

VIỆN KIỂM NGHIỆM THUỐC TRUNG ƯƠNG

ISSN 1859 - 0055

TẠP CHÍ

**KIỂM
NGHIỆM
thuốc**

JOURNAL OF DRUG QUALITY CONTROL

SỐ 1.2023

TẬP 21-SỐ 79

NATIONAL INSTITUTE OF DRUG QUALITY CONTROL

48 HAI BA TRUNG - HOAN KIEM - HA NOI - VIETNAM

TEL: (+84-24).39363794 * FAX: (+84-24).38256911 * E-MAIL: tapchiknt@nidqc.gov.vn

TẠP CHÍ KIỂM NGHIỆM THUỐC SỐ 1/2023

JOURNAL OF DRUG QUALITY CONTROL N^o 1/2023

XUẤT BẢN TỪ NĂM 2003

Tổng biên tập: TS. LÊ QUANG THẢO

Thư ký biên tập: ThS. BÙI VĂN TRUNG

Trị sự: ThS. BÙI VĂN TRUNG

Hội đồng Biên tập:

- TS. LÊ QUANG THẢO
- PGS. TS. ĐOÀN CAO SƠN
- ThS. NGUYỄN ĐĂNG LÂM
- GS. TS. THÁI NGUYỄN HÙNG THU
- PGS.TS. TRỊNH VĂN LẦU
- PGS. TS. TRẦN VIỆT HÙNG
- PGS. TS. NGUYỄN THỊ KIỀU ANH
- PGS. TS. LÊ THỊ HỒNG HẢO
- TS. TẠ MẠNH HÙNG
- TS. TRẦN THỊ HỒNG ANH
- TS. NGUYỄN VĂN HÀ
- TS. CAO NGỌC ANH
- TS. NGUYỄN THỊ HOÀNG LIÊN
- TS. NGUYỄN THỊ LIÊN
- TS. LÊ THỊ HƯỜNG HOA
- TS. PHẠM QUỐC CHINH
- ThS. NGUYỄN TUẤN ANH
- ThS. TRẦN THÚY HẠNH
- ThS. LỤC THỊ THU HẰNG
- ThS. TRẦN HOÀNG
- ThS. NGUYỄN THỊ VĨNH HỒNG
- ThS. NGUYỄN THỊ PHƯƠNG THẢO
- ThS. LÊ THỊ THU
- ThS. TRẦN THỊ BÍCH VÂN
- ThS. BÙI VĂN TRUNG

In 1.000 cuốn khổ 19 x 27cm tại Công ty TNHH MTV In Tạp chí Cộng sản.

Giấy phép xuất bản số 333/GP-BTTTT ngày 23/8/2013 của Bộ Thông tin và Truyền thông.

In xong và nộp lưu chiểu tháng 04 năm 2023.

ĐỊNH HƯỚNG NHIỆM VỤ CÔNG TÁC KIỂM TRA VÀ GIÁM SÁT CHẤT LƯỢNG NĂM 2023

PGS.TS. ĐOÀN CAO SƠN

Viện trưởng Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương

Nhằm góp phần thực hiện công tác bảo vệ, chăm sóc và nâng cao sức khỏe nhân dân trong tình hình mới và các chỉ thị của Lãnh đạo Bộ Y tế, Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương và cả Hệ thống kiểm nghiệm Nhà nước nhận thức được rằng: muốn đảm bảo ổn định chất lượng thuốc trên thị trường, vấn đề mấu chốt phải tăng cường quản lý chất lượng toàn diện ngay từ khâu sản xuất đến lưu thông, phân phối. Chính vì vậy, năm 2022 Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương cùng với Hệ thống kiểm nghiệm chủ động đào tạo nghiệp vụ về đảm bảo chất lượng cho các doanh nghiệp thông qua đào tạo trực tiếp/trực tuyến, tư vấn trực tiếp/trực tuyến, kèm cặp tại phòng thí nghiệm. Dựa trên thống kê về chất lượng thuốc, Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương đã xây dựng định hướng kế hoạch lấy mẫu có trọng tâm, trọng điểm cho các đơn vị trong Hệ thống. Tăng cường hợp tác nghiên cứu khoa học giữa Viện, trường với các doanh nghiệp nhằm nâng cao chất lượng của thuốc sản xuất trong nước.

Việc tăng cường nâng cao năng lực kỹ thuật kiểm nghiệm của 2 Viện và các Trung tâm kiểm nghiệm thể hiện ở việc ngày càng có nhiều đơn vị trong Hệ thống được công nhận đạt tiêu chuẩn ISO/IEC 17025 và GLP đã đóng góp vai trò quan trọng trong kiểm tra giám sát chất lượng thuốc trên thị trường cũng như giúp các cơ sở sản xuất triển khai các kỹ thuật mới trong kiểm nghiệm và phát triển sản xuất.

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 năm 2022 vẫn ổn định và được kiểm soát, tỷ lệ thuốc không đạt chất lượng vẫn duy trì ở mức thấp (0,80%), tỷ lệ thuốc giả thấp so với các nước trong khu vực (0,15%, không tính được liệu bị nhầm lẫn).

Hội thảo tổng kết công tác kiểm tra, giám sát chất lượng thuốc năm 2022 tại Quy Nhơn vào ngày 24 tháng

3 năm 2022 đã nhất trí đề ra định hướng công tác và các nhiệm vụ trọng tâm cho Hệ thống kiểm nghiệm năm 2023.

Theo đó, Hệ thống kiểm nghiệm cần phải phát huy những thành tích đã đạt được trong năm 2022, phấn đấu vượt qua những tồn tại và thách thức để thực hiện tốt nhiệm vụ kiểm tra, giám sát chất lượng thuốc phục vụ công tác bảo vệ, chăm sóc và nâng cao sức khỏe nhân dân trong tình hình mới và hướng ứng chương trình vận động người Việt Nam ưu tiên dùng thuốc Việt Nam của Bộ trưởng Bộ Y tế. Hệ thống kiểm nghiệm Nhà nước và các doanh nghiệp cần triển khai các nội dung sau:

1. ĐỊNH HƯỚNG CÔNG TÁC

- Tiếp tục thực hiện tốt công tác kiểm tra giám sát chất lượng thuốc, mỹ phẩm trên địa bàn cả nước nhằm đảm bảo thuốc đến tay người dùng có chất lượng, hiệu lực và an toàn. Cần tăng cường kiểm tra chất lượng nguyên liệu đầu vào cũng như lấy mẫu thành phẩm cuối nguồn. Dựa trên số liệu báo cáo của các đơn vị, Viện Kiểm nghiệm thuốc TW đã tổng hợp danh mục các hoạt chất thường có vi phạm chất lượng trong năm 2020, 2021 và 2022 để các đơn vị trong Hệ thống Kiểm nghiệm có định hướng xây dựng kế hoạch lấy mẫu.

- 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 còn lại để các Trung tâm này đạt tiêu chuẩn ISO/IEC-17025 và GLP.

- Tăng cường năng lực kiểm nghiệm của hai Viện và các Trung tâm kiểm nghiệm tuyến tỉnh/thành phố, thể hiện qua mở rộng các phép thử được công nhận, tăng số lượng hoạt chất và dạng bào chế được phẩm được kiểm tra chất lượng, tăng cường kiểm tra các chất cấm trong mỹ phẩm theo Nghị định mới của ASEAN về hòa hợp trong quản lý mỹ phẩm.

- Nâng cao năng lực thử nghiệm tương đương sinh học của hai Viện nhằm góp phần đáp ứng yêu cầu đăng ký và xuất khẩu thuốc.

2. NHIỆM VỤ TRỌNG TÂM

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

- Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương và Viện KN thuốc TP. Hồ Chí Minh tiếp tục tham gia Ban soạn thảo và tổ giúp việc của Bộ y tế về Đề án quy hoạch Hệ thống kiểm nghiệm Nhà nước.

- Tiếp tục củng cố và nâng cấp Trung tâm đánh giá tương đương sinh học theo theo chuẩn mực Quốc tế và Khu vực nhằm đáp ứng yêu cầu công việc theo quy định mới.

- Tổ chức các lớp đào tạo, tập huấn kỹ thuật kiểm nghiệm thuốc – mỹ phẩm và quản lý phòng thí nghiệm cho các Trung tâm kiểm nghiệm tuyến tỉnh và phòng kiểm tra chất lượng của các doanh nghiệp.

- 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 đối với các hoạt chất, chế phẩm lưu hành trên thị trường.

2.2. Đối với các Trung tâm kiểm nghiệm

- Duy trì quản lý phòng thí nghiệm theo chuẩn mực của ISO/IEC 17025 và tiêu chuẩn Thực hành tốt phòng kiểm nghiệm thuốc.

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

- Đề xuất và thực hiện các chương trình đào tạo,

chương trình thử nghiệm thành thạo do hai Viện tổ chức.

- 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, Cục quản lý Y dược cổ truyền và các Sở Y tế 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 và xây dựng định hướng kế hoạch lấy mẫu theo quy định, thời gian chốt số liệu là **30/11 hàng năm**, thời gian nộp báo cáo là **trước 20/12 hàng năm**.

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

- Cần chú trọng việc xây dựng hồ sơ đăng ký thuốc theo hướng dẫn của Thông tư 08/2022/TT-BYT Quy định việc đăng ký lưu hành thuốc, nguyên liệu làm thuốc để hạn chế phải bổ sung, sửa đổi hồ sơ nhiều lần; nhằm rút ngắn thời gian được cấp số đăng ký lưu hành thuốc.

- Chú trọng kiểm tra chất lượng nguyên liệu, thành phẩm các thuốc có thông báo về nguy cơ cần kiểm soát các tiêu chí ngoài Dược điển (như tạp nitrosamin, ...)

- Cần thực hiện đầy đủ việc kiểm tra chất lượng nguyên liệu đầu vào, đặc biệt là các dược liệu để tránh sử dụng dược liệu nhầm lẫn và kém chất lượng.

- Tiến hành tự thanh kiểm tra chất lượng và tiếp tục theo dõi độ ổn định của sản phẩm trong quá trình lưu hành nhằm hạn chế sự biến đổi chất lượng khi lưu thông trên thị trường.

NGHIÊN CỨU KHOA HỌC

XÂY DỰNG QUY TRÌNH ĐỊNH TÍNH ĐỊNH LƯỢNG ĐỒNG THỜI MỘT SỐ FLAVONOID TRONG DIẾP CÁ TRỒNG Ở NAM BỘ VÀ LÂM ĐỒNG BẰNG PHƯƠNG PHÁP HPLC

HÀ DIỆU LY[✉]
Khoa Y ĐHQG-HCM

NGUYỄN THỊ ÁNH MAI
ĐHKHTN- HCM

HUỲNH NGỌC NHƯ QUỲNH, THIỀU THỊ THU LIỄU
Viện kiểm nghiệm thuốc TP. Hồ Chí Minh

LÊ HẢI ĐƯỜNG
Trường ĐH Nguyễn Tất Thành

Từ khóa: *Houttuynia cordata*, Rutin, Quercetin, Quercitrin, Hyperoside, Afzelin, Isoquercitrin.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Diếp Cá (*Houttuynia cordata* Thumb.) được dùng để chữa viêm phổi, thổ huyết, viêm nhiễm đường hô hấp

trên, viêm phế quản mãn tính, ho khan, cảm nhiễm, sung phổi, cảm lạnh sốt cao, lở loét cổ tử cung, viêm khớp, táo bón do thói quen, kiết lỵ do vi khuẩn cấp tính, viêm gan

vàng mật cấp tính, các chứng bệnh về thận, viêm mũi và một số chứng bệnh khác [1]. Theo kinh nghiệm dân gian Diếp cá được ăn sống hoặc nấu lấy nước uống để chữa bệnh. Các nghiên cứu về Diếp cá đã công bố cho thấy thành phần hóa học chủ yếu là các flavonoid [2]. Tuy nhiên, việc khảo sát hàm lượng các flavonoid trong Diếp cá rất phức tạp do sự thay đổi hàm lượng các chất phụ thuộc vào khí hậu và vị trí địa lý ở Việt Nam. Trong bài báo này, chúng tôi đã xây dựng phương pháp định danh, định lượng đồng thời 6 flavonoid là Rutin, Quercetin, Quercitrin, Isoquercitrin Hyperosid, Afzelin trong bột Diếp cá bằng sắc ký lỏng hiệu năng cao và áp dụng quy trình để bước đầu khảo sát hàm lượng của 6 flavonoid này tại một số vùng trồng tại Nam bộ và Lâm Đồng.

2. THỰC NGHIỆM

2.1. Nguyên vật liệu

- *Mẫu nghiên cứu:*

Diếp cá được lấy mẫu và mã hóa mẫu, mỗi nơi Diếp cá được thu mua 1 kg tươi. Mẫu dùng xây dựng phương pháp và thẩm định chọn Diếp cá trồng ở xã Long Tiên, huyện Cai Lậy, Tỉnh Tiền Giang, mã hóa là TG1.

Một số mẫu Diếp cá khác được lấy ở các địa phương khác nhau sử dụng để khảo sát hàm lượng các flavonoid đang nghiên cứu, gồm: chợ Cái Tàu, xã Hội An, huyện Chợ Mới – An Giang (AG-CT); xã Mỹ Hòa Hưng, TP. Long Xuyên An Giang (AG-LX); chợ Bến Cát, huyện Bến Cát, Bình Dương (BD-BC); huyện Nhơn Trạch, Đồng Nai (ĐN-NT); Gò đen, huyện Bến Lức, Long An (LA-K); phường 1, TP. Bảo Lộc, Lâm Đồng (LĐ-BL); phường 1, TP. Đà Lạt, Lâm Đồng (LĐ-ĐL); xã Long Khánh, huyện Cai Lậy, Tiền Giang (TG-LC); xã Long Trung, huyện Cai Lậy, Tiền Giang (TG-LT).

Các mẫu được tiến hành rửa sạch, phơi khô và sấy tại nhiệt độ sấy 45 °C, vận tốc tác nhân sấy 1,6m/s, thời gian sấy là 8 giờ [3]. Dược liệu khô được xay nhỏ, rây qua rây 710 µm. Bột được bảo quản trong chai thủy tinh màu nâu đầy kín, đặt ở nhiệt độ phòng tránh ánh nắng mặt trời và độ ẩm.

- *Chất chuẩn:* Rutin (88,5 %), Quercetin (95,5 %), Quercitrin (94,50%), Isoquercitrin (96,36%), Hyperosid (99,16 %), Afzelin (95,6 % Chromadex-USA) do Viện Kiểm nghiệm- HCM cung cấp, hàm lượng tính theo giá trị nguyên trạng.

- *Dung môi, hóa chất:* Đạt tiêu chuẩn tinh khiết dùng cho HPLC và LC/MS.

2.2. Thiết bị và dụng cụ phân tích

2.2.1. Thiết bị: Các thiết bị được quản lý và hiệu chuẩn theo các quy định của ISO/IEC và GLP, bao gồm: Máy sắc ký lỏng Shimadzu UV-VIS detector SPD-20A, Photodiode Array detector SPD-M20A

On-line Degassing Unit DGU-20A; Cân phân tích Mettler Toledo (Thụy Sĩ, độ chính xác d = 0,01 mg). Bể siêu âm có gia nhiệt MCS As One – Nhật Bản.

2.2.2. Dụng cụ: Bình định mức, pipet loại A, ống ly tâm...

2.3. Điều kiện phân tích

2.3.1. Điều kiện sắc ký:

Được khảo sát theo điều kiện của tài liệu tham khảo [4], gồm: Máy sắc ký lỏng hiệu năng cao đầu dò PDA, cột sắc ký Gemini C18, (250 cm x 4,6 mm; 5 µm); pha động là hỗn hợp acid acetic 0,2 % và acetonitril theo chương trình gradient; tốc độ dòng 0,8 ml/phút và thể tích tiêm 20 µl. Bước sóng phát hiện được lựa chọn sao cho đáp ứng của các chất phân tích là tối ưu.

2.3.2. Phương pháp chuẩn bị mẫu

- *Chuẩn bị mẫu thử:* Cân 0,5 g bột diếp cá (TG1) vào ống ly tâm 50 ml. Tiến hành khảo sát hỗn hợp MeOH – H₂O dùng làm dung môi chiết mẫu ở tỉ lệ tương ứng như sau MeOH – H₂O (30:70); (50:50); (70:30) [5].

- *Khảo sát phương pháp và thời gian chiết:* Ngâm 1 ngày ở nhiệt độ phòng, ngâm 1 ngày ở 60 °C, siêu âm 10 phút ở 60 °C (chiết 3 lần) với hỗn hợp dung môi chiết đã được lựa chọn ở trên.

- *Dung dịch chuẩn gốc:* Pha các dung dịch chuẩn gốc trong methanol – nước (70 : 30) để được các dung dịch có nồng độ Rutin, Hyperoside, Isoquercitrin, Quercitrin, Afzelin và Quercetin lần lượt là 540 µg/ml, 1000 µg/ml, 550 µg/ml, 1900 µg/ml, 250 µg/ml và 500 µg/ml.

- *Dung dịch chuẩn làm việc:* Pha loãng 100 lần dung dịch chuẩn gốc trong hỗn hợp methanol – nước (70 : 30).

- *Dung dịch tương thích hệ thống:* Lần lượt hút 2 ml của 6 dung dịch chuẩn gốc vào bình định mức 100 ml và định mức đến vạch bằng hỗn hợp methanol – nước 70 : 30.

- *Dung dịch mẫu trắng:* hỗn hợp methanol – nước 70 : 30

2.3.3. Đánh giá kết quả:

Lựa chọn pha động và chương trình sắc ký sao cho thời gian lưu vừa phải, pic của chất phân tích cân đối, độ phân giải các pic của 6 flavonoid đạt yêu cầu $R \geq 1,5$.

2.4. Thẩm định phương pháp phân tích

Quy trình phân tích được thẩm định theo ICH [6] với các tiêu chí cơ bản gồm: độ thích hợp hệ thống, độ đặc hiệu, khoảng tuyến tính, độ đúng, độ chính xác.

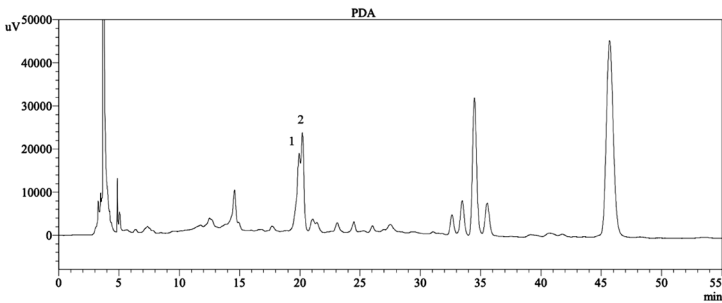
3. KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN

3.1. Khảo sát điều kiện sắc ký

Tiến hành khảo sát điều kiện sắc ký theo chương trình gradient ở tài liệu tham khảo [4] như Bảng 1. Với điều kiện sắc ký như trên, rutin và hyperoside (có thời gian lưu khoảng phút thứ 20) không được tách nhau (Hình 1).

Bảng 1. Chương trình pha động 1

Thời gian (phút)	Tỷ lệ dung môi	
	Dung dịch acetic 0,2 % (A)	Acetonitril (B)
0 - 30	80	20
30 - 50	80→79	20→21
50 - 80	79→30	21→70
80 - 82	30→80	70→20
92	80	20

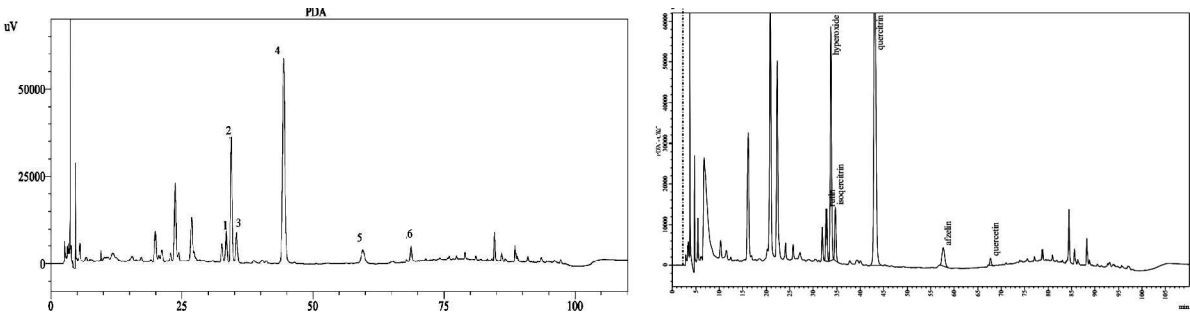


Hình 1. Sắc ký đồ phân tích 6 flavonoid trong dung dịch tương thích hệ thống theo chương trình gradient 1 (1: Rutin, 2: Hyperoside)

Tiếp tục điều chỉnh pha động, tăng từ từ pha B trong khoảng thời gian từ 0 - 70 phút, thời gian lưu được kéo dài hơn, nhưng các pic này vẫn chưa tách được. Điều chỉnh chương trình gradient kéo dài thời gian tăng nồng độ pha B từ 0 - 90 phút để thu được hình dạng các pic gần với sắc ký đồ của tài liệu tham khảo, đồng thời điều chỉnh các tỷ lệ pha động để tách được các chất có thời gian lưu gần nhau. Tiếp đó, từ 90 - 95 phút tiếp tục tăng % acetonitril từ 70 - 95 % để đẩy các chất ít phân cực còn lại ra khỏi cột (nếu có) Cuối cùng đưa hệ thống về trạng thái ban đầu để tiếp tục sắc ký các mẫu sau đó. Chương trình pha động sau khi điều chỉnh như sau:

Bảng 2. Chương trình gradient 2

Thời gian (phút)	Tỷ lệ dung môi	
	Dung dịch acetic 0,2 % (A)	Acetonitril (B)
0 - 20	95 → 82	5 → 18
20 - 55	82 → 80	18 → 20
55 - 90	80 → 30	20 → 70
90 - 95	30 → 05	70 → 95
95 - 100	05 → 95	95 → 05
100 - 110	95	05



Hình 2. Sắc ký đồ phân tích 6 flavonoid trong mẫu chuẩn (trái) và mẫu thử TG1 (phải) của dung dịch tương thích hệ thống chương trình gradient 2

1: Rutin, 2: Hyperoside, 3: Isoquercitrin, 4: Quercitrin, 5: Afzelin, 6: Quercetin

Với chương trình pha động 2 sau khi đã điều chỉnh, sắc ký đồ đã tách được 6 flavonoid. Do đó, chương trình này được lựa chọn làm chương trình pha động để phân tích đồng thời 6 flavonoid khảo sát. Thời gian lưu tương đối của các chất phân tích được thể hiện ở Bảng 3.

-*Khảo sát bước sóng phát hiện:* Phổ hấp thu của Rutin, Hyperoside, Isoquercitrin, Quercitrin, Quercetin có 2 đỉnh, trong đó đỉnh đầu hấp thu cực đại với bước sóng 254 nm. Phổ hấp thu của Afzelin có 2 đỉnh, trong đó đỉnh đầu ổn định và hấp thu cực đại ở bước sóng 263 nm. Phổ hấp thu ở bước sóng 254 nm của Afzelin tương

đối ổn định và gần bước sóng hấp thu cực đại. Vì vậy chọn bước sóng 254 nm làm bước bước sóng hấp thu đặc trưng cho tất cả các đỉnh hấp thu của 6 flavonoid.

3.2. Phương pháp chuẩn bị mẫu

3.2.1. Khảo sát phương pháp và thời gian chiết

Khảo sát một số điều kiện chiết mẫu bằng dung môi MeOH – H₂O (50 : 50) (Bảng 3), phân tích mẫu thử bằng HPLC và đánh giá sơ bộ kết quả để chọn phương pháp chiết tối ưu. Kết quả chiết xuất và thời gian chiết được trình bày ở Bảng 3.

Bảng 3. Diện tích cùng một mẫu dược liệu Diếp cá khi ngâm 24 giờ ở nhiệt độ phòng (ĐK1), ngâm 24 giờ ở 60 °C (ĐK2), và siêu âm 10 phút x 3 lần ở 60 °C (ĐK3).

Tên hợp chất	Thời gian lưu (Phút)	Tỷ số thời gian lưu	Diện tích quy về khối lượng 0,5 g		
			ĐK1	ĐK2	ĐK3
Rutin	32,652	0,76	164301	201111	201575
Hyperoside	33,511	0,78	956171	1019650	1031625
Iso quercitrin	34,800	0,81	210776	240664	240808
Quercitrin	42,963	1,00	2106426	2420998	2421179
Afzelin	57,140	1,32	1622417	1887622	1883250
Quercetin	67,451	1,56	35964	41988	41937

Dựa vào Bảng 3 cho thấy diện tích pic 6 hợp chất khi ngâm 24 giờ ở nhiệt độ phòng thấp nhất. Tại 2 điều kiện chiết còn lại diện tích pic các hợp chất khi tương đối giống nhau, tuy nhiên ngâm 24 giờ ở 60 °C sẽ tốn thời gian. Do đó chọn siêu âm 10 phút ở 60 °C làm quy trình chiết xuất các flavonoid từ bột Diếp cá TG1.

Tiếp tục khảo sát chiết mẫu bằng các dung môi khác nhau với điều kiện chiết như trên. Kết quả khảo sát cho thấy ở tỉ lệ hỗn hợp dung môi MeOH – H₂O (30 : 70) có diện tích pic của flavonoid thấp trong khi với tỷ lệ

MeOH – H₂O (50 : 50) và MeOH – H₂O (70 : 30) có diện tích các hợp chất flavonoid: Rutin, Hyperosid, Isoquercitrin, Quercitrin, Afzelin, Quercetin cao hơn và không thay đổi đáng kể khi thay đổi tỉ lệ hỗn hợp dung môi từ MeOH – H₂O (50 : 50) đến MeOH – H₂O (70 : 30), ngoại trừ diện tích pic của Isoquercitrin trong hỗn hợp dung môi MeOH – H₂O (70 : 30) cao hơn nhiều so với tỷ lệ hỗn hợp dung môi từ MeOH – H₂O (50 : 50) (Bảng 4). Do đó chọn tỉ lệ hỗn hợp dung môi MeOH – H₂O (70 : 30) làm dung môi chiết mẫu.

Bảng 4. Diện tích pic của cùng một mẫu dược liệu bột Diếp Cá TG1 được chiết trong hỗn hợp dung môi với tỷ lệ khác nhau

Tên hợp chất	Thời gian lưu (Phút)	Diện tích quy về khối lượng 0,5 g		
		MeOH – H ₂ O (30 : 70)	MeOH – H ₂ O (50 : 50)	MeOH – H ₂ O (70 : 30)
Rutin	32,383	166828	201356	201541
Hyperoside	33,235	613422	1022546	1031454
Isoquercitrin	34,513	151985	170110	240768
Quercitrin	42,609	1456028	2416320	2420778
Afzelin	56,670	535937	1055738	1061615
Quercetin	66,896	27897	41481	41931

Tiến hành chiết lặp lại bằng quy trình và hệ dung môi trên, gộp dịch chiết và đưa về cùng thể tích để đánh giá số lần chiết. Sau lần chiết thứ 3 thì diện tích pic của các chất trong mẫu quy theo khối lượng hầu như không thay đổi, vì vậy chọn xử lý mẫu siêu âm chiết 3 lần mỗi lần 10 phút để chiết kiệt chất.

- *Quy trình chiết như sau:* Cân chính xác khoảng 0,5 g bột dược liệu, chiết trong 15 ml hỗn hợp MeOH – H₂O (70:30), siêu âm 10 phút ở 60 °C. Dịch chiết thô để lắng, sau đó được ly tâm với 10 ml hỗn hợp MeOH – H₂O (70:30) ở 7000 vòng/phút trong 10 phút. Thu lấy phần dung dịch phía trên. Lặp lại thêm 2 lần và định mức bằng hỗn hợp MeOH – H₂O (70:30) vào bình 50 ml. Lọc qua màng lọc 0,45 µm. Tiến hành sắc ký để chọn dung môi chiết cho diện tích pic các hợp chất cần xác định so với pic được chọn đánh dấu cao nhất [5].

Với điều kiện HPLC đã xây dựng, các flavonoid được tách hoàn toàn với độ phân giải > 1,5 và số đĩa lý thuyết > 9000, (Bảng 5) cho phép định tính và định lượng các flavonoid trong dịch chiết chứa nhiều thành phần từ dược liệu. Tiến hành thẩm định phương pháp để có độ đúng độ chính xác đáp ứng yêu cầu.

3.3. Thẩm định phương pháp

Tính thích hợp hệ thống

Tiêm lặp lại 06 lần liên tiêm dung dịch chuẩn để đánh giá độ thích hợp của hệ thống. Kết quả cho thấy pic sắc ký các flavonoid có RSD thời gian lưu ≤ 0,44 %, RSD diện tích pic ≤ 1,96 %, hệ số kéo đuôi ≤ 1,17, số đĩa lý thuyết ≥ 45176 và độ phân giải giữa các pic ≥ 1,8. Các thông số này đã đáp ứng yêu cầu đặt ra nên hệ thống trên phù hợp cho việc phân tích định tính, định lượng đồng thời 6 flavonoid trong bột Diệp cá (Hình 2 và Bảng 5).

Bảng 5. Kết quả khảo sát tính tương thích hệ thống của phương pháp định lượng flavonoid

Flavonoid	Thời gian lưu (n = 6)		Diện tích pic (n=6)		Hệ số kéo đuôi	Số đĩa lý thuyết	Độ phân giải
	Trung bình (phút)	RSD %	Trung bình (mAU.s)	RSD %			
Rutin	33,009	0,34	445258	0,81	1,14	81432	-
Hyperoside	33,894	0,33	622641	1,96	1,17	71396	1,8
Isoquercitrin	34,880	0,35	640875	1,24	1,17	68687	1,8
Quercitrin	43,503	0,44	2545047	0,46	1,15	51851	12,8
Afzelin	58,209	0,51	352334	0,24	1,12	45716	15,4
Quercetin	67,897	0,17	314992	0,87	1,12	221676	11,9

3.3.1. Tính đặc hiệu

Trong sắc ký đồ dung dịch thử xuất hiện 6 pic có thời gian lưu tương ứng với thời gian lưu của pic trong sắc ký đồ dung dịch chuẩn (Hình 2). Sắc ký đồ mẫu trắng không xuất hiện các pic có thời gian lưu tương ứng với thời gian lưu của các chất trên.

3.3.2. Độ tuyến tính

Hòa tan và pha loãng các chất chuẩn flavonoid trong

hỗn hợp methanol – nước 70 : 30 để được các dung dịch có nồng độ thử độ tuyến tính với nồng độ các chất Rutin, Hyperoside, Isoquercitrin, Quercitrin, Afzelin và Quercetin tương ứng trong các khoảng 0,54 – 16,2 (µg/ml), 1,02 – 30,48 (µg/ml), 0,55 – 16,56 (µg/ml), 1,96 – 58,72 (µg/ml), 0,29 – 8,70 (µg/ml) và 0,51 – 15,33 (µg/ml). Kết quả đánh giá độ tuyến tính của phương pháp được thể hiện như Bảng 6.

Bảng 6. Kết quả khảo sát tính tuyến tính, giới hạn định lượng và giới hạn phát hiện của 6 hợp chất chuẩn phân tích

Chất chuẩn	Phương trình hồi quy ($y = ax+b$)	R ²	P (95 %)	LOD (µg/ml)	LOQ (µg/ml)
Rutin	$y = 40937x + 8676$	0,9995	0,17	0,70	2,12
Hyperoside	$y = 63315x - 10085$	1,0000	0,06	0,33	1,01
Isoquercitrin	$y = 60208x - 6338,3$	1,0000	0,06	0,22	0,66
Quercitrin	$y = 67682x - 36366$	0,9997	0,12	1,49	4,53
Afzelin	$y = 64185x - 6552,6$	0,9998	0,09	0,25	0,75
Quercetin	$y = 31234x - 7449,6$	0,9998	0,05	0,47	1,43

Kết quả khảo sát cho thấy $R^2 \geq 0,998$ nên có sự tương quan tuyến tính chặt chẽ giữa nồng độ chất phân tích và diện tích pic trong khoảng nồng độ khảo sát. Hệ số $P \geq 0,05$ nên có hệ số b không có ý nghĩa thống kê. Do đó, khi định lượng các flavonoid trong khoảng nồng độ đang khảo sát thì có thể sử dụng dung dịch chuẩn có nồng độ trong khoảng này để tính toán kết quả mà không phải xây dựng dãy nồng độ chuẩn.

3.3.3. Độ đúng

Thêm chuẩn vào nền mẫu với lượng thích hợp để được các dung dịch chứa các chất nghiên cứu với nồng độ nồng độ nằm trong khoảng từ 60 %, 120 % và 150 % so với nồng độ định lượng (tính theo nồng độ dung dịch chuẩn làm việc). Mỗi mức nồng độ tiến hành thử trên 03 mẫu độc lập. Tính toán độ thu hồi dựa dựa trên kết quả định lượng so với lượng các chất có trong mẫu (lượng thêm vào và lượng có trong mẫu thử được tính từ Mục 3.3.4). Kết quả được trình bày ở Bảng 7.

Bảng 7. Kết quả khảo sát độ đúng của phương pháp

Mức nồng độ	Hoạt chất	% thu hồi	RSD (%)
60 %	Rutin	95,71	0,35
	Hyperoside	101,59	0,39
	Isoquercitrin	101,28	0,10
	Quercitrin	105,30	0,39
	Afzelin	95,43	0,36
	Quercetin	106,34	0,39

100 %	Rutin	103,80	0,30
	Hyperoside	97,74	0,25
	Isoquercitrin	95,82	0,55
	Quercitrin	98,19	0,31
	Afzelin	106,55	0,42
	Quercetin	102,26	0,28
150 %	Rutin	103,14	0,65
	Hyperoside	102,71	0,66
	Isoquercitrin	103,34	0,39
	Quercitrin	98,16	0,78
	Afzelin	102,10	0,71
	Quercetin	95,51	0,48

Dựa vào bảng cho thấy phương pháp đạt yêu cầu có độ phục hồi nằm trong khoảng 95,43 % - 106,55 %, đáp ứng yêu cầu đặt ra (90 % – 107 %).

3.3.4. Độ chính xác

Tiến hành phân tích mẫu bột Diệp cá TG1 theo quy trình phân tích đã xây dựng, thực hiện hai ngày phân tích khác nhau, mỗi ngày tiến hành đánh giá 06 thử. Độ lặp lại tính trên kết quả ngày thử nghiệm thứ nhất, độ chính xác trung gian tính trên kết quả của hai ngày thực hiện. Độ chính xác của phương pháp được thể hiện như Bảng 8.

Bảng 8. Hàm lượng các flavonoid trong bột Diệp cá TG1.

Tên chất	Rutin	Hyperosid	Isoquercitrin	Quercitrin	Afzelin	Quercetin
Độ lặp lại (tính trên kết quả ngày 1, n = 6)						
Trung bình (mg/g)	0,540	1,758	0,432	3,827	0,319	0,156
RSD (%)	0,91	1,40	0,89	1,49	1,10	1,37
Độ chính xác trung gian (tính trên kết quả ngày 2, n = 12)						
Trung bình (mg/g)	0,535	1,763	0,429	3,861	0,312	0,155
RSD (%)	1,34	1,51	1,21	1,71	2,51	1,90

Cả độ lặp lại và độ chính xác trung gian của phương pháp đều cho giá trị RSD của tất cả các kết quả định lượng flavonoid không quá 1,90 %. Như vậy phương pháp đã xây dựng đáp ứng được các yêu cầu về chính xác theo qui định của AOAC.

3.4. Áp dụng phương pháp HPLC

Áp dụng phương pháp HPLC đã xây dựng để định lượng 6 flavonoid trong 9 mẫu bột Diệp cá thu hái ở một số tỉnh phía Nam và Lâm đồng, kết quả được trình bày trong Bảng 9.

Bảng 9. Kết quả định lượng 6 flavonoid trong 9 mẫu bột Diệp cá thu hái ở một số tỉnh phía Nam và Lâm Đồng.

STT	Mẫu	Rutin (mg/g)	Hyperoside (mg/g)	Isoquercitrin (mg/g)	Quercitrin (mg/g)	Afzelin (mg/g)	Quercetin (mg/g)
1	AG-CT	0,455	1,083	0,345	4,163	0,390	0,223
2	AG-LX	0,569	1,116	0,371	3,427	0,280	0,101
3	BD-BC	0,706	1,073	0,485	5,441	0,484	0,671
4	ĐN-NT	0,585	1,145	0,305	3,356	0,286	0,087
5	LA-K	0,455	0,902	0,371	3,029	0,239	0,059
6	LĐ-BL	0,373	0,775	0,275	2,766	0,229	0,084
7	LĐ-ĐL	0,374	0,781	0,277	2,783	0,231	0,085
8	TG-LK	0,535	1,640	0,456	5,256	0,469	0,172
9	TG-LT	0,454	1,082	0,344	4,157	0,390	0,222

Kết quả cho thấy tất cả các mẫu Diệp cá đang khảo sát đều xuất hiện 6 flavonoid đang nghiên cứu, trong đó Quercitrin có hàm lượng cao nhất. Quy trình phân tích đồng thời 6 flavonoid là Rutin, Hyperoside, Isoquercitrin, Quercitrin, Afzelin và Quercetin trong bột Diệp cá bằng HPLC trên có thể phát triển thành sắc đồ vân tay chỉ điểm đặc trưng cho các mẫu Diệp cá.

4. KẾT LUẬN

Trong nghiên cứu này chúng tôi đã xây dựng phương pháp định tính và định lượng 6 flavonoid là Rutin, Hyperoside, Isoquercitrin, Quercitrin, Afzelin và Quercetin trong bột Diệp cá bằng phương pháp HPLC pha đảo với khoảng làm việc cho các flavonoid tương ứng là 3,2 – 8,1 (µg/ml), 6,0 – 15,0 (µg/ml), 3,3 – 8,3 (µg/ml), 11,4 – 28,5 (µg/ml), 1,5 – 3,8 (µg/ml) và 3,0 – 7,5 (µg/ml). Phương pháp đã được thẩm định và đáp ứng các yêu cầu của ICH về độ đặc hiệu, độ thích hợp hệ thống, độ đúng, độ chính xác. Quy trình đã được áp dụng để kiểm tra 06 flavonoid trong Diệp cá tại 9 địa phương, các mẫu diệp cá này đều chứa 06 flavonoid với hàm lượng Quercitrin là cao nhất.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Viện dược liệu (2004), *Cây thuốc và động vật làm thuốc ở Việt Nam*, Tập 1, NXB Khoa học kỹ thuật.
2. F. Jiangang et.al. (2013). *Houttuynia cordata* Thunb: a review of phytochemistry and pharmacology and quality control, *Chin. Med.*, 4(9), pp. 101–123.
3. Trương Hữu Sang (2019), “Nghiên cứu thực nghiệm sấy lá Diệp cá theo nguyên lý sấy bơm nhiệt”, *Tạp chí Khoa học giáo dục kỹ thuật*, số 53, tr. 51.
4. J.Meng et.al. (2005). Establishment of HPLC-DAD-MS fingerprint of fresh *Houttuynia cordata*, *Chem. Pharm. Bull.*, 53(12), pp. 1604–1609.
5. Thiều Thị Thu Liễu (2020), Khảo sát thành phần hóa học và thiết lập chất đối chiếu từ cây Diệp Cá, Luận văn Thạc sĩ, Trường Đại học Khoa học tự nhiên Tp Hồ Chí Minh.
6. ICH Topic Q2B (1996), *Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology*.

SUMMARY

Six flavonoid from *Houttuynia cordata*, was extracted and analyzed by reverse phase HPLC. These flavonoid were extracted with mixture of methanol – water (70:30), using ultrasound in 10 min. at 60 °C. The method HPLC was chromatographed on C18 column, (250 mm × 4.6 mm; 5 µm), the mobile phase is acid acetic 0.2 % - acetonitril with

gradient program. The proposed method was fully validated with acceptable specificity, precision and accuracy. The method was applied to determine Rutin, Quercitrin, Hyperoside, Isoquercitrin, Afzelin and Quercetin in *Houttuynia cordata*, collected at 9 provinces of Southern and Lam Dong. All studied flavonoid was detected in investigated samples, and result showed that quercitrin was the highest component.

(Ngày nhận bài: 12/01/2023; Ngày phản biện: 10/02/2023; Ngày duyệt đăng: 28/02/2023)

NGHIÊN CỨU XÁC ĐỊNH GELSEMIN TRONG MÁU BẰNG SẮC KÝ LÔNG KHỐI PHỔ

ĐOÀN THỊ HẢI HẠNH, NGUYỄN MAI DUNG,
PHẠM QUỐC CHINH ✉

Viện Pháp y Quốc gia

PHẠM THỊ THANH HÀ

Trường Đại học Dược Hà Nội

Từ khóa: *Gelsemin, máu, sắc ký lỏng khối phổ (LC-MS/MS).*

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Cây lá ngón (*Gelsemium elegans* Benth) thuộc họ Hoàng đằng - *Gelsemiaceae* còn gọi là cây rút ruột, đoạn trường thảo, câu vắn, co ngón, hồ mạn trường, đại trà đằng... là loại cây mọc hoang, phân bố chủ yếu ở Trung Quốc và các vùng núi phía Bắc Việt Nam như Hòa Bình, Lào Cai, Lạng Sơn, Tuyên Quang, Sơn La... Cây lá ngón có độc tính rất mạnh, độc tính của cây ngón là do alkaloid có trong toàn cây. Gelsemin là một alkaloid chính của cây lá ngón [1]. Trong những năm gần đây, các trường hợp ngộ độc alkaloid cây lá ngón do nhầm lẫn, đầu độc hoặc tự tử xảy ra rất nhiều. Để góp phần trong việc chẩn đoán và xác định nguyên nhân tử vong do alkaloid cây lá ngón, việc xác định gelsemin trong mẫu máu là vô cùng cần thiết.

Hiện nay, rất ít các nghiên cứu phân tích gelsemin trong dịch sinh học được công bố. Phương pháp sắc ký khí khối phổ (GC-MS) được sử dụng để xác định gelsemin trong chất chứa dạ dày nhưng giới hạn phát hiện cao [2]. Phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) được sử dụng để phân tích gelsemin trong huyết tương nhưng độ đặc hiệu thấp [3]. Phương pháp sắc ký lỏng khối phổ (LC-MS/MS) [4-5], được sử dụng để phân tích gelsemin trong mẫu sinh học và thảo mộc, tuy nhiên các báo cáo tập trung chủ yếu vào phân tích các trường hợp ngộ độc.

Nghiên cứu này thực hiện xây dựng và thẩm định phương pháp định lượng gelsemin trong máu bằng LC-

MS/MS kết hợp xử lý mẫu bằng kỹ thuật chiết lỏng-lỏng (LLE). Phương pháp có thể được triển khai để phân tích các trường hợp ngộ độc alkaloid cây lá ngón, bổ sung một công cụ phân tích hỗ trợ cấp cứu, xác định nguyên nhân ngộ độc và giám định pháp y tại Việt Nam.

2. THỰC NGHIỆM

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

2.1.1. Thiết bị, dụng cụ

Hệ thống sắc ký lỏng UHPLC 1290 infinity II Agilent, detector khối phổ MS/MS 6470 LC/TQ, máy ly tâm, cân phân tích (có độ chính xác 0,01 mg), máy lắc rung, hệ thống thổi khí nitơ, các micro pipet dung tích 20 – 1000 µl, các dụng cụ thủy tinh có độ chính xác phù hợp và các thiết bị, dụng cụ khác trong phòng thí nghiệm.

Thiết bị, dụng cụ đã được hiệu chuẩn theo quy định của ISO/IEC 17025 và GLP.

2.1.2. Hóa chất, chất chuẩn

- *Chất chuẩn:* Chuẩn gelsemin 99,33 %, lọ 10 mg, mã số G304560 (TRC, Canada) và chuẩn papaverin hydroclorid 99,83 %, lọ 200 mg, SKS 0102151 (Viện Kiểm nghiệm Thuốc Trung ương, Bộ Y tế).

- *Dung môi, hóa chất:* Methanol HPLC, ethyl acetat HPLC, acetonitril HPLC, diethyl ether, n-hexan, cyclohexan, chloroform, natri hydroxyt, acid formic, nước cất... dùng cho phân tích.

2.2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Đối tượng và mẫu nghiên cứu

- Đối tượng nghiên cứu là gelsemin trong máu.

- Mẫu nghiên cứu: mẫu máu trắng không nhiễm gelsemin của Viện Huyết học - Truyền máu Trung ương được sử dụng để khảo sát phương pháp. Mẫu máu của người nghi ngờ bị ngộ độc alkaloid cây lá ngón được gửi đến giám định tại Viện Pháp y Quốc gia.

2.2.2. Phương pháp nghiên cứu

* Điều kiện sắc ký

Phương pháp sắc ký được tiến hành trên cột Poroshell 120 EC-C18 (2,7 μm ; 4,6 x 100 mm), rửa giải bằng hệ pha động methanol - dung dịch acid formic 0,1 % theo chương trình gradient, tốc độ dòng 0,4 ml/phút. Thể tích tiêm mẫu là 1 μl .

* Điều kiện khối phổ

Kiểu khối phổ hai lần (MS/MS), nguồn ion hóa ESI (+). Chọn chế độ khảo sát tự động để bắn phá ion phân tử thành các ion con, lựa chọn ion con có cường độ tín hiệu cao nhất để định lượng và ion con có cường độ thấp hơn để định tính. Tối ưu hóa năng lượng bắn phá (CE) tự động theo phần mềm MassHunter Optimizer của thiết bị.

* Chuẩn bị mẫu

- Các dung dịch chuẩn

+ Dung dịch chuẩn gốc nồng độ 100 $\mu\text{g/ml}$ trong methanol được pha từ chất chuẩn gelsemin hàm lượng 99,33 %.

+ Dung dịch chuẩn nội gốc nồng độ 100 $\mu\text{g/ml}$ trong methanol được pha từ chất chuẩn papaverin hydroclorid hàm lượng 99,83 %.

+ Các dung dịch chuẩn và chuẩn nội trung gian 1 $\mu\text{g/ml}$ trong methanol được pha loãng từ dung dịch chuẩn và chuẩn nội gốc 100 $\mu\text{g/ml}$ trong dung môi methanol.

- *Chuẩn bị mẫu chiết*: Hút chính xác 1,0 ml mẫu máu vào ống ly tâm 10 ml, thêm 25 μl dung dịch chuẩn nội nồng độ 1,0 $\mu\text{g/ml}$ và 50 μl NaOH 1 M. Thêm tiếp 3 ml dung môi chiết, lắc xoay 5 phút. Ly tâm 5000 vòng/phút trong 5 phút, lấy lớp dung môi hữu cơ. Chiết 3 lần gộp dịch chiết và làm khô bằng khí nitơ tới cạn. Hòa tan cần bằng 200 μl methanol, lọc qua màng lọc 0,45 μm , tiến hành sắc ký.

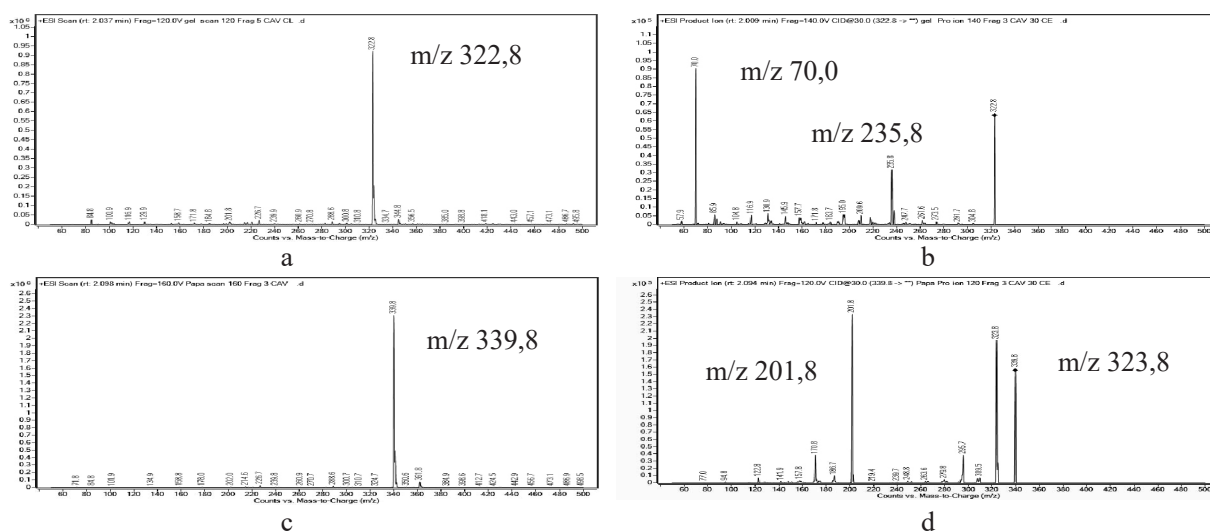
* Thẩm định phương pháp phân tích

Thẩm định phương pháp phân tích theo hướng dẫn của ANSI/ASB Standard 036 và US-FDA với các tiêu chí: Độ phù hợp của hệ thống, độ đặc hiệu, chọn lọc, giới hạn phát hiện và giới hạn định lượng, đường chuẩn và khoảng tuyến tính, độ đúng và độ lặp lại, độ ổn định [6], [7] .

3. KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN

3.1. Khảo sát khối phổ của gelsemin và papaverin

Qua khảo sát tín hiệu các ion tạo thành khi ghi phổ khối một lần của các chất chuẩn và nội chuẩn, với mỗi chất, một ion có cường độ cao và ổn định được chọn làm ion mẹ. Các ion mẹ này được bắn phá lần hai để phát hiện các ion con, lựa chọn 2 ion con có cường độ cao và ổn định để định lượng và xác nhận. Từ kết quả khảo sát, các ion mẹ và ion con có giá trị m/z được chọn để theo dõi trong kỹ thuật MRM nhằm phát hiện gelsemin trong mẫu. Kết quả thể hiện ở Hình 1.



Hình 1. Phổ khối scan lần 1 và phổ ion con của gelsemin và papaverin

a, c. Phổ khối scan lần 1 của gelsemin và papaverin ; b, d. Phổ ion con của gelsemin và papaverin

Sau khi lựa chọn được ion mẹ và ion con, tiến hành tối ưu hóa các điều kiện khối phổ để tín hiệu thu được cao và ổn định. Kết quả tối ưu khối phổ được thể hiện trong Bảng 1.

Bảng 1. Điều kiện khối phổ phân tích gelsemin và papaverin

Thông số \ Chất phân tích	Gelsemin		Papaverin	
Chế độ ion hóa	ESI (+)		ESI (+)	
Điện thế ion hóa (V)	3500		3500	
Khí phun sương (psi)	40		40	
Nhiệt độ hóa hơi (°C)	300		300	
Ion ban đầu	322,8		339,8	
Năng lượng phân mảnh (V)	28	36	36	28
Ion tạo thành	235,8	70,0	323,8	201,8
Ghi chú	Xác nhận	Định lượng	Xác nhận	Định lượng

Từ kết quả đưa ra tại Bảng 1 cho thấy điều kiện khối phổ hoàn toàn phù hợp với công thức phân tử của các chất phân tích với ion mẹ có số khối là $[M+H]^+$. Mỗi chất đều thu được 2 ion con, phù hợp với quy định.

Như vậy, phổ khối các chất phân tích đã được lựa chọn để xác định bằng MS/MS theo chế độ ion dương với nguồn ESI.

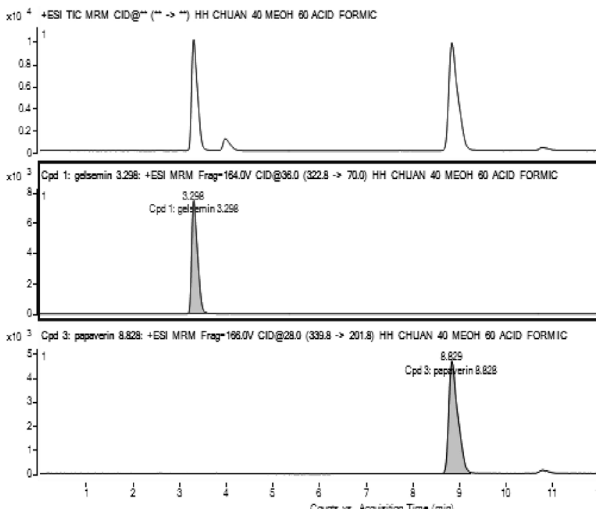
3.2. Khảo sát chương trình pha động

Sau khi lựa chọn được ion phân tử, ion con và các điều kiện khối phổ, tiến hành phân tích dung dịch chuẩn gelsemin nồng độ 25 ng/ml và chuẩn nội papaverin nồng độ 25 ng/ml.

Gradient pha động gồm 2 kênh methanol và acid formic 0,1 % được khảo sát để tối ưu, tốc độ dòng 0,4 ml/phút, thể tích tiêm 1 µl. Kết quả điều kiện gradient tối ưu được thể hiện trong Bảng 2. Hình 2 thể hiện sắc ký đồ của gelsemin và papaverin sau khi đã xác định được các điều kiện LC-MS/MS.

Bảng 2. Chương trình gradient pha động

Thời gian (phút)	Methanol (%)	Dung dịch acid formic 0,1 % (%)
0	40	60
0,5	40	60
2	0	100
3	40	60
12	40	60



Hình 2. Sắc ký đồ của gelsemin và papaverin

Kết quả ở Hình 2 cho thấy sắc ký đồ của mẫu chuẩn xuất hiện hai pic của gelsemin và papaverin với thời gian lưu phù hợp, pic cân đối, nhọn, sắc nét, không có hiện tượng dính pic. Mỗi chất đều có 2 ion con được sử dụng để định lượng và xác nhận. Do vậy, chương trình gradient trong Bảng 2 được sử dụng làm điều kiện pha động để phân tích gelsemin.

3.3. Khảo sát dung môi chiết

Khảo sát một số môi trường chiết với các dung môi diethyl ether, ethyl acetat, n-hexan, cyclohexan và chloroform.

Với quy trình chuẩn bị mẫu như đã trình bày ở mục 2.2.2.3, các kết quả được trình bày ở Bảng 3.

Bảng 3. Kết quả khảo sát dung môi chiết

Chất phân tích	Gelsemin		Papaverin	
	Diện tích pic (<i>Abu.s</i>)	RSD (%)	Diện tích pic (<i>Abu.s</i>)	RSD (%)
Dung môi				
Diethyl ether	170283	0,52	182627	1,31
Ethyl acetat	221735	1,62	215193	0,52
n-Hexan	8051	0,69	79286	0,90
Cyclohexan	21544	3,49	99606	2,45
Chloroform	145196	3,02	104440	3,00

Kết quả ở Bảng 3 cho thấy, dung môi ethyl acetat có khả năng chiết tách các chất phân tích tốt nhất. Đồng thời, ethyl acetat có khả năng bay hơi trung bình, ít tạo nhũ trong quá trình chiết nên tiết kiệm được thời gian chiết và xử lý mẫu. Do vậy, ethyl acetat được lựa chọn làm dung môi chiết.

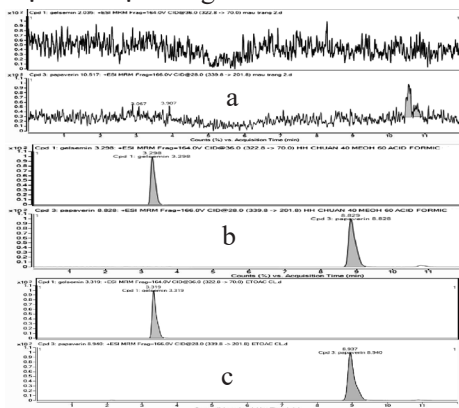
3.4. Đánh giá phương pháp

3.4.1. Độ phù hợp của hệ thống LC-MS/MS

Tiêm lặp lại 6 lần hỗn hợp dung dịch mẫu chuẩn và chuẩn nội. Ghi lại thời gian lưu và diện tích pic. Kết quả cho thấy gelsemin có thời gian lưu trung bình là 3,297 phút với độ lệch chuẩn tương đối (RSD) là 0,15 %; papaverin có thời gian lưu trung bình là 9,077 phút với độ lệch chuẩn tương đối (RSD) của diện tích pic là 0,26 %, tỉ lệ diện tích pic giữa gelsemin và papaverin là 1,11 với giá trị độ lệch chuẩn tương đối là 1,41 %, đáp ứng yêu cầu ứng dụng phương pháp khối phổ ($\leq 5\%$), cho thấy thiết bị có độ ổn định tốt.

3.4.2. Độ đặc hiệu, chọn lọc

Chuẩn bị 6 mẫu máu trắng, 6 mẫu chuẩn và 6 mẫu máu trắng thêm chuẩn và chuẩn nội ở nồng độ 25 ng/ml. Xử lý mẫu và tiến hành phân tích với điều kiện đã xây dựng. Sắc ký đồ của mẫu trắng, mẫu chuẩn và mẫu thêm chuẩn được thể hiện trong Hình 3.



Hình 3. Sắc ký đồ của mẫu trắng (a), mẫu chuẩn (b) và mẫu trắng thêm chuẩn (c)

Sắc đồ của mẫu trắng thêm chuẩn có các pic xuất hiện ở khoảng 3,3 và 8,9 phút, phù hợp với giá trị thời gian lưu của chuẩn 2 chất đã khảo sát. Trong khi đó, trên sắc ký đồ của mẫu trắng không xuất hiện pic trong khoảng thời gian lưu tương ứng như trên. Do đó, phương pháp là đặc hiệu và chọn lọc đối với gelsemin và papaverin.

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

Tỷ số tín hiệu trên nhiễu (S/N) được sử dụng để đánh giá LOD và LOQ. LOD được xác định tại hàm lượng có S/N khoảng bằng 3 và khi S/N khoảng bằng 10 ta thu được LOQ. Theo đó, phương pháp có giới hạn phát hiện và giới hạn định lượng gelsemin trong máu lần lượt là 0,01 ng/ml và 0,03 ng/ml.

3.4.4. Đường chuẩn và khoảng tuyến tính

Đường chuẩn được chuẩn bị trên nền mẫu để loại trừ ảnh hưởng của nền. Chất chuẩn được thêm vào mẫu máu trắng tạo thành các nồng độ từ 0,1 – 100 ng/ml. Nồng độ chuẩn nội giữ cố định ở 25 ng/ml. Đường chuẩn của phương pháp với khoảng nồng độ trên là $y = 0,0356x + 0,0004$, hệ số tương quan $r = 0,9992$. Như vậy có sự tương quan tuyến tính giữa tỉ lệ diện tích pic của chất chuẩn chia nội chuẩn và nồng độ gelsemin từ 0,1 – 100 ng/ml, đáp ứng yêu cầu đặt ra ($r > 0,99$).

3.4.5. Độ đúng và độ lặp lại của phương pháp

Độ đúng và độ lặp lại của phương pháp được đánh giá bằng cách phân tích các mẫu máu trắng thêm chuẩn ở ba mức nồng độ 0,4; 8,0 và 80 ng/ml ($n = 5$). Xác định nồng độ gelsemin trong mẫu bằng phương pháp đường chuẩn. Độ đúng là tỷ lệ phần % giữa nồng độ xác định được từ đường chuẩn so với nồng độ lý thuyết. Độ lặp lại được đánh giá thông qua độ lệch chuẩn tương đối của các kết quả phân tích. Kết quả trình bày ở Bảng 4.

Bảng 4. Kết quả khảo sát độ đúng và độ lặp lại của phương pháp

Chất phân tích	Lượng thêm chuẩn (ng/ml)	Lượng tính được (ng/ml)	Độ đúng (%)	Độ lặp lại (RSD %)
Gelsemin	0,4	0,44	109,53	3,04
	8,0	8,25	103,12	4,68
	80	74,14	92,68	3,38

Kết quả cho thấy phương pháp có độ đúng dao động trong khoảng từ 92,68 đến 109,53 % và độ lặp lại tốt với RSD từ 3,04 đến 4,68 %. Vậy phương pháp đã xây dựng đáp ứng được các yêu cầu về độ đúng và độ lặp lại của phương pháp phân tích gelsemin trong máu.

3.4.6. Độ ổn định

Để đánh giá quá trình thực nghiệm ảnh hưởng đến chất phân tích tiến hành khảo sát độ ổn định của chất phân tích trong nền mẫu ở các điều kiện nhất định. Trong giám định pháp y, khoảng thời gian 4 giờ là để chuẩn bị mẫu giám định. Thời gian 7 ngày, 21 ngày và 3 chu kỳ rã - đông là thời gian chờ (có thể xảy ra) từ khi nhận mẫu giám định cho tới khi tiến hành giám định hoặc để tiến hành giám định lại.

Độ ổn định của gelsemin trong nền mẫu máu được đánh giá trên 5 lô các mẫu máu trắng thêm chuẩn ở ba

mức nồng độ 0,4; 8,0 và 80 ng/ml. Một lô phân tích ngay khi mẫu được chuẩn bị xong, một lô được bảo quản trong khay mẫu 4 giờ ở nhiệt độ phòng, một lô được bảo quản trong tủ lạnh âm sâu 7 ngày ở nhiệt độ -20 °C, một lô được bảo quản trong tủ lạnh âm sâu 21 ngày ở nhiệt độ -20 °C và một lô được bảo quản ở điều kiện 3 chu kỳ rã - đông. Kết quả khảo sát độ ổn định được trình bày trong Bảng 5.

Kết quả nghiên cứu cho thấy, sự khác biệt về nồng độ của gelsemin trong các mẫu máu được phân tích ngay sau khi chuẩn bị so với trong các mẫu máu được bảo quản sau 4 giờ, 7 ngày, 21 ngày và 3 chu kỳ rã - đông nằm trong khoảng cho phép (<15 %) với các giá trị RSD ≤ 15 %. Như vậy gelsemin trong máu ổn định trong 4 giờ ở nhiệt độ phòng, 7 ngày, 21 ngày và 3 chu kỳ rã - đông nếu được bảo quản lạnh ở nhiệt độ -20 °C.

Bảng 5. Độ ổn định của gelsemin trong máu

Điều kiện bảo quản	Chỉ tiêu đánh giá	Gelsemin		
		0,4 ng/ml	8,0 ng/ml	80 ng/ml
Ban đầu	Lượng tính được (ng/ml)	0,44	8,25	74,14
	RSD (%)	3,04	4,68	3,38
Sau 4 giờ ở nhiệt độ phòng	Lượng tính được (ng/ml)	0,42	8,17	76,95
	RSD (%)	2,44	3,51	3,16
	Sai khác (%)	-4,63	-0,69	3,84
Sau 7 ngày ở -20 °C	Lượng tính được (ng/ml)	0,40	7,93	70,92
	RSD (%)	4,25	3,81	3,01
	Sai khác (%)	-9,37	-3,76	-4,20
Sau 21 ngày ở -20 °C	Lượng tính được (ng/ml)	0,38	8,53	79,53
	RSD (%)	3,65	12,74	1,78
	Sai khác (%)	-12,92	3,45	7,38
Sau 3 chu kỳ rã - đông	Lượng tính được (ng/ml)	0,37	7,62	79,82
	RSD (%)	3,67	3,79	2,61
	Sai khác (%)	-14,58	-7,49	7,69

3.5. Phân tích mẫu máu của những người nghi ngờ bị ngộ độc alkaloid cây lá ngón

Áp dụng quy trình đã xây dựng để định lượng một số mẫu máu của nạn nhân nghi ngờ bị ngộ độc alkaloid cây lá ngón. Mỗi mẫu được tiến hành 3 lần. Kết quả trung bình thể hiện ở Bảng 6.

Bảng 6. Kết quả phân tích gelsemin trong các mẫu thực

STT	Họ tên	Năm sinh	Nồng độ (ng/ml)
1	Sùng A L	1981	7,03 ± 0,24
2	Lò Văn H	1985	3,31 ± 0,07
3	Thào Thị Pạ D	2006	4,03 ± 0,13
4	Mùa Thị V	1997	6,52 ± 0,23
5	Thào A T	1998	4,75 ± 0,07
6	Sùng Nhì C	1980	27,86 ± 1,89

Từ kết quả phân tích cho thấy, cả 6 mẫu đều dương tính với gelsemin. Nồng độ gelsemin nằm trong khoảng 3,31 – 27,86 ng/ml. Thời gian phân tích mẫu từ chuẩn bị mẫu, phân tích và đưa ra kết quả trong khoảng 60 phút. Đây là thời gian hợp lý để phân tích mẫu.

4. KẾT LUẬN

Nghiên cứu đã phát triển thành công một phương pháp để phát hiện, định lượng gelsemin trong máu bằng LLE và sắc ký lỏng khối phổ. LLE nhanh, đơn giản và

rẻ tiền hơn so với SPE nên được lựa chọn để xử lý mẫu. Chương trình pha động tối ưu cũng đã được xác định. Kết quả thẩm định cho thấy phương pháp có độ nhạy tốt, độ tin cậy cao và khả năng phát hiện được chất phân tích đến nồng độ ng/ml. Phương pháp đã được áp dụng để phân tích 6 mẫu máu của người nghi ngờ bị ngộ độc alkaloid cây lá ngón. Kết quả cho thấy phương pháp phù hợp cho nghiên cứu xác định gelsemin trong máu, quy trình này có thể ứng dụng để xác định nguyên nhân ngộ độc và hiệu quả điều trị trong lâm sàng cũng như giám định pháp y.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Viện Dược Liệu (2014), *Cây thuốc và động vật làm thuốc ở Việt Nam*, tập 2, Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật, Hà Nội, 133-135
2. Đặng Đức Khanh, Trần Việt Hùng, Phạm Quốc Chính (2012), Phân tích koumine và gelsemine bằng phương pháp sắc ký khí khối phổ, *Tạp chí Y học Quân Sự*, số 280, 51-55
3. Hongqiang Qiu, Changxi Yu, Yu Cheng, Wancai Que, Xiaofang Zeng, Hui Wang, Maobai Liu (2019), “Simultaneous Determination of Koumine and Gelsemine in Human Plasma Using HPLC-UV Assay and Its Clinical Application, Current”, *Pharmaceutical Analysis*, 15(6), 640 – 649
4. Chi-Kong Lai and Yan-Wo Chan (2009), “Confirmation of Gelsemium Poisoning by Targeted Analysis of Toxic Gelsemium Alkaloids in Urine”, *Journal of Analytical Toxicology*, Vol. 33, 56-61
5. Dong Qu, Dong-Fang Qiao, Xun-Cai Chen, Chun-Qiong Feng, Qi-Zhi Luo, Xiao-Hui Tan (2021), “Fatal poisoning by accidental ingestion of the “heartbreak grass” (*Gelsemium elegans*) verified by toxicological and medico-legal analyses”, *Forensic Science International*, 321, 110745.
6. ANSI/ASB Standard 036 (2019), “Standard Practices for Method Validation in Forensic Toxicology”.
7. The United States - Food and Drug Administration (2018), *Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation*.

SUMMARY

Gelsemium elegans Benth. is a plant belonging to the genus *Gelsemium* (family *Gelsemiaceae*). *G. elegans* is a well-known toxic plant and its main components are alkaloids. Gelsemine is the principle alkaloid in *G. Elegans*. In this study, a specific, sensitive and accurate liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) has been established for the determination of gelsemine in whole blood. The low limit of detection (LOD) was 0,01 ng/ml for gelsemine. This method was applied to analyze six whole blood samples of six people who were suspected of ingesting *Gelsemium elegans*.

(Ngày nhận bài: 21/11/2022; Ngày phản biện: 16/02/2023; Ngày duyệt đăng: 09/03/2023)

XÂY DỰNG PHƯƠNG PHÁP ĐỊNH LƯỢNG ĐỒNG THỜI METFORMIN VÀ EMPAGLIFLOZIN TRONG HUYẾT TƯƠNG NGƯỜI BẰNG PHƯƠNG PHÁP LC-MS/MS

NGUYỄN THỊ KIỀU ANH

Trường Đại học Dược Hà Nội

PHẠM THANH HUYỀN, NGUYỄN THỊ DUNG, LÊ THỊ LA,
PHAN THỊ NGHĨA, NGUYỄN THỊ LIÊN[✉]

Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương

Từ khóa: Metformin, Empagliflozin, tương đương sinh học, huyết tương, LC-MS/MS.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Metformin (MET) thuộc nhóm biguanide có tác dụng chống tăng glucose máu, làm giảm cả đường huyết nền và sau bữa ăn [1]. Empagliflozin (EMP) ức chế mạnh và thuận nghịch kênh đồng vận chuyển Na-glucose 2 (SGLT2), vị trí chính của quá trình tái hấp thu glucose ở thận, từ đó làm giảm nồng độ glucose trong máu [2]. Hiện nay, một số doanh nghiệp dược trong nước đã và đang nghiên cứu sản xuất các chế phẩm chứa hỗn hợp metformin và empagliflozin nên nhu cầu về đánh giá sinh khả dụng và thử tương đương sinh học ngày càng nhiều. Do đó, cần phải xây dựng được phương pháp định lượng hai hoạt chất này trong huyết tương đáp ứng các quy định hiện hành. Chúng tôi đã tiến hành nghiên cứu xây dựng phương pháp định lượng đồng thời metformin và empagliflozin trong huyết tương người bằng phương pháp sắc ký lỏng ghép nối đầu dò khối phổ (LC-MS/MS) phục vụ công tác đánh giá sinh khả dụng và tương đương sinh học của các chế phẩm có chứa metformin và empagliflozin.

2. THỰC NGHIỆM

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

2.1.1. Thiết bị, dụng cụ

- *Thiết bị:* Máy sắc ký lỏng khối phổ TSQ vantage (Thermo - Mỹ); cân phân tích (Mettler Toledo - Thụy Sĩ, độ chính xác $d = 0,01$ mg); tủ lạnh sâu -35°C (Panasonic - Nhật Bản); máy ly tâm lạnh (Sigma 4-16KS - Đức); máy cô bay hơi dung môi dùng khí nitơ, máy lắc xoay, máy lọc nước...

- *Dụng cụ:* Bình định mức, ống chiết thủy tinh, ống ly tâm 2 ml...

2.1.2. Hóa chất, chất chuẩn

- *Chất chuẩn:*

+ Metformin hydroclorid (MET) – chất chuẩn của Viện Kiểm nghiệm thuốc TW, SKS: C0320208.03, hàm lượng 99,5 % tính theo nguyên trạng.

+ Empagliflozin (EMP) – chất chuẩn của TLC pharmaceutical standards, SKS: 1744-078A1, hàm lượng 99,2 % tính theo nguyên trạng.

+ Metformin-d6 hydroclorid (MET-d6) – chất chuẩn của TRC, SKS: 4-ELZ-101-5, hàm lượng 97,0 % tính theo nguyên trạng. Metformin-d6 hydroclorid được sử dụng làm chuẩn nội (IS) của MET.

+ Empagliflozin-d4 (EMP-d4) – chất chuẩn của TRC, SKS: 23-MVI-41-2, hàm lượng 98,0 % tính theo nguyên trạng. Empagliflozin-d4 được sử dụng làm chuẩn nội của EMP.

- *Dung môi, hóa chất:* Đạt tiêu chuẩn tinh khiết dùng cho phân tích hoặc sắc ký HPLC và LCMS

- *Huyết tương trắng:* Huyết tương không có MET, EMP của Bệnh viện TW Quân đội 108

2.2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Đối tượng nghiên cứu

Mẫu huyết tương trắng, mẫu huyết tương tự tạo chứa chuẩn MET, EMP và mẫu huyết tương của người tình nguyện uống viên nén bao phim empagliflozin 12,5 mg/metformin hydroclorid 1000 mg trong nghiên cứu đánh giá TĐSH.

2.2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.2.1. Điều kiện sắc ký

Quá trình sắc ký được thực hiện trên cột pha đảo Hypersil Gold C8 (50 x 2,1 mm; 1,9 μm); tốc độ dòng 0,2 ml/phút, sử dụng pha động là hỗn hợp acetonitril – dung dịch amoni bicarbonate 7,5 mM tỷ lệ 35:65 (tt/tt), thể tích tiêm mẫu 20 μl ; nhiệt độ buồng tiêm mẫu: nhiệt độ phòng

2.2.2.2. Điều kiện khối phổ

Kiểu khối phổ hai lần (MS/MS), nguồn ion hóa ESI (+); điện thế đầu phun: 3200 V; nhiệt độ đầu phun: 100 °C; áp suất khí mang, khí hỗ trợ, khí quét ion lần lượt là 30 psi, 5 psi và 1 psi; nhiệt độ mao quản vận chuyển ion là 360 °C; cặp ion hóa đặc trưng 130,1 → 71,1 đối với MET, 468,2 → 355,0 đối với EMP, 136,1 → 77,1 đối với MET-d6 và 472,2 → 359,0 đối với EMP-d4; năng lượng phân mảnh 20 V đối với MET và MET-d6; 16V đối với EMP và EMP-d4.

2.2.2.3. Phương pháp chuẩn bị mẫu

- Dung dịch chuẩn gốc: dung dịch chuẩn gốc và chuẩn nội gốc riêng biệt trong methanol có nồng độ MET, IS-MET, EMP và IS-EMP là 500 µg/ml.

- Dung dịch chuẩn nội làm việc: chuẩn bị dung dịch chuẩn nội làm việc trong hỗn hợp methanol - nước tỷ lệ 1:1 (tt/tt) có nồng độ EMP-d4 và MET-d6 lần lượt là 2 µg/ml và 5 µg/ml.

- Chuẩn bị dãy đường chuẩn và mẫu kiểm tra làm việc trong hỗn hợp methanol - nước tỷ lệ 1:1 (tt/tt): dãy đường chuẩn làm việc chứa cả 2 hoạt chất MET và EMP có nồng độ lần lượt là 300; 600; 1500; 3000; 12000; 30000; 50400; 60000 ng/ml đối với MET và 30; 60; 150; 300; 1200; 3000; 5040; 6000 ng/ml đối với EMP. Các dung dịch mẫu kiểm tra làm việc được chuẩn bị độc lập ở 3 mức nồng độ: LQC (900 ng/ml đối với MET và 90 ng/ml đối với EMP); MQC (24000 ng/ml đối với MET và 2400 ng/ml đối với EMP); HQC (45000 ng/ml đối với MET và 4500 ng/ml đối với EMP).

- Chuẩn bị dãy đường chuẩn và mẫu kiểm tra trong huyết tương: Hút 15 µl từng dung dịch chuẩn làm việc và 285 µl huyết tương trắng thu được dãy đường chuẩn trong huyết tương chứa cả 2 hoạt chất MET và EMP có nồng độ lần lượt là 15; 30; 75; 150; 600; 1500; 2520; 3000 ng/ml đối với MET và 1,5; 3; 7,5; 15; 60; 150; 252; 300 ng/ml đối với EMP. Mẫu kiểm tra LQC, MQC, HQC trong huyết tương có nồng độ lần lượt là 45; 1200; 2250 ng/ml đối với MET và 4,5; 120; 225 ng/ml đối với EMP.

2.2.2.4. Phương pháp xử lý mẫu trong huyết tương

Hút 0,3 ml mẫu huyết tương, thêm 20 µl chuẩn nội làm việc và 1 ml acetonitril, lắc xoáy 5 giây. Ly tâm 9000 vòng/phút trong 5 phút. Cho mẫu vào tủ âm sâu -70 °C. Sau 15 phút, lấy mẫu ra khỏi tủ âm sâu và rửa đông ở nhiệt độ phòng trong 10 phút. Hút 0,9 ml lớp dịch trong phía trên sang ống chiết khác. Bốc hơi dung môi dưới dòng khí nitơ thu cần. Hòa tan cần trong

0,4 ml hỗn hợp acetonitril - amoni bicarbonat 7,5 mM tỷ lệ 2:8 (tt/tt), chuyển lọ tiêm sắc ký.

2.2.2.5. Phương pháp tính kết quả

Xác định nồng độ MET và EMP có trong các mẫu thử chưa biết nồng độ dựa vào tỷ lệ diện tích pic MET/IS-MET; EMP/IS-EMP thu được từ sắc đồ của mẫu thử và đường chuẩn tương ứng phân tích trong cùng điều kiện.

2.2.3. Thẩm định phương pháp

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

3. KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN

3.1. Xây dựng phương pháp phân tích

3.1.1 Tối ưu hóa điều kiện khối phổ

Khảo sát điều kiện khối phổ ở chế độ ion hóa ESI (+) và ESI (-). Do có tính chất của một bazơ mạnh nên MET chỉ bị ion hóa ở chế độ ion dương dưới dạng $[M+H]^+$ có $m/z = 130,1$, còn EMP lại có cường độ tín hiệu ở chế độ ion dương cao hơn ion âm. Dạng ion hóa $[M+NH_4]^+$ của EMP có $m/z = 468,2$ cho cường độ tín hiệu cao hơn dạng $[M+H]^+$. Do đó, chế độ ion hóa ESI (+) và mảnh phổ ion mẹ có $m/z = 130,1$ với MET và $m/z = 468,2$ với EMP được lựa chọn để khảo sát các điều kiện tiếp theo gồm xác định ion con, thế thấu kính hội tụ và năng lượng bắn phá.

3.1.2 Tối ưu hóa điều kiện sắc ký

Tiến hành khảo sát với các điều kiện sắc ký khác nhau, bao gồm sử dụng cột Hypersil Gold C18 (50 x 2,1 mm; 1,9 µm); cột Hypersil Gold C8 (50 x 2,1 mm; 1,9 µm); cột Luna C18(2)-HST (50 x 3 mm; 2,5 µm); cột Acquity C18 (50 x 2,1 mm; 1,7 µm) trên các hệ pha động khác nhau MeOH-dung dịch acid formic, MeCN-dung dịch acid formic, MeCN-dung dịch amoni acetat, MeCN-dung dịch amoni bicarbonat với các tỷ lệ và nồng độ, pH các dung dịch đệm khác nhau. Kết quả thực nghiệm cho thấy sử dụng pha động acetonitril - dung dịch amoni bicarbonat 7,5 mM tỷ lệ 35 : 65 (tt/tt) cho đáp ứng của EMP cao và ổn định nhất, hình dáng pic cả MET và EMP cân đối, thời gian phân tích hợp lý.

3.1.3 Lựa chọn chuẩn nội

Trong phương pháp phân tích bằng sắc ký lỏng khối phổ, chất nội chuẩn được ưu tiên lựa chọn là các chất đồng vị ổn định do có tính chất hóa lý gần như tương tự chất phân tích giúp giảm thiểu tối đa sai số trong cả quá

trình xử lý mẫu và phân tích mẫu trên thiết bị phân tích. Vì vậy, tiến hành lựa chọn metformin-d6 là chuẩn nội cho MET và empagliflozin-d4 là chuẩn nội cho EMP.

3.1.4 Xác định giới hạn định lượng dưới và khoảng tuyến tính

Khoảng tuyến tính là khoảng nồng độ của chất phân tích từ giá trị thấp nhất (LLOQ) đến giá trị cao nhất (ULOQ). Các giá trị LLOQ và ULOQ của khoảng tuyến tính của phương pháp được xác định dựa trên các thông số được động học của MET và EMP. Ở mức liều sử dụng một viên nén kết hợp 1000 mg metformin hydroclorid và 12,5 mg empagliflozin có nồng độ tối đa (C_{max}) trong huyết tương người khoảng 1500 ng/ml đối với metformin và 150 ng/ml đối với empagliflozin [3], [4]. Do đó, xác định giá trị ULOQ khoảng 2 lần giá trị C_{max} . Qua các tài liệu tham khảo [1], [2], [3], [4] và dựa trên đáp ứng của thiết bị phân tích đã xác định giá trị LLOQ của phương pháp đối với MET là 15 ng/ml và EMP là 1,5 ng/ml.

3.1.5 Lựa chọn phương pháp xử lý mẫu

Xử lý mẫu huyết tương có 3 phương pháp chính là tủa protein (PPT), chiết lỏng - lỏng (LLE) và chiết pha rắn (SPE). Do đặc tính thân nước của MET nên không lựa chọn phương pháp chiết lỏng - lỏng. Phương pháp chiết pha rắn có giá thành cao, qui trình thực hiện phức tạp trong khi phương pháp tủa protein có ưu điểm nhanh, đơn giản, tiết kiệm chi phí. Do đó, phương pháp tủa protein được lựa chọn để xử lý mẫu huyết tương. Bên cạnh đó, phương pháp tủa protein lại có nhược

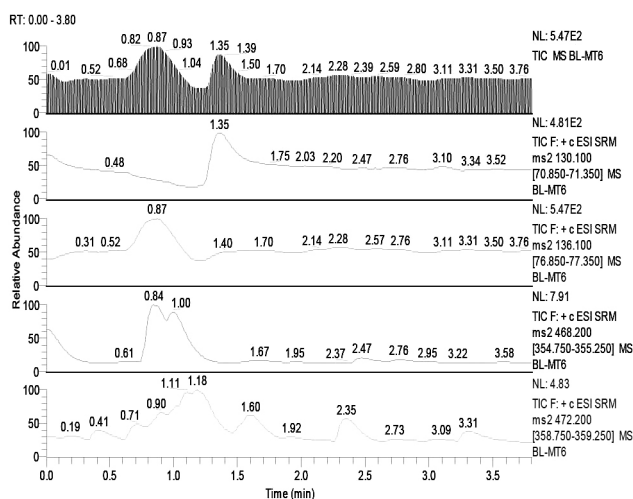
điểm là mẫu bị pha loãng, ảnh hưởng đến giới hạn định lượng của phương pháp đặc biệt là khi EMP có giới hạn dưới thấp. Hơn nữa, mẫu huyết tương sau khi tủa protein vẫn còn chứa các chất khác như phospholipid, triglycerid có thể ảnh hưởng đến quá trình phân tích trên thiết bị LCMS. Đông lạnh mẫu huyết tương sau khi tủa giúp loại bỏ các chất này. Sau khi cho mẫu vào tủ âm sâu -70 °C trong 15 phút, mẫu được rã đông ở nhiệt độ phòng trong khoảng 10 phút, lúc này các thành phần như phospholipid, triglycerid lắng xuống phía dưới tạo thành lớp đục, mờ. Hút lớp dung dịch trong phía trên đem cô bay hơi làm giàu mẫu, tăng giới hạn phát hiện của phương pháp.

3.2. Thẩm định phương pháp phân tích

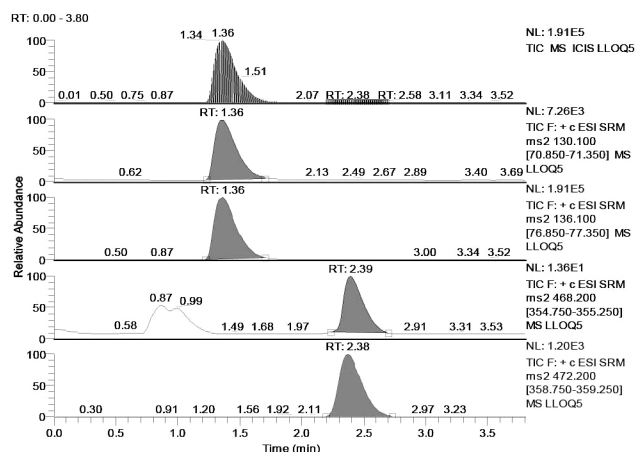
3.2.1. Độ đặc hiệu – chọn lọc của phương pháp

Phân tích các mẫu huyết tương (HT) trắng và các mẫu HT tự tạo chứa chuẩn nội và MET, EMP với nồng độ tương ứng là 15,0 ng/ml; 1,5 ng/ml (mẫu LLOQ) theo phương pháp đã được xây dựng.

Trên sắc ký đồ (SKĐ) của mẫu HT trắng (Hình 1), không xuất hiện các pic tại thời điểm 1,36 phút (tương ứng với thời gian lưu của MET, MET-d6); 2,38 phút và 2,39 phút (tương ứng với thời gian lưu của EMP-d4 và EMP) như trên SKĐ mẫu chuẩn (Hình 2). Do vậy, phương pháp phân tích có độ đặc hiệu - chọn lọc với MET, EMP và các chất chuẩn nội theo các quy định của phương pháp phân tích thuốc trong dịch sinh học [5]



Hình 1. Sắc ký đồ mẫu huyết tương trắng



Hình 2. Sắc ký đồ mẫu huyết tương tự tạo chứa chuẩn MET (15,0 ng/ml), EMP (1,5 ng/ml) và chuẩn nội

3.2.2. Đường chuẩn và khoảng tuyến tính

Phân tích 5 đường chuẩn riêng biệt trong huyết tương chứa MET có nồng độ từ 15 ng/ml đến 3000 ng/ml và EMP có nồng độ từ 1,5 ng/ml đến 300 ng/ml theo phương pháp đã xây dựng. Xác định sự tương quan giữa

nồng độ MET, EMP có trong mẫu và tỷ lệ diện tích pic tương ứng MET/IS-MET; EMP/IS-EMP bằng phương pháp hồi quy tuyến tính, sử dụng trọng số (1/nồng độ²). Kết quả xác định mối tương quan tuyến tính giữa nồng độ và tỷ lệ diện tích pic được trình bày trong Bảng 1.

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

Chất phân tích	MET	EMP
Cđiểm chuẩn (ng/mL)	15; 30; 75; 150; 600; 1500; 2520; 3000	1,5; 3; 7,5; 15; 60; 150; 252; 300
Độ đúng tất cả các điểm chuẩn (%)	90,9 – 109,4	87,1 – 113,2
Phương trình hồi quy	Y = 0,00178*X + 0,00667; r = 0,9985 Y = 0,00175*X + 0,00597; r = 0,9982 Y = 0,00184*X + 0,00454; r = 0,9986 Y = 0,00189*X + 0,00264; r = 0,9988 Y = 0,00177*X + 0,00740; r = 0,9985	Y = 0,01059*X + 0,00010; r = 0,9985 Y = 0,00996*X - 0,00149; r = 0,9962 Y = 0,01079*X - 0,00688; r = 0,9989 Y = 0,01118*X - 0,00678; r = 0,9973 Y = 0,01043*X - 0,00476; r = 0,9958

Kết quả thẩm định cho thấy trong khoảng nồng độ đã xây dựng có sự tương quan tuyến tính giữa nồng độ MET, EMP với tỷ lệ diện tích pic tương ứng MET/IS-MET; EMP/IS-EMP với hệ số tương quan xấp xỉ bằng 1. Nồng độ MET, EMP xác định từ đường chuẩn so với giá trị thực nằm trong giới hạn cho phép (80 % - 120 % đối với nồng độ thấp nhất, 85 % - 115 % đối với các nồng độ còn lại) theo qui định của phương pháp phân tích thuốc

trong dịch sinh học [5].

3.2.3. Giới hạn định lượng dưới của phương pháp

Phân tích các mẫu zero (mẫu HT chỉ chứa chuẩn nội) và mẫu HT chứa MET và EMP với nồng độ tương ứng là 15 ng/ml và 1,5 ng/ml (mẫu LLOQ) trên 3 lô mẫu, mỗi lô gồm 6 mẫu. 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

Chất phân tích	MET			EMP		
Lô	Lô 1	Lô 2	Lô 3	Lô 1	Lô 2	Lô 3
Đáp ứng mẫu zero (n = 1)	7666	3420	10822	9	0	1
Đáp ứng trung bình mẫu LLOQ (n = 6)	78625	75668	83946	177	174	182
Tỷ lệ LLOQ/Zero	10,3	22,1	7,8	20,3	-	192,6
Độ đúng (%) (n = 6)	100,9	101,9	104,8	119,7	95,2	119,0
CV (%) (n = 6)	3,9	2,4	7,0	14,8	9,9	18,2
Độ đúng (%) (n = 18)	102,5			111,3		
CV (%) (n = 18)	4,9			17,9		

Kết quả thẩm định cho thấy, tại thời điểm tương ứng với thời gian lưu của MET và EMP đáp ứng pic trung bình của mẫu LLOQ gấp hơn 5 lần đáp ứng pic của mẫu zero. Độ đúng trung bình của từng lô và của 3 lô khác nhau đều nằm trong khoảng 80 % – 120 % so với nồng độ thực; độ chính xác của từng lô và của 3 lô khác nhau đều nhỏ hơn 20 %, đáp ứng yêu cầu giới hạn định lượng dưới của phương pháp phân tích thuốc trong dịch sinh học [5].

3.2.4. Xác định độ đúng, độ chính xác của phương pháp

Tiến hành thẩm định độ đúng, độ chính xác trên 4 mức nồng độ LLOQ, LQC, MQC và HQC, mỗi mức nồng độ chuẩn bị 6 mẫu. Thực hiện trên 3 ngày khác nhau. Xác định nồng độ MET và EMP có trong các mẫu bằng đường chuẩn phân tích trong cùng điều kiện. Kết quả xác định độ đúng, độ chính xác của phương pháp được trình bày ở Bảng 3 và Bảng 4.

Bảng 3. Kết quả thẩm định độ đúng, độ chính xác trong ngày và khác ngày (đối với MET)

Độ đúng, Độ chính xác	LLOQ (15 ng/ml)		LQC (45 ng/ml)		MQC (1200 ng/ml)		HQC (2250 ng/ml)	
	Độ đúng (%)	CV%	Độ đúng (%)	CV%	Độ đúng (%)	CV%	Độ đúng (%)	CV%
Ngày 1 (n = 6)	100,9	3,9	101,8	1,8	101,5	2,2	103,2	0,8
Ngày 2 (n = 6)	101,9	2,4	98,3	1,0	98,2	1,6	98,5	2,1
Ngày 3 (n = 6)	104,8	7,0	98,9	2,1	96,3	2,3	95,1	1,6
Khác ngày (n = 18)	102,5	4,9	99,7	2,2	98,9	2,7	98,9	3,7

Bảng 4. Kết quả thẩm định độ đúng, độ chính xác trong ngày và khác ngày (đối với EMP)

Độ đúng, Độ chính xác	LLOQ (1,5 ng/ml)		LQC (4,5 ng/ml)		MQC (120 ng/ml)		HQC (225 ng/ml)	
	Độ đúng (%)	CV%	Độ đúng (%)	CV%	Độ đúng (%)	CV%	Độ đúng (%)	CV%
Ngày 1 (n = 6)	119,7	14,8	101,8	10,4	98,6	2,5	102,6	1,5
Ngày 2 (n = 6)	95,2	9,9	99,1	9,0	98,9	3,7	97,1	2,0
Ngày 3 (n = 6)	119,0	18,2	109,7	12,4	95,4	3,4	94,1	1,8
Khác ngày (n = 18)	111,3	17,9	103,5	11,1	97,6	3,5	97,9	4,1

Kết quả thẩm định cho thấy ở các khoảng nồng độ thấp; trung bình và cao, phương pháp có độ đúng trong ngày, khác ngày đều nằm trong khoảng 85 – 115 % (ngoại trừ mẫu LLOQ nằm trong khoảng 80 – 120 %), độ chính xác trong ngày, khác ngày với giá trị CV < 15 % (ngoại trừ mẫu LLOQ với CV < 20 %); đáp ứng các yêu cầu về độ đúng, độ lặp lại của phương pháp phân tích thuốc trong dịch sinh học theo hướng dẫn của US-FDA [5].

3.2.5. Độ ổn định của dược chất trong huyết tương và trong quá trình xử lý mẫu

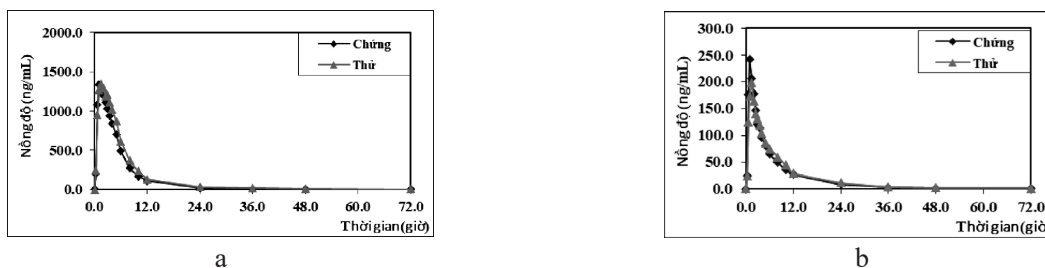
Tiến hành nghiên cứu độ ổn định của MET, EMP trong HT tại 2 mức nồng độ LQC và HQC. Riêng độ ổn định autosampler được đánh giá trên 3 mức nồng độ LQC, MQC và HQC. Đánh giá độ ổn định của dược chất bằng cách so sánh nồng độ MET, EMP có trong mẫu được bảo quản ở những điều kiện nhất định với nồng độ thực tế. Kết quả nghiên cứu độ ổn định được trình bày trong Bảng 5.

Bảng 5. Kết quả nghiên cứu độ ổn định của MET, EMP

Độ ổn định	Mẫu	Nồng độ trung bình (ng/ml; n = 6)		Độ ổn định (%)		CV (%)	
		MET	EMP	MET	EMP	MET	EMP
5 chu kỳ đông – rã đông	LQC	42,4	4,5	94,2	99,8	1,5	10,6
	HQC	2192,3	231,7	97,4	103,0	2,7	4,2
Độ ổn định thời gian ngắn (6 giờ; nhiệt độ phòng)	LQC	44,2	4,4	98,1	97,9	3,4	11,5
	HQC	2216,5	229,2	98,5	101,9	2,6	3,4
Độ ổn định thời gian dài (81 ngày; -35 °C)	LQC	40,9	4,3	90,9	94,5	6,2	6,5
	HQC	2138,5	198,2	95,0	88,1	9,9	7,3
Độ ổn định trong autosampler (185 giờ 56 phút; nhiệt độ phòng)	LQC	43,9	4,3	97,5	96,5	1,0	4,1
	MQC	1166,2	121,6	97,2	101,3	2,4	3,5
	HQC	2160,5	220,8	96,0	98,1	2,2	1,7
Độ ổn định cần sau bốc hơi (3 giờ; nhiệt độ phòng)	LQC	47,1	4,7	104,7	103,4	2,0	9,9
	HQC	2256,4	220,8	100,3	98,1	0,8	2,4

3.3 Ứng dụng phương pháp đã xây dựng định lượng nồng độ metformin và empagliflozin trong mẫu huyết tương người tình nguyện

Áp dụng phương pháp đã xây dựng để định lượng đồng thời nồng độ MET và EMP trong huyết tương người tình nguyện sau khi uống 01 viên nén bao phim empagliflozin 12,5 mg/metformin hydroclorid 1000 mg. Lấy mẫu máu tại các thời điểm: 0 giờ (trước khi uống thuốc) và 0,33 (20 phút); 0,67 (40 phút); 1,00; 1,50; 2,00; 2,50; 3,00; 3,50; 4,00; 5,00; 6,00; 8,00; 10,00; 12,00; 24,00; 36,00; 48,00; 72,00 giờ sau khi uống thuốc. Hình 3 biểu diễn đường cong nồng độ thuốc theo thời gian của 01 người tình nguyện trong nghiên cứu



Hình 3: Đường cong nồng độ – thời gian đối với MET (a) và EMP (b)

Kết quả phân tích trên NTN cho thấy, các nồng độ MET, EMP đều nằm trong khoảng đường chuẩn xây dựng chứng tỏ pháp đã xây dựng có khoảng tuyến tính phù hợp, độ đúng – độ chính xác cao và khả năng ứng dụng thực tế trong các nghiên cứu sinh khả dụng và tương đương sinh học.

4. KẾT LUẬN

Nghiên cứu đã xây dựng được phương pháp định lượng đồng thời metformin và empagliflozin trong huyết

tương người bằng UPLC/MS-MS với giá trị giới hạn định lượng dưới lần lượt là 15 ng/ml và 1,5 ng/ml; khoảng tuyến tính lần lượt là 15 ng/ml đến 3000 ng/ml và 1,5 ng/ml đến 300 ng/ml; độ đúng và độ chính xác đáp ứng yêu cầu đối với phương pháp phân tích thuốc trong dịch sinh học của US-FDA. Thời gian phân tích mỗi mẫu là 3,8 phút, phù hợp khi phân tích số lượng mẫu lớn. Phương pháp phân tích có thể ứng dụng trong các nghiên cứu đánh giá sinh khả dụng và tương đương sinh học chế phẩm chứa cả hai dược chất metformin và empagliflozin.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Bộ Y tế (2018), *Dược thư quốc gia Việt Nam*, Nhà xuất bản Y học, trang 955-956.
2. Boehringer Ingelheim Limited, Synjardy 12.5 mg/1,000 mg film-coated tablets.
3. Boehringer Ingelheim (2013), “Bioequivalence of empagliflozin/metformin fixed dose combination tablets compared to single tablets administered together in healthy male and female volunteers under fed and fasted conditions (an open-label, randomised, singledose, crossover study)”.
4. Wattamwar T., Mungantiwar A., Halde S., Pandita N. (2020), “Development of simultaneous determination of empagliflozin and metformin in human plasma using liquid chromatography–mass spectrometry and application to pharmacokinetics”, *European Journal of Mass Spectrometry*, 26 (2), pp.117 – 130.
5. U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration (2018): *Guidance for Industry - Bioanalytical Method Validation*.

SUMMARY

A high throughput and specific method using ultra performance liquid chromatography tandem mass spectrometry for simultaneous determination of metformin and empagliflozin in human plasma was developed. Metformin-d6 (MET-d6) and empagliflozin-d4 (EMP-d4) were utilized as internal standards. Extraction of the analytes from the human plasