaneous 9 substances of Paraben in cosmetics (methylparaben, ethylparaben, propylparaben, butylparaben, isopropylparaben, phenylparaben, benzylparaben, isobutylparaben and pentylparaben). Parabens are extracted by a mixture of ethanol and water (90:10) to concentration about 8 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 250 x 4.6 mm column that contains 5 µm packing Octadecyl Silane Silicagel, temperature of column was 40°C, mobile phase is a mixture of Acetonitrile and Water (40 : 60) or Methanol and Water (50 : 50), the flow rate about 1.0 ml/minute, the analytical time is 50 minutes, injection volume is 10 µl.

The method was validated on the specificity, LOD, LOQ, and validation results proved that this method was suitable for determination of 05 banned parabens and 04 limited used paraben in cosmetics (cleansing milk, mouthwash and lipstick).

The method was applied to control 59 cosmetic cleansing milk, mouthwash and lipstick samples. The result turned out that there was propylparaben in 11 samples and there were two paraben (propylparaben and butylparaben) in one sample, there were not samples which contained any prohibited substance of 5 above parabens.

(Ngày nhận bài: 15/10/2019 ; Ngày phản biện: 06/01/2020 ; Ngày duyệt đăng: 24/03/2020)

NGHIÊN CỨU CHIẾT XUẤT, PHÂN LẬP VÀ TINH CHẾ 2',4'-DIHYDROXY-6'-METHOXY-3',5'-DIMETHYLCHALCON TỪ NỤ VỎI LÀM CHẤT CHUẨN

PHƯƠNG THIÊN THƯƠNG

*Viện Khoa học và Công nghệ
Việt Nam - Hàn Quốc (VKIST)*

NGUYỄN THỊ PHƯƠNG THẢO,

GIẢN THỊ LAN, LÊ THỊ THU

Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương

Từ khóa: Vối (*Cleistocalyx operculatus*), 2',4'-dihydroxy-6'-methoxy-3',5'-dimethylchalcon, phân lập và tinh chế, chất chuẩn.

1. Đặt vấn đề

Cây Vối [*Cleistocalyx operculatus* (Roxb.) Merr. et Perry] thuộc họ Sim – Myrtaceae được coi là một vị thuốc quý. Lá Vối và nụ Vối được nhân dân sử dụng với cách chế biến đơn giản tạo thành loại trà nấu hay hãm lấy nước uống hàng ngày vừa có tác dụng thanh nhiệt vừa có tác dụng kiện tỳ, tiêu thực, hạ đường huyết [1]. Về tác dụng sinh học, Vối có tác dụng chống viêm, chống oxy hóa, chống ung thư, kháng bệnh Alzheimer's, kháng virus, làm giảm đường huyết [2],[5]. Hợp chất là 2',4'-dihydroxy-6'-methoxy-3',5'-dimethylchalcon (ký hiệu là **CO1**) đã được chứng minh là thành phần chính của Vối nụ (hàm lượng 1,32 - 1,86%) và Vối lá (0,43 - 0,47%) [2]. **CO1** cũng đã được chứng minh có tác dụng chống viêm [5], phục hồi tế bào gan bị tổn thương [7], hạ đường huyết [4], ức chế sự phát triển của tế bào ung thư [9] nên phù hợp với các tác dụng kể trên và công dụng thanh nhiệt, chống viêm, hạ đường huyết của dược liệu Vối nụ trong Dược điển Việt Nam V [1].

Nụ Vối và lá Vối được dùng trong dân gian, trong y học cổ truyền và đến nay đã có nhiều sản phẩm trà được sản xuất từ dược liệu này. Vối lá và Vối nụ đã được đưa vào Dược điển Việt Nam [1] nhưng chưa thấy có trong các Dược điển các nước khác. Theo Dược điển Việt Nam V, Vối lá và Vối nụ được định tính bằng phương pháp hóa học và phương pháp sắc ký lớp mỏng (so sánh với dược liệu đối chiếu), định lượng bằng xác định chất chiết trong dược liệu bằng phương pháp chiết nóng với ethanol. Tuy nhiên, Dược điển Việt Nam chưa quy định sử dụng chất đánh dấu để định tính và định lượng [1].

Theo hướng dẫn của Tổ chức Y tế Thế giới (WHO) [8] về "Lựa chọn chất đánh dấu có nguồn gốc dược liệu trong kiểm nghiệm dược liệu và thuốc có nguồn gốc từ dược liệu", ngoài yêu cầu chung đối với chất đánh dấu thì lựa chọn chất đánh dấu có nguồn gốc dược liệu cho phép thử định tính, định lượng dược liệu và thuốc có nguồn gốc dược liệu tuân theo nguyên tắc ưu tiên sau:

(1) Lựa chọn thành phần mà tác dụng điều trị đã được xác định.

(2) Trường hợp chưa xác định được thành phần như đã nêu ở mục (1), lựa chọn thành phần có các tác dụng được lý đã được thừa nhận.

(3) Trường hợp chưa xác định được thành phần như đã nêu ở mục (1) và mục (2), lựa chọn chất đánh dấu là thành phần hóa học đặc trưng cho loài dược liệu đó, hoặc đặc trưng cho chi dược liệu đó, hoặc đặc trưng cho họ dược liệu đó.

Các nghiên cứu trước đã chỉ ra rằng hợp chất 2',4'-dihydroxy-6'-methoxy-3',5'-dimethylchalcon là thành phần chính trong Vối nụ và Vối lá và có các tác dụng sinh học được chấp nhận, vì vậy, **CO1** có thể được lựa chọn là chất đánh dấu dùng trong định tính, định lượng Vối (nụ và lá). Bài báo này trình bày sự phân lập, tinh chế hợp chất **CO1** từ nụ Vối đạt độ tinh khiết để làm chất đánh dấu trong kiểm nghiệm dược liệu.

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 yêu cầu của ISO/IEC 17025 và GLP), Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam, và Viện Dược liệu gồm:

- Máy HPLC SHIMADZU 20A;
- Máy HPLC điều chế SHIMADZU LC-20AP;
- Cân phân tích METTLER TOLEDO XPE-26;
- Cân kỹ thuật SARTORIUS CP 323S;
- Tủ bảo quản lạnh PANASONIC;
- Máy lắc siêu âm ELMASONIC S180H;
- Cột sắc ký Gemini NX- RP 18 (250 x 4,6 mm, 5 μ m);
- Máy cộng hưởng từ hạt nhân NMR-BRUKER-500MHz;
- Máy sắc ký lỏng khối phổ Agilent 1100 LC/MS Ion-Trap;
- Nồi cách thủy, bộ cất quay chân không BÜCHI V-850; Tủ hút, bộ lọc dung môi cỡ màng lọc 0,45 μ m, bộ dụng cụ sinh hàn, pipet chính xác,...

2.1.2. Hóa chất, dung môi

n-Hexan, ethyl acetat, toluen, và acid formic (PA; Merck); methanol (HPLC; Merck); acetonitril (HPLC; Merck); ethanol 96% (PA; Việt Nam); silica gel (63 - 200 μm; Merck).

2.2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Đối tượng nghiên cứu

Nụ Vôi (*Flos Cleistocalyx operculati*) được thu hái ở Thanh Hóa vào tháng 5 năm 2019, sấy trong tủ sấy ở nhiệt độ 35 - 40°C đến khối lượng không đổi.

2.2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.2.1. Chiết xuất, phân lập, tinh chế

- Mẫu thử được chiết bằng cách ngâm lạnh trong ethanol 96%, cô cạn dung môi, thu được cao. Phần cao

thu được hòa trong nước thành hỗn dịch rồi phân đoạn các hợp chất bằng các dung môi theo độ phân cực tăng dần (*n*-hexan, ethyl acetat). Hợp chất được phân lập bằng sắc ký cột (silica gel) và kết tinh trong hệ dung môi rửa giải. Tinh chế hợp chất kết tinh bằng sắc ký lỏng điều chế (HPLC điều chế). Độ tinh khiết của hợp chất được kiểm tra bằng sắc ký lớp mỏng (TLC) và sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC).

- Xác định cấu trúc hóa học: phân tích dữ liệu từ các phổ tử ngoại (UV), hồng ngoại (IR), cộng hưởng từ hạt nhân (NMR), khối (MS), kết hợp so sánh các dữ liệu trong tài liệu tham khảo để khẳng định cấu trúc hóa học của chất tinh chế.

2.2.2.2. Phân tích 2',4'-dihydroxy-6'-methoxy-3',5'-dimethylchalcon được sử dụng trong quá trình phân lập, tinh chế bằng HPLC

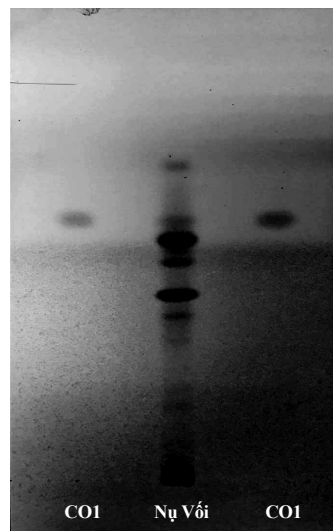
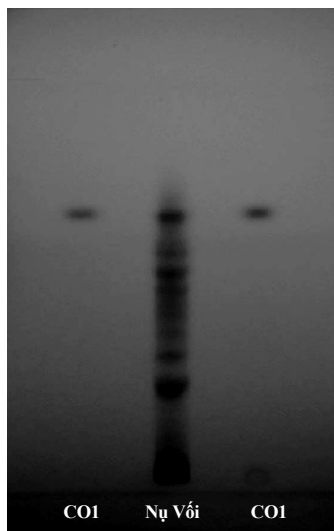
Điều kiện sắc ký lớp mỏng (SKLM)[1]	Điều kiện sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) [3]																
- Bản mỏng silica gel 60 GF 254 (Merck). - Hệ dung môi: Toluene – ethyl acetat – acid formic (6 : 4 : 1). - Phát hiện vết: + Quan sát dưới ánh sáng tử ngoại 254 nm. + Phun dung dịch H₂SO₄ 10% trong ethanol, sấy ở 100°C trong 15 phút.	- Cột sắc ký Gemini NX - RP 18, 5 μm (25 cm x 4,6 mm). - Detector diode array với bước sóng phát hiện 220 nm. - Pha động: + Pha A: Methanol + Pha B: Nước + Pha C: Acetonitril + Chương trình dung môi: <table><tr><th>Thời gian (phút)</th><th>Pha A (% tt/tt)</th><th>Pha B (% tt/tt)</th><th>Pha C (% tt/tt)</th></tr><tr><td>0</td><td>40</td><td>50</td><td>10</td></tr><tr><td>40</td><td>80</td><td>10</td><td>10</td></tr><tr><td>60</td><td>40</td><td>50</td><td>10</td></tr></table> - Tốc độ dòng: 1,0 ml/phút - Thể tích tiêm: 50 μl	Thời gian (phút)	Pha A (% tt/tt)	Pha B (% tt/tt)	Pha C (% tt/tt)	0	40	50	10	40	80	10	10	60	40	50	10
Thời gian (phút)	Pha A (% tt/tt)	Pha B (% tt/tt)	Pha C (% tt/tt)														
0	40	50	10														
40	80	10	10														
60	40	50	10														

3. Kết quả và bàn luận

Qua khảo sát cho thấy nụ Vôi có rất nhiều thành phần hóa học (Hình 1). Nhóm nghiên cứu đã xây dựng được quy trình chiết xuất, phân lập và tinh chế chất 2',4'-dihydroxy-6'-methoxy-3',5'-dimethylchalcon như sau: 10 kg nụ Vôi được ngâm trong ethanol 96% ở nhiệt độ phòng (3 lần, mỗi lần trong 4 ngày). Lọc lấy phần dịch chiết ethanol, cất thu hồi dung môi ở 60°C. Cắn thu được đem hòa trong nước thành hỗn dịch rồi lắc với *n*-hexan với tỷ lệ 1 : 1 (thể tích/thể tích, 3 lần), sau đó lắc tiếp hỗn dịch với ethyl acetat cũng với tỷ lệ 1 : 1 (thể tích/thể tích, 3 lần). Phân đoạn ethyl acetat được cất thu hồi dung môi ở 60°C đến khô. Cắn thu được hòa tan trong methanol và cho qua cột silica gel pha thường, rửa giải với hệ dung môi *n*-Hexan – ethyl acetat (8 : 1; 4 : 1). Kiểm tra dịch rửa giải bằng sắc ký lớp mỏng để xác định các hợp chất, gộp các bình chứa có các chất có cùng vị trí trên sắc ký đồ, cất thu hồi dung môi ở 60°C thu được các

sản phẩm cắn. Hợp chất 2',4'-dihydroxy-6'-methoxy-3',5'-dimethylchalcon là thành phần chính trong nụ Vôi nên có trong cắn thu được có khối lượng lớn nhất (20,7 g), được ký hiệu là **CO1** (hiệu suất chiết suất, phân lập khoảng 0,02%).

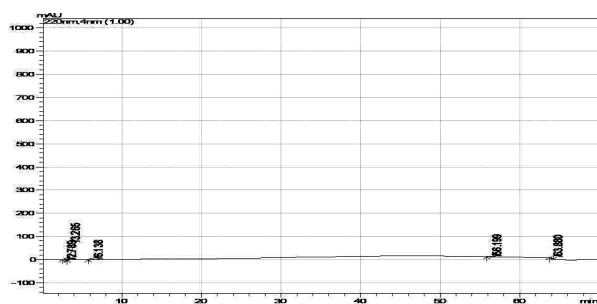
Kiểm tra sơ bộ sự có mặt của các tạp trong phân đoạn CO1 bằng phương pháp sắc ký lớp mỏng. Kết quả thu được như Hình 1. Sắc ký đồ của phân đoạn CO1 cho một vết chính (*R_f* ≈ 0,66) tương ứng vết đậm nhất trên sắc ký đồ của được liệu nụ Vôi. Xác định sơ bộ hàm lượng hợp chất 2',4'-dihydroxy-6'-methoxy-3',5'-dimethylchalcon trong cắn phân đoạn CO1 bằng HPLC, so sánh diện tích pic chính với tổng diện tích các pic trên sắc ký đồ cho kết quả hàm lượng hợp chất 2',4'-dihydroxy-6'-methoxy-3',5'-dimethylchalcon trong phân đoạn CO1 là 86%, đáp ứng yêu cầu làm nguyên liệu để tiếp tục tinh chế sản xuất chất chuẩn (Hình 2).



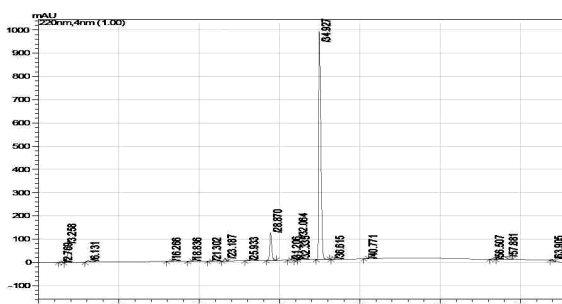
Quan sát dưới đèn UV 254 nm

Phun dung dịch H_2SO_4 10% trong ethanol

Hình 1. Sắc ký lớp mỏng của phân đoạn **CO1** và của nụ **Vối**



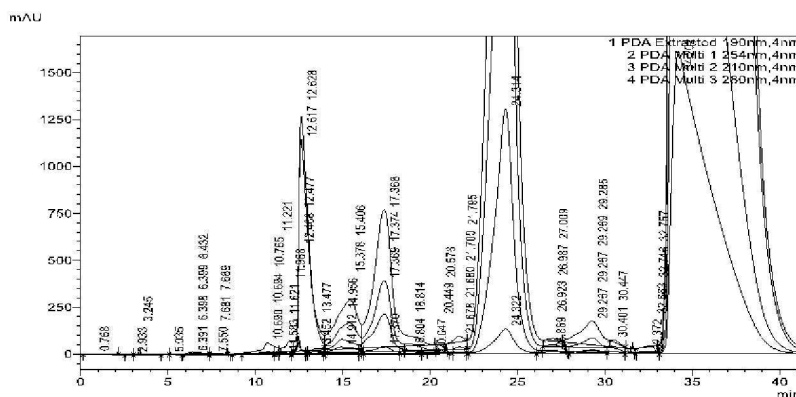
A



B

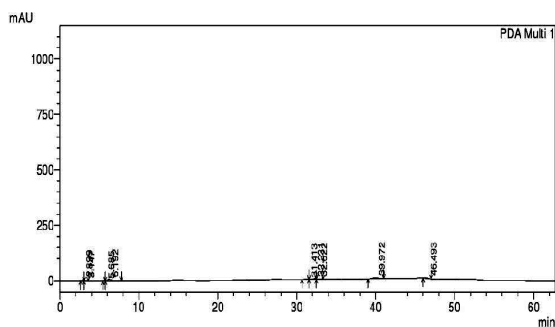
Hình 2. Sắc ký đồ HPLC. A: mẫu trắng; B: mẫu phân đoạn **CO1**

Tinh chế hợp chất trong phân đoạn **CO1** (1 g) bằng sắc ký lỏng điều chế, cột Shimadzu Shim-pack VX-ODS (10) $250 \times 20,0$ mm, dung môi rửa giải acetonitril – nước (7 : 3), tốc độ dòng 5 ml/phút; thời gian lưu khoảng 35 phút (Hình 3). Thu được chất **CO1** ở dạng tinh thể màu vàng (0,5 g), hiệu suất tinh chế khoảng 50%.

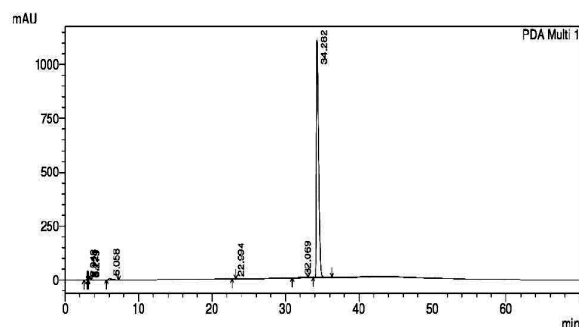


Hình 3. Sắc ký đồ HPLC điều chế phân lập chất **CO1** (thời gian lưu ~ 35 phút)

Hàm lượng của hợp chất 2',4'-dihydroxy-6'-methoxy-3',5'-dimethylchalcon (**CO1**) thu được sau khi tinh chế được xác định sơ bộ bằng HPLC, so sánh diện tích pic chính với tổng diện tích các pic trên sắc ký đồ, kết quả thu được hàm lượng hợp chất **CO1** là 99,9% (Hình 4).



A



B

Hình 4. Sắc ký đồ HPLC của chất **CO1**. A: mẫu trắng. B: chất **CO1**

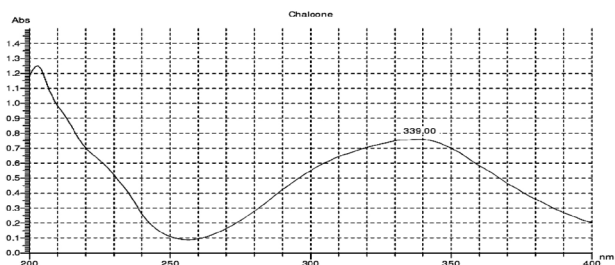
Các dữ liệu hóa lý của chất **CO1** (2',4'-dihydroxy-6'-methoxy-3',5'-dimethylchalcon): Tinh thể màu vàng; nhiệt độ nóng chảy 126 - 128°C; UV $\lambda_{\max}$ (methanol): 203, 339 nm ($\log \epsilon = 23.314,6 \text{ l mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$); EI-MS m/z : 298,9 $[\text{M}+\text{H}]^+$ và 296,9 $[\text{M}-\text{H}]^-$; $^1\text{H-NMR}$ (dimethyl sulfoxid, 500 MHz) và $^{13}\text{C-NMR}$ (dimethyl sulfoxid, 125 MHz): xem Bảng 1.

Bảng 1. Dữ liệu phổ $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz) và $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz) của chất **CO1**

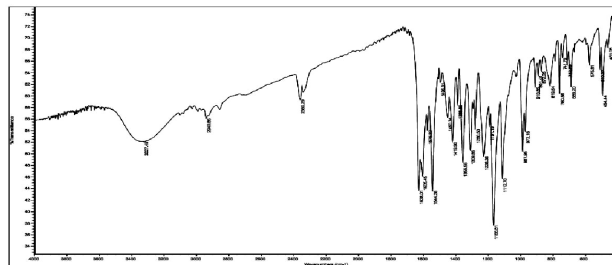
Vị trí	Chất CO1 (đo trong dimethyl sulfoxid)			2',4'-dihydroxy-6'-methoxy-3',5'- dimethylchalcon (đo trong CDCl_3) [6]
	δ_{C} (ppm)	δ_{H} (ppm), (độ bội, $J = \text{Hz}$)	HMBC (C $\rightarrow$ H)	δ_{C} (ppm)
1	134,8	-	7,94; 7,46	134,9
2	128,3	7,73 (dd, $J = 8,0; 1,5$)	7,77; 7,73; 7,45	127,9
3	129,0	7,46 (m)	7,45	128,4
4	130,3	7,45 (m)	7,73	129,7
5	129,0	7,46 (m)	7,45	128,4
6	128,3	7,73 (dd, $J = 8,0; 1,5$)	7,77; 7,73; 7,45	127,9
C=O	192,4	-	7,94; 7,77	192,9
α	126,5	7,94 (d, $J = 15,5$)	7,77	126,2
β	142,3	7,77 (d, $J = 15,5$)	7,94; 7,73	142,4
1'	107,8	-		108,6
2'	161,2	-	13,60;	161,6
3'	107,1	-	2,02	106,1
4'	161,1	-	2,07; 2,02	158,7
5'	110,1	-	2,07	108,4
6'	158,2	-	3,61; 2,07	158,4
3'-CH ₃	8,2	2,02 (s)		7,1
5'-CH ₃	8,9	2,07 (s)		7,7
OCH ₃	61,8	3,61 (s)		61,9
2'-OH		13,60 (s)		

s: single; d: double; dd: double of doublet; m: multiplet.

Phổ UV của chất **CO1** (nồng độ 0,01 mg/ml trong methanol ở khoảng bước sóng từ 200 – 400 nm cho 2 cực đại hấp thụ ($\lambda_{\max}$) ở bước sóng 203 và 339 nm (Hình 5).

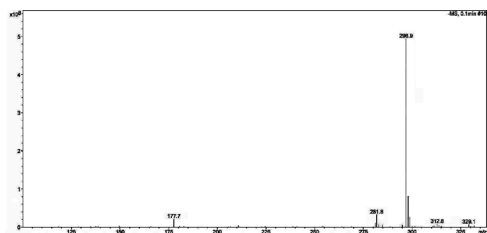


Hình 5. Phổ UV của dung dịch căn **CO1** nồng độ 0,01 mg/ml trong methanol



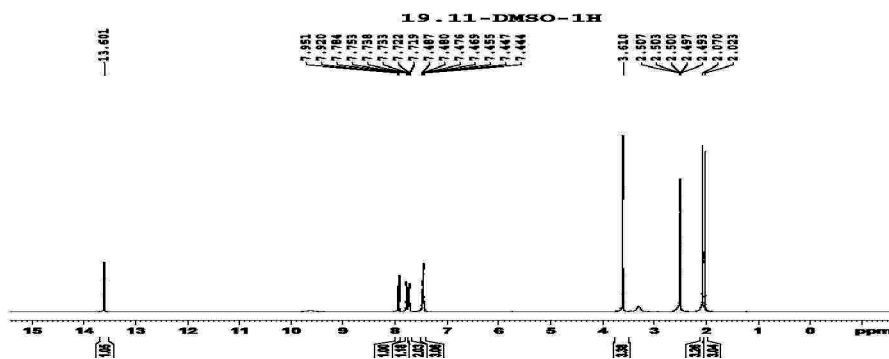
Hình 6. Phổ hồng ngoại của căn **CO1**

Phổ hồng ngoại (Hình 6) có các đỉnh hấp thụ ở $\nu_{\max} = 3327 \text{ cm}^{-1}$ (đặc trưng cho dao động hóa trị của nhóm OH), $\nu_{\max} = 2940 \text{ cm}^{-1}$ (C-H), $\nu_{\max} = 1628 \text{ cm}^{-1}$ (C=O), $\nu_{\max} = 1544 \text{ cm}^{-1}$ (C=C), và $\nu_{\max} = 1166 \text{ cm}^{-1}$ (C-O). Như vậy, trong công thức của **CO1** có các nhóm –OH, C-O, C=O và C=C.

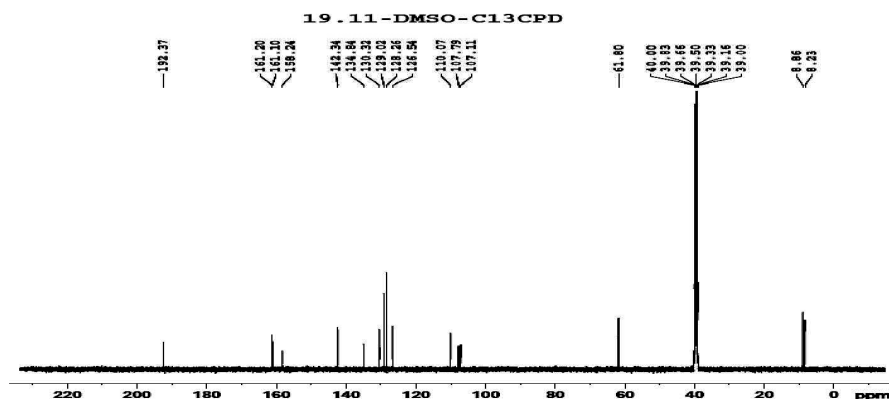


Hình 7. Phổ MS của căn **CO1**

Phổ ESI-MS (Hình 7) của **CO1** có pic ion $m/z = 298,9$ $[M+H]^+$ và $296,9$ $[M-H]^-$ cho biết khối lượng phân tử của chất **CO1** là 298.



Hình 8. Phổ ^1H -NMR của căn **CO1**

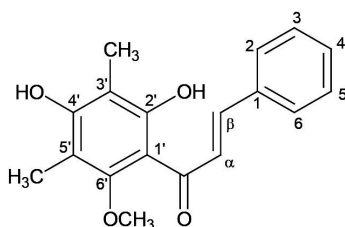


Hình 9. Phổ ^{13}C -NMR của căn **CO1**

Phổ $^1\text{H-NMR}$ (DMSO, 500MHz; Hình 8): có độ dịch chuyển ppm: Có 2 pic methyl (CH_3 , $\delta_{\text{H}} = 2,023$, s, và $\delta_{\text{H}} 2,070$, s), 1 pic methoxy (OCH_3 , $\delta_{\text{H}} 3,61$, s), một nhóm gồm 5 proton thuộc vòng thơm $\delta_{\text{H}} 7,444 - 7,487$ và $7,719 - 7,784$. Điều này khẳng định chất thu được có vòng thơm. Hai proton có độ dịch chuyển $\delta_{\text{H}} 7,92$ (d) và $\delta_{\text{H}} 7,95$ (d) có hằng số tương tác J lớn (15,5 Hz), chứng tỏ chúng có cấu hình *trans*.

Phổ $^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO, 125MHz; Hình 9) có tất cả 18 tín hiệu cho biết chất thu được có 18 nguyên tử C. Các tín hiệu cho biết có hai nhóm methyl (CH_3) có độ dịch chuyển $\delta_{\text{C}} 8,2$ và $8,9$ ppm, vì độ dịch chuyển của hai nhóm xuất hiện ở trường cao độ nên nó phải được gắn vào vòng thơm. Một nhóm methoxy (OCH_3) có $\delta_{\text{C}} 61,8$ ppm, cũng gắn vào vòng thơm. Phổ $^{13}\text{C-NMR}$ cũng cho biết có 14 tín hiệu carbon của vòng thơm hoặc liên kết đôi có độ dịch chuyển từ $\delta_{\text{C}} 107,1$ đến $161,2$ ppm, và một nhóm keton ($\text{C}=\text{O}$) có độ dịch chuyển $\delta_{\text{C}} 192,4$ ppm.

Kết hợp số liệu các phổ UV, IR, $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$ và tham khảo các tài liệu cho thấy chất **CO1** có vòng thơm, có nhóm $\text{C}=\text{O}$, nhóm OH, nhóm OCH_3 . Có 18 carbon, nhưng có 3 carbon được gắn vào vòng thơm chứng tỏ chất thu được có khung gồm 15 carbon, do đó **CO1** là một flavonoid. Trên phổ $^1\text{H-NMR}$ có 2 proton có cấu hình *trans*, và phổ $^{13}\text{C-NMR}$ cho biết có một nhóm $\text{C}=\text{O}$ có độ dịch chuyển ở trường thấp nên chúng tôi đi đến kết luận chất thu được là một flavonoid thuộc nhóm chalcon. Kết hợp các tài liệu tham khảo [6] và các dữ kiện phổ thu được chúng tôi kết luận chất **CO1** là 2',4'-dihydroxy-6'-methoxy-3',5'-dimethylchalcon, có công thức phân tử là $\text{C}_{18}\text{H}_{18}\text{O}_4$ và khối lượng phân tử 298 amu. Công thức cấu tạo của chất thu được như sau:



4. Kết luận

Nhóm nghiên cứu đã chiết xuất, phân lập và tinh chế được hợp chất 2',4'-dihydroxy-6'-methoxy-3',5'-dimethylchalcon (**CO1**) với hàm lượng 99,9% (tính theo diện tích pic HPLC) từ nụ Vối. Vì **CO1** là hợp chất chính trong nụ và lá Vối nên có thể sử dụng hợp chất phân lập được làm chất chuẩn trong việc xây dựng tiêu chuẩn và kiểm nghiệm dược liệu Vối.

Tài liệu tham khảo

1. Bộ Y tế (2017), *Dược điển Việt Nam V*, NXB Y học, Hà Nội. Tập 2, tr. 1371-1374.
2. Phương Thiện Thương, Nguyễn Thị Hà Ly, Nguyễn Thị Phương, Nguyễn Thị Bích Thu. *Lựa chọn chất đối chiếu trong kiểm nghiệm chất lượng Dược liệu và sản phẩm từ Dược liệu: Một số đóng góp từ nghiên cứu khoa học tại Hội thảo nâng cao năng lực nghiên cứu, kiểm tra giám sát chất lượng dược liệu và thuốc từ dược liệu trong thời kỳ hội nhập* (2018), Đà Nẵng, Viện Kiểm nghiệm thuốc Thành phố Hồ Chí Minh.
3. C-L Ye, Y-H Lu, X-D Li, and D-Z Wei (2005), HPLC analysis of a bioactive chalcone and triterpene in the buds of *Cleistocalyx operculatus*. *South African Journal of Botany* 71: pp. 312-315.
4. JW Choi, Kim M, Song H, Lee CS, Oh WK, Mook-Jung I, Chung SS, Park KS (2016), DMC (2',4'-dihydroxy-6'-methoxy-3',5'-dimethylchalcone) improves glucose tolerance as a potent AMPK activator. *Metabolism*, 65(4): pp. 533-542.
5. Liu WJ (2018), A new aurone with anti-inflammatory activity from *Cleistocalyx operculatus* flower buds. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi*, 43(7): pp. 1467-1470.
6. Salem Manar M., Karl A. Werbovetz* (2005), Antiprotozoal Compounds from *Psoralea polydenia*. *Natural Product Sciences*, 68: pp 108-111.
7. WG Yu, Qian J, Lu YH. (2011), Hepato protective effects of 2',4'-dihydroxy-6'-methoxy-3',5'-dimethylchalcone on CCl₄-induced acute liver injury in mice. *Journal of agricultural and food chemistry*, 59: pp. 12821-12829.
8. WHO Expert Committee on Specifications for Pharmaceutical Preparations (2017), WHO guidelines for selecting marker substances of herbal origin for quality control of herbal medicines, Vol. 1003, Report No. 51, pp. 72-85, W.H. Organization

9. Ye Chun-Lin, Jian-Wen Liu, Dong-Zhi Wei, Yan-Hua Lu, Feng Qian (2005), In vivo antitumor activity by 2',4'-dihydroxy-6'-methoxy-3',5'-dimethylchalcone in a solid human carcinoma xenograft model, *Cancer Chemother Pharmacol*, 56: pp. 70-74.

SUMMARY

Phytochemical study on the ethanol extract of the buds of *Cleistocalyx operculatus* led to the isolation and purification of a compound **CO1**. The structure of this compound was identified as 2',4'-dihydroxy-6'-methoxy-3',5''-dimethylchalcone by means of physicochemical (colour, mp) and spectroscopical methods (UV, IR, NMR, MS). The purity of the isolated compound **CO1** was determined to be 99.9% by HPLC (observed according to the peak area). Since 2',4'-dihydroxy-6'-methoxy-3',5''-dimethylchalcone has been known as the major and bioactive compound of the plant material, it is strongly suggested that the **CO1** could be used as a reference standard for qualitative and quantitative evaluation of the herbs *Cleistocalyx operculatus*.

(Ngày nhận bài: 30/10/2019 ; Ngày phản biện: 04/03/2020 ; Ngày duyệt đăng: 24/03/2020)

PHÂN BIỆT HAI DƯỢC LIỆU HAY BỊ NHẦM LẤN LÀ HUYẾT ĐẰNG (*CAULIS SARGENTODOXAE*) VÀ KÊ HUYẾT ĐẰNG (*CAULIS SPATHOLOBI*)

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

Từ khóa: *Huyết đằng, Kê huyết đằng, soi bột, sắc ký lớp mỏng.*

1. Đặt vấn đề

Hàng năm nước ta tiêu thụ khoảng 50 - 60 nghìn tấn các loại dược liệu khác nhau, sử dụng vào việc chế biến vị thuốc y học cổ truyền, trong khi đó Việt Nam mới chỉ tự cung cấp được một phần nhỏ nguyên liệu dược liệu để phục vụ cho việc sản xuất thuốc trong nước, còn lại chủ yếu phụ thuộc vào nguồn nhập khẩu, phần lớn được nhập từ Trung Quốc.

Với lượng lớn Dược liệu nhập vào nước ta như vậy thì vấn đề quản lý chất lượng dược liệu để đảm bảo tính an toàn và hiệu quả cho người bệnh, luôn là câu hỏi đặt ra cho Ngành. Dược liệu lưu thông trên thị trường không rõ nguồn gốc, kém chất lượng, dược liệu dễ bị nhầm lẫn, dược liệu giả mạo còn phổ biến.

Qua tham khảo các tài liệu [1],[3],[4],[5],[6],[7]. Sau đây chúng tôi xin giới thiệu một số kết quả phân tích bằng phương pháp mô tả cảm quan, soi bột và sắc ký lớp mỏng nhằm phân biệt 2 dược liệu Huyết đằng và Kê huyết đằng.

Huyết đằng, Hồng đằng, Dây máu – *Sargentodoxa cuneata* (Oliv.) Rehd. Et Wils., thuộc họ Huyết đằng (Sargentodoxaceae) [2].

Kê huyết đằng – *Spatholobus suberectus* Dunn, thuộc họ Đậu (Fabaceae).

2. Thực nghiệm

2.1. Thiết bị, hóa chất

- Kính hiển vi MBL 2000 – T – PL – 30W;
- Máy ảnh kỹ thuật số Sony 16.1;

- Các hóa chất, dung môi: acid formic, acid hydrochloric, natri hydroxyd, acetone, cloroform, ethanol, ether, methanol, ... đạt tinh khiết phân tích;

- Các dụng cụ thủy tinh cần thiết.

Chuẩn dược liệu:

- Dược liệu chuẩn Kê huyết đằng của Viện Kiểm nghiệm Thuốc Thành phố Hồ Chí Minh;

- Dược liệu chuẩn Huyết đằng của Trung tâm Kiểm nghiệm Dược phẩm – Mỹ phẩm Bình Định.

2.2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Đối tượng nghiên cứu

Dược liệu Kê huyết đằng và Huyết đằng được lấy mẫu trên thị trường;

2.2.2. Phương pháp nghiên cứu

Sử dụng các kỹ thuật phân tích sau để phân biệt dược liệu Huyết đằng và dược liệu Kê huyết đằng:

- Quan sát hình thái dược liệu đã thái lát;
- Soi bột dược liệu dưới kính hiển vi [3],[5];
- Phương pháp sắc ký lớp mỏng (SKLM).

3. Kết quả và bàn luận

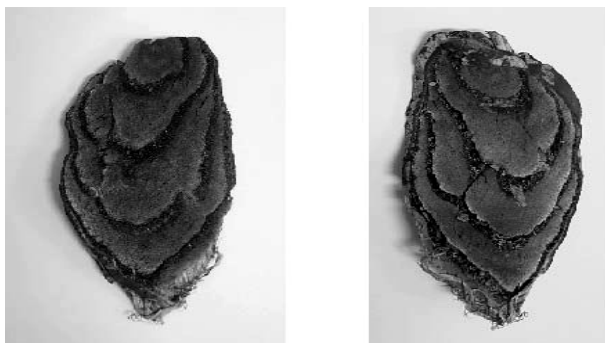
3.1. Hình thái dược liệu thái lát

Về cảm quan cho thấy hình thái của mẫu dược liệu Huyết đằng và dược liệu Kê huyết đằng, tuy nhiên qua phân tích chi tiết chúng tôi thấy có một số đặc điểm khác biệt như (Hình 1).

Dược liệu Huyết đằng



Dược liệu Kê huyết đằng



Miếng dược liệu hình bầu dục không đều, dày 0,3 - 0,8 cm. Mép (bên) màu nâu hơi xám, có khi thấy vết đốm màu trắng hơi xám. Bề mặt (chỗ mất lớp bên) màu nâu hơi đỏ hoặc nâu, lộ ra nhiều lỗ mạch, có nhiều vân xếp thành hình bánh xe. Texture chất thô, giòn và dễ bể gãy [4],[6],[7].

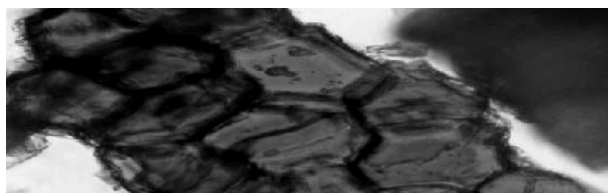
Miếng dược liệu hình bầu dục không đều thái chéo, dày 0,5 - 1 cm. Mép (bên) màu nâu thẫm, có nhiều xơ. Bề mặt (chỗ mất lớp bên) màu nâu vàng, lộ ra nhiều lỗ mạch, có nhiều vòng vân, lệch tâm, phần tùy lệch về một bên, màu nâu đen, ở giữa phần có lõi tròn. Texture chất cứng dai, khó bẻ.

Hình 1. Hình ảnh miếng thái lát của hai dược liệu

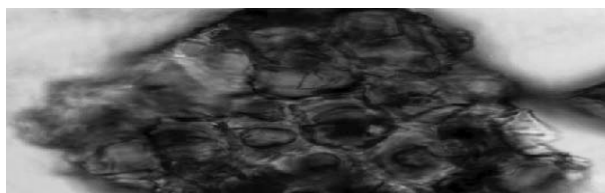
3.2 Bột dược liệu

Nghiền dược liệu thành bột mịn, quan sát dưới kính hiển vi (Hình 2).

Dược liệu Huyết đằng



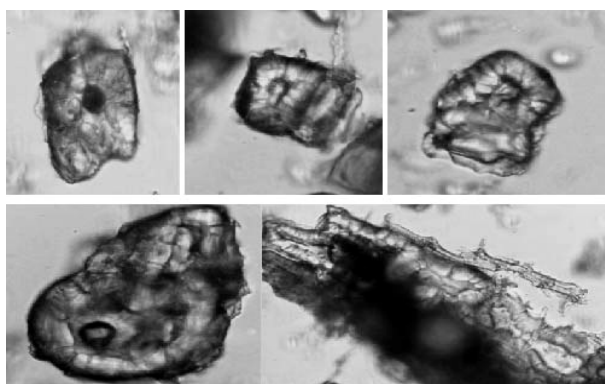
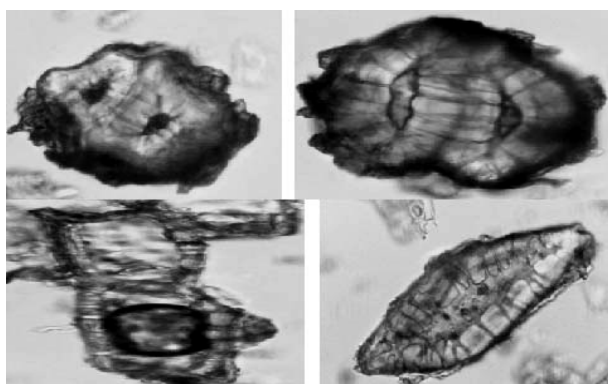
Dược liệu Kê huyết đằng



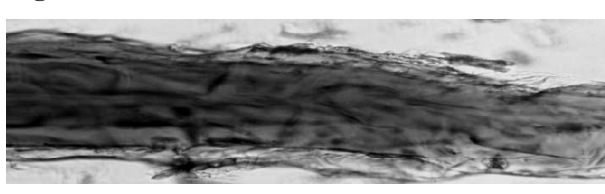
Mảnh bản gồm tế bào hình đa giác màu đỏ nâu thành dãy.

Mảnh bản gồm tế bào hình nhiều cạnh màu đỏ vàng.

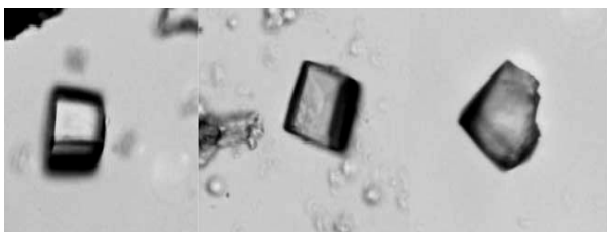
Mảnh bản



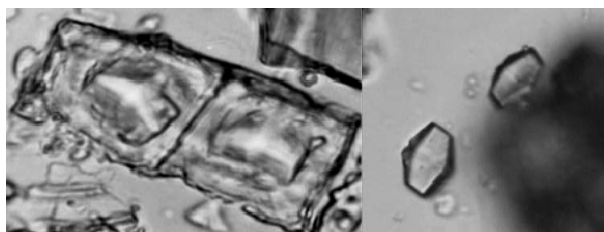
Tế bào cương mô



Túi chất tiết màu đỏ

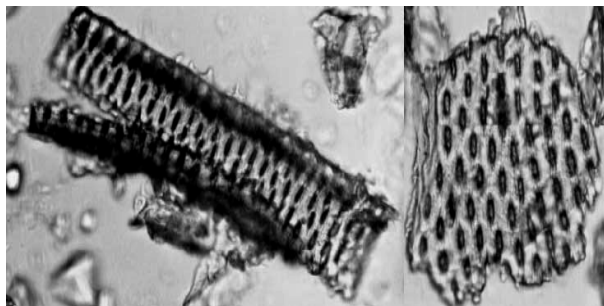
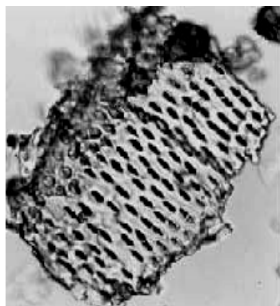
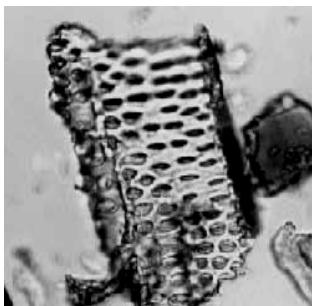


Tinh thể calci oxalat hình lăng trụ nằm rải rác

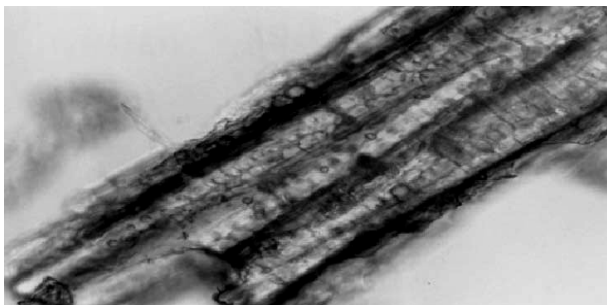


Tinh thể calci oxalat hình lăng trụ trong tế bào cương mô hoặc nằm rải rác ở ngoài.

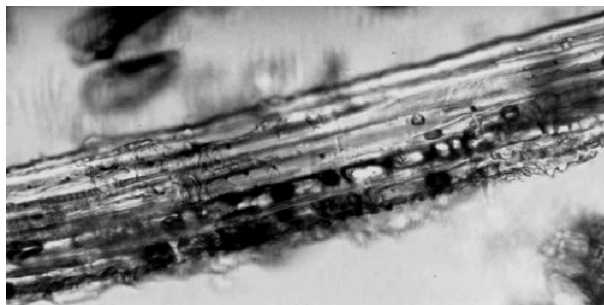
Tinh thể calci oxalat hình lăng trụ



Mạch điểm

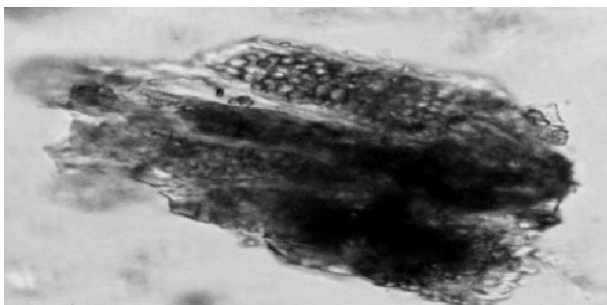


Sợi gỗ màng dày, khoang rộng

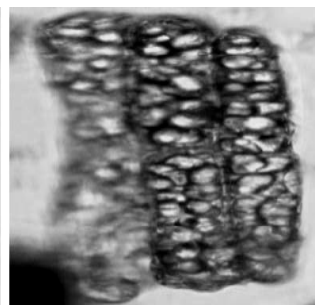
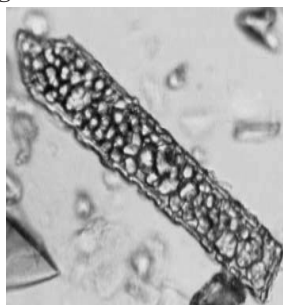


Sợi gỗ dài khoang hẹp

Sợi gỗ



Tế bào màng hơi dày chứa hạt tinh bột



Hình 2. Hình ảnh soi bột dược liệu

3.3. Sắc ký lớp mỏng (SKLM)

Tiến hành SKLM so sánh dược liệu chuẩn huyết đằng và dược liệu huyết đằng lấy mẫu trên thị trường, dược liệu chuẩn Kê huyết đằng và dược liệu Kê huyết đằng lấy mẫu trên thị trường.

3.3.1. Dược liệu Huyết đằng

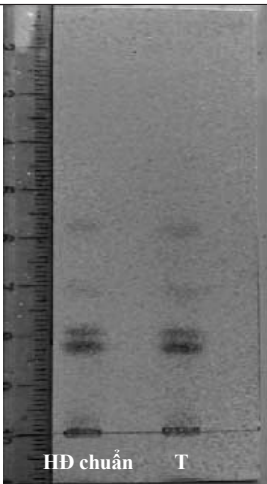
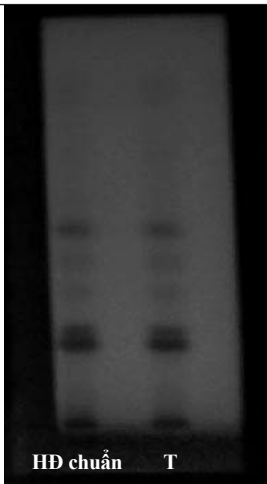
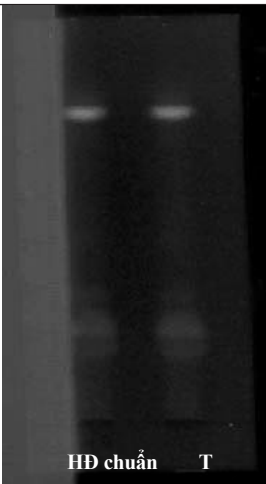
Phương pháp SKLM định tính dược liệu Huyết đằng tham khảo theo CP 2010 được tiến hành như sau:

- *Bản mỏng*: Silicagel 60 F₂₅₄.
- *Dung môi khai triển*: Cloroform - aceton - acid formic (8 : 1 : 0,8)
- *Dung dịch thử*: Lấy 5 g bột dược liệu Huyết đằng, thêm 50 ml methanol, lắc siêu âm trong 30 phút, lọc, bay hơi dịch lọc cho đến khô, hòa tan cần với 10 ml dung dịch natri hydroxyd 2% điều chỉnh pH 2,0 bằng acid hydrocloric, chiết với 10 ml ether, tiến hành 3 lần, gom dịch chiết ether, thu hồi dung môi ether, hòa tan cần với 2 ml methanol làm dung dịch thử chấm sắc ký.

- *Dung dịch đối chiếu*: Tiến hành như mô tả ở phần dung dịch thử với dược liệu chuẩn Huyết đằng.

- *Cách tiến hành*: Chấm riêng biệt lên bản mỏng 2 μ l mỗi dung dịch đối chiếu và dung dịch thử, triển khai sắc ký trong pha động đến khi dung môi đi được khoảng từ 8 – 10 cm, lấy bản mỏng ra, để khô ngoài không khí ở nhiệt độ phòng. Quan sát bản mỏng dưới ánh sáng tử ngoại (UV) ở bước sóng 366 nm và 254 nm, phun dung dịch FeCl₃ 2% trong ethanol, để khô bản mỏng trong 5 phút, quan sát bản mỏng dưới ánh sáng thường, kết quả thể hiện ở Hình 3.

Yêu cầu: Trên sắc ký đồ (SKĐ) của dung dịch thử phải có các vết cùng màu, cùng giá trị R_f so với các vết trên sắc ký đồ của dung dịch đối chiếu.

<i>Thuốc thử</i> <i>Hệ dung môi</i>	<i>Phun dung dịch FeCl₃ 2% trong ethanol</i>	<i>Quan sát/ UV 254 nm</i>	<i>Quan sát/ UV 366 nm</i>
Cloroform - aceton - acid formic (8 : 1 : 0,8)			

Hình 3. Hình ảnh SKĐ của dược liệu chuẩn Huyết đằng và dược liệu Huyết đằng mua trên thị trường

3.3.2. Dược liệu Kê huyết đằng

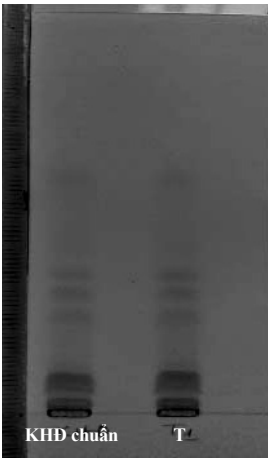
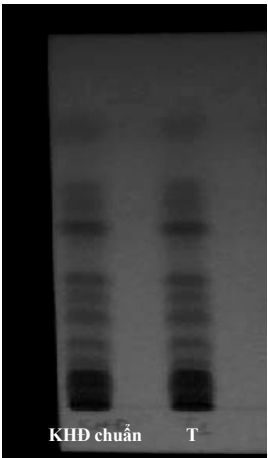
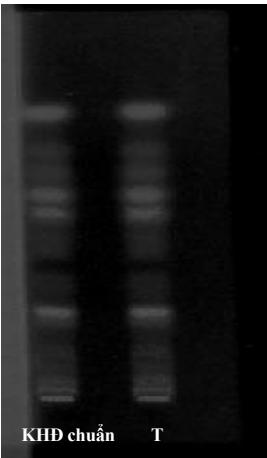
Phương pháp SKLM định tính dược liệu Kê huyết đằng tham khảo theo CP 2010 được tiến hành như sau:

- *Bản mỏng*: Silica gel 60 F₂₅₄
- *Dung môi khai triển*: Cloroform - methanol (20 : 1)
- *Dung dịch thử*: Lấy 1 g bột dược liệu Kê huyết đằng thêm 100 ml ethanol, đun hồi lưu trong 1 h, lọc, bay hơi dịch lọc đến khô, hòa tan cần với 2 ml methanol, thêm 1 g silica gel khuấy đều, đuổi hết dung môi, chuyển lên trên một cột có đường kính trong là 1,0 cm (chứa 2 g silica gel, kích thước hạt từ 75 μ m đến 150 μ m). Đầu tiên rửa giải bằng 30 ml ether dầu hỏa (60⁰C đến 90⁰C)(TT), sau đó rửa giải với 40 ml hỗn hợp methanol và cloroform (1 : 9), bay hơi đến cần khô, hòa tan cần trong 0,5 ml cloroform làm dung dịch thử chấm sắc ký.

- *Dung dịch đối chiếu*: Tiến hành như mô tả ở phần dung dịch thử với dược liệu chuẩn Kê huyết đằng.

- *Cách tiến hành*: Chấm riêng biệt lên bản mỏng 5 μ l mỗi dung dịch đối chiếu và dung dịch thử, triển khai sắc ký trong pha động đến khi dung môi đi được khoảng từ 8 – 10 cm, lấy bản mỏng ra, để khô ngoài không khí ở nhiệt độ phòng. Quan sát bản mỏng dưới ánh sáng tử ngoại (UV) ở bước sóng 366 nm và 254 nm, phun dung dịch FeCl₃ 2% trong ethanol, để khô bản mỏng trong 5 phút, quan sát bản mỏng dưới ánh sáng thường, kết quả thể hiện ở Hình 4.

Yêu cầu: Trên sắc ký đồ (SKĐ) của dung dịch thử phải có các vết cùng màu, cùng giá trị R_f so với các vết trên sắc ký đồ của dung dịch đối chiếu.

Thuốc thử Hệ dung môi	Phun dung dịch $FeCl_3$ 2% trong ethanol	Quan sát/ UV 254 nm	Quan sát/ UV 366 nm
Cloroform - methanol (20 : 1)			

Hình 4. Hình ảnh SKD của dược liệu chuẩn Kê huyết đằng và dược liệu Kê huyết đằng mua trên thị trường

4. Kết Luận

Qua kết quả thực nghiệm trên ta có thể thấy với quan sát cảm quan về hình thái dược liệu thái lát, soi bột dược liệu, tiến hành định tính bằng phương pháp sắc ký lớp mỏng tham khảo theo CP 2010, chúng ta đã nhận ra các đặc điểm khác nhau giữa dược liệu Huyết đằng và dược liệu Kê huyết đằng.

Tài liệu tham khảo

1. Bộ Y tế (2017), *Dược điển Việt Nam*, lần xuất bản thứ năm, Nhà xuất bản Y học, trang 1211, PL-283.
2. Võ Văn Chi (2011), *Từ điển cây thuốc Việt Nam*, Nhà xuất bản Y học, tập 1, trang 1166, 1168.
3. Phạm Thị Kim, Đinh Lê Hoa, Phạm Hồng Tâm, *Kiểm nghiệm Dược liệu*, Tập 3, Nhà xuất bản Y học, trang 74.
4. *Chinese Herbal Medicines*, Volume 11, Issue 1, January 2019, pages 52-59.
5. *Hong Kong Chinese Materia Medica Standards*, Department of Health, The Government of Hong Kong Special Administrative Region.
6. *Pharmacopoeia of the People's Republic of China* (2010), Volume 1, p.390, p.421.
7. Spectral Matching Algorithm Applied to Identify the Terahertz Spectrum of *Caulis Spatholobi* and *Caulis Sargentodoxae*.

SUMMARY

This study investigated descriptive characteristics, microscopic and TLC method according to the Chinese Pharmacopoeia reference (2010) between Caulis Sargentodoxae, Caulis Spatholobi collected in market and reference medicinal herbs are Caulis Sargentodoxae, Caulis Spatholobi. The results showed that two herbs exerted similarly microscopic properties. However, analysis on description and TLC method showed obvious differences between the two herbs. These will contribute to distinguishing Caulis Sargentodoxae from Caulis Spatholobi and avoid mistaking us on the herb market.

(Ngày nhận bài: 26/08/2019 ; Ngày phản biện: 24/12/2019 ; Ngày duyệt đăng: 24/03/2020)

THÔNG TIN KHOA HỌC - TIN TỨC

TIN TÁI BẢN VÀ ĐÍNH CHÍNH DƯỢC ĐIỂN VIỆT NAM V

Sau khi Dược điển Việt Nam V (ĐDVN V) được ban hành và áp dụng, Hội đồng Dược điển Việt Nam đã đưa ra thông báo đính chính lần thứ nhất vào tháng 8/2018. Từ đó đến nay, Hội đồng tiếp tục nhận được góp ý phản hồi từ người sử dụng và trong quá trình rà soát Dược điển, các chuyên gia của Hội đồng cũng đã phát hiện thêm một số lỗi. Hội đồng đã phối hợp với Nhà xuất bản Y học sửa chữa các lỗi và in ĐDVN V lần tái bản thứ 2.

Như vậy các đơn vị, cá nhân sử dụng bản in ĐĐVN V lần tái bản thứ 2 sẽ không cần bản đính chính nữa. Tuy nhiên, ĐĐVN V in lần đầu và lần tái bản thứ nhất cần phải được sử dụng kèm theo Đính chính Dược điển Việt Nam V lần 2.

Hội đồng Dược điển Việt Nam xin kính gửi đến người sử dụng ĐĐVN V bản Đính chính Dược điển Việt nam V lần 2 là tập hợp các nội dung đính chính lần đầu và các nội dung đính chính mới.

Đính chính Dược điển Việt Nam V lần 2

Trang	Cột	Dòng	Đã in	Sửa lại
xvi		15 ↑	Bản bổ sung Dược điển Việt Nam V	Bản bổ sung Dược điển Việt Nam IV
xvi		10 ↑	quản ký	quản lý
16	1	19↑	Pha loãng 1 ml dung dịch thử (1)	Pha loãng 1 ml dung dịch (1)
24	1	26↓	Tạp chất H: (2R)-2-	Tạp chất H: Methyl (2R)-2-
30	2	2↓, 6↓, 10↓, 19↓, 23↓	2,86 %	1,06%
31	2	26, 27↓	Dung dịch chứa 0,5 mg/ml <i>acid 4-aminobenzoic (TT)</i> và 2,0 mg/ml	Dung dịch chứa 0,5 µg/ml <i>acid 4-aminobenzoic (TT)</i> và 2,0 µg/ml
41	1	17,18↑ 20↑	chế phẩm	căn
55	1	22↓	Pha loãng dung dịch (1) thành 200 lần	Pha loãng dung dịch thử 200 lần
75	1	1↑	<i>ceton</i>	<i>keton</i>
83	1	4↑	Phụ lục 5.13	Phụ lục 6.4
144	2	1↑	tính theo chế phẩm khan	tính theo chế phẩm đã làm khô
156	2	9 ↑	Không ít hơn 75 %	Không ít hơn 75 % (Q)
157	1	1↓	dung dịch thử (1)	dung dịch thử
162	2	13↓	ethanol	ethanol 96 %
166	1	6↑	0,5 ml	5,0 ml
251	1	2↓	phương pháp B	phương pháp 2
252	2	21↑	20 mg/ml	20 µg/ml
264	2	12, 13 ↑	ở hai bước sóng cực đại	ở bước sóng cực đại
		9 ↑	hiệu số độ hấp thụ ở 2 bước sóng cực đại	hiệu số độ hấp thụ ở hai bước sóng
281	1	16, 17↓	<i>Mất chữ do in</i>	<i>dung dịch natri pentansulfonat monohydrat 0,096 % (TT)</i> đã được điều chỉnh đến pH 2,5 bằng <i>acid phosphoric (TT)</i> .
377	1	13↑, 15↑	dung dịch (1)	dung dịch thử (1)
378	2	20↓, 22↓	dung dịch (1)	dung dịch thử (1)
427	1	3↓	1,0 g	0,25 g
430	1	9 ↓	Thêm 200 ml <i>acetonitril (TT)</i> và trộn đều.	Thêm 300 ml <i>acetonitril (TT)</i> và trộn đều.
431	1	14 ↑	Thêm 200 ml <i>acetonitril (TT)</i> và trộn đều.	Thêm 300 ml <i>acetonitril (TT)</i> và trộn đều.
439	1	5↓	<i>acid hydrochloric 10,3 %</i>	<i>acid hydrochloric 1 M</i>
467	2	22↑	Acid stearic: 90,0 % đến 99,0 %	Acid stearic: 80,0 % đến 99,0 %
531	1	19 ↓	45 h	45 min
555	1	3,4↓ và 23,34↓	(0,5 phần triệu hay 0,5 mg/ml)(sửa cả ở 4 ô trong bảng 1)	(0,5 phần triệu hay 0,5 mg/l)
557	2	2↑	pic tạp chất A	pic lansoprazol
619	1	2↓	<i>Mentholum</i>	<i>Levomentholum</i>
631	1	3↓	đậy chặt ngay nắp lọ.	đậy chặt ngay nắp lọ, cân lọ.
672	2	14↑	AlPO ₄ .H ₂ O	AlPO ₄ .xH ₂ O
678	1	25,26↓	dung dịch (1)	dung dịch thử
680	1	6↓	Dung dịch nifedipin	Dung dịch nifedipin chuẩn
714	2	19↓	Phụ lục 9.1	Phụ lục 9.2
716	1	16↓	đã làm khô	khan
	2	8↑, 13↑, 26↑, 32↑	đã làm khô	khan
723	2	23↑	dung dịch đối chiếu (1)	dung dịch đối chiếu
769	2	20↓	Phụ lục 9.1	Phụ lục 9.2

770	1	27↑	(1)	(2)
781	1	16↑	Phụ lục 9.1	Phụ lục 9.2
819	2	23 ↑	Quinin bisulfat.	Quinin hydroclorid.
820	2	6 ↓	bisulfat".	hydroclorid".
823	2	5 ↑	bisulfat".	hydroclorid".
839	2	20↑	100,0 %	110,0 %
855	1	9↑, 24↑	Phụ lục 4.4	Phụ lục 5.4
923	1	20↓	0,2 g <i>natri sulfit</i>	0,1 g <i>natri sulfit khan</i>
934	2	20↑	4,6 cm	4,6 mm
945	2	24↑	Phụ lục 5.3	Phụ lục 5.4
946	1	13↑	1 M	0,5 M
		2↑	3 bình định mức	3 bình định mức dung tích 50 ml
967	2	2↓	0,32 mm	0,53 mm
1078	2	2↓	2 cm đến 5 cm	2 mm đến 5 mm
1088	1	24↓	Phụ lục 9.7	Phụ lục 9.8
1112	2	8↑	<i>Cortex Terminaliae nigrovenulosae</i>	<i>Cortex Terminaliae nigrovenulosae</i>
1136	1	25↓	dung dịch sắt (III) clorid (TT)	dung dịch sắt (III) clorid 5 % (TT)
1139	2	5↓	<i>Gymnema sylvestris</i>	<i>Gymnema sylvestris</i>
1144	1	4 ↓	mắt rây 3,15 mm	mắt rây 0,355 mm
1151	1	6↓	30 ml	3 ml
1159	2	17,18↓	thêm 10 ml <i>methanol</i> (TT), đun hồi lưu,	thêm 100 ml <i>methanol</i> (TT), đun hồi lưu 1 h,
1179	1	8↑	(7,5 : 2,5 : 4 giọt)	(7,5 : 2,5 : 0,2)
1182	2	19↓	(TT), xuất hiện màu đỏ tía	(TT), đun nóng nhẹ, xuất hiện màu đỏ tía
1184	1	24↑	HOÀNG BÁ (Vỏ thân)	HOÀNG BÁ (Vỏ thân, vỏ cành)
1189	1	23↓, 25↓	ethanol 96 %	ethanol 70 %
1220	1	17, 18 ↓	đường kính 2 cm đến 0,5 cm	đường kính 0,2 cm đến 0,5 cm
1221	1	1↑	dung dịch acid hydrocloric 10 % (TT)	acid hydrocloric (TT)
1223	1	21↑	8,5 %	11,0 %
1242	1	24 ↑	Thêm 25 ml <i>nước bão hòa n-butanol</i>	Thêm 25 ml <i>n-butanol bão hòa nước</i>
1264	2	10, 11↑	Trên sắc ký đồ, dung dịch thử phải có các vết (3 vết) cùng màu sắc và giá trị R_f với 3 vết của curcumin chuẩn	Trên sắc ký đồ, dung dịch thử phải có vết cùng màu sắc và giá trị R_f với vết của curcumin chuẩn
1301	2	6, 7, 8 ↓	Không ít hơn 20,0 % tính theo dược liệu khô kiệt. Tiến hành theo phương pháp chiết nóng (Phụ lục 12.10). Dùng <i>ethanol</i> (TT) làm dung môi.	Không dưới 20,0 % chất chiết được trong <i>nước</i> và không dưới 10 % chất chiết được trong <i>ethanol</i> (TT) tính theo dược liệu khô kiệt. Tiến hành theo phương pháp chiết nóng (Phụ lục 12.10).
1322	2	12 ↑	<i>Herba Loranthi Gracifolii</i>	<i>Herba Loranthi paracitici</i>
1382	2	10↑	đến 5 cm,	đến 35 cm,
1383	2	14,15↓	Tro toàn phần Không quá 4,6 % (Phụ lục 9.8).	Tro toàn phần (Phụ lục 9.8) Không quá 8,0% đối với Thủy xương bồ và không quá 10,0% đối với Thạch xương bồ.
1398	2	2↑, 8↑, 30↑, 32↑, 38↑,	dung dịch kali hydroxyd 0,5 N (CĐ)	dung dịch kali hydroxyd 0,5 N trong <i>ethanol</i> (CĐ)
P-33		Hình dưới – góc trái	Ethambutol	Fexofenadin
PL-183	2	12↑	phương pháp 1	phương pháp 2
PL-225	2	23↑	Pha loãng 1,0 ml	Pha loãng 10 ml thành 100 ml bằng nước. Pha loãng 1,0 ml
PL-236	1	22↑	dioxin	dioxan
PL-248	2	22,23↑	dài không quá 2,5 cm	dài từ 2,5 cm trở lên
PL-258	1	14↑	pH 4,8	pH 5,8
PL-272	2	6↓	g	8
		9↓	8	9
PL-300	1	9 ↑	Phép thử này không áp dụng được đối với chế phẩm thuốc có thành phần chính là vi sinh vật sống	Bỏ câu này

MỤC LỤC

Trang

● Quản lý - Trao đổi nghiệp vụ - Định hướng công tác kiểm tra và giám sát chất lượng thuốc năm 2020. PGS. TS. ĐOÀN CAO SƠN – VIỆN TRƯỞNG VIỆN KIỂM NGHIỆM THUỐC TRUNG ƯƠNG	1
● Nghiên cứu khoa học - Xây dựng và thẩm định quy trình định tính, định lượng nguyên liệu Nystose bằng phương pháp HPLC. BẠCH THỊ THẨM, NGUYỄN TUẤN ANH, TRẦN THỊ THU TRANG, PHẠM VĂN KIẾN, HỨA THỊ THU HUYỀN, TRẦN VIỆT HÙNG, ĐOÀN CAO SƠN - Xây dựng phương pháp HPLC để định lượng Meloxicam trong huyết tương người và ứng dụng trong đánh giá tương đương sinh học. TẠ MẠNH HÙNG, PHAN THỊ NGHĨA, NGUYỄN THỊ CHÂM, LÊ THỊ KIM ANH, NGUYỄN VĂN BẠCH, ĐOÀN CAO SƠN - Nghiên cứu xây dựng quy trình định tính đồng thời 9 Paraben trong một số mỹ phẩm bằng phương pháp HPLC. LÊ THỊ HUỖNG HOA, NGUYỄN THỊ VIỆT ÁI, HOÀNG THANH TÂM, VÕ TRẦN NGỌC HÙNG, THÁI NGUYỄN HÙNG THU - Nghiên cứu chiết xuất, phân lập và tinh chế 2',4'-Dihydroxy-6'-methoxy-3',5'-dimethylchalcon từ nụ Vôi làm chất chuẩn. NGUYỄN THỊ PHƯƠNG THẢO, GIẢN THỊ LAN, LÊ THỊ THU, PHƯƠNG THIÊN THƯƠNG - Phân biệt hai dược liệu hay bị nhầm lẫn là Huyết đằng (<i>Caulis Sargentodoxae</i>) và Kê huyết đằng (<i>Caulis Spatholobi</i>). TRẦN THỊ KIM NINH, VÕ THỊ HUỖNG, BÙI THÁI THẢO LY	3 8 14 19 25
● Thông tin khoa học - Tin tức - Thông tin Dược điển Việt Nam V. TRUNG TÂM DƯỢC ĐIỂN - DƯỢC THƯ VIỆT NAM	29

CONTENTS

Page

● Management - Professional exchange - Objectives and activities of the drug quality control and monitoring for the year 2020. Associate Prof. ĐOÀN CAO SƠN, Ph.D., Director of NIDQC	1
● Scientific researches - Development and validation of the procedure for identification and determination of Nystose material by HPLC method. BẠCH THỊ THẨM, NGUYỄN TUẤN ANH, TRẦN THỊ THU TRANG, PHẠM VĂN KIẾN, HỨA THỊ THU HUYỀN, ĐOÀN CAO SƠN, TRẦN VIỆT HÙNG - Development of HPLC method for determination of Meloxicam in human plasma and application in bioequivalence assessment. TẠ MẠNH HÙNG, PHAN THỊ NGHĨA, NGUYỄN THỊ CHÂM, LÊ THỊ KIM ANH, NGUYỄN VĂN BẠCH, ĐOÀN CAO SƠN - Simultaneous identification of 9 Parabens in some cosmetics by HPLC method. LÊ THỊ HUỖNG HOA, NGUYỄN THỊ VIỆT ÁI, HOÀNG THANH TÂM, VÕ TRẦN NGỌC HÙNG, THÁI NGUYỄN HÙNG THU - Study on extraction, isolation and purification of 2',4'-Dihydroxy-6'-methoxy-3',5'-dimethylchalcon from “nụ Vôi - <i>Flos Cleistocalysis operculati</i>” for standard substance establishment. NGUYỄN THỊ PHƯƠNG THẢO, GIẢN THỊ LAN, LÊ THỊ THU, PHƯƠNG THIÊN THƯƠNG - Distinguish two easy-to-confuse medicinal herbs are “Huyết đằng - <i>Caulis Sargentodoxae</i>” and “Kê huyết đằng - <i>Caulis Spatholobi</i>”. TRẦN THỊ KIM NINH, VÕ THỊ HUỖNG, BÙI THÁI THẢO LY	3 8 14 19 25
● Technical information – News - Information for Vietnamese Pharmacopoeia V. VIETNAMESE PHARMACOPOEIA AND FORMULARY CENTER	29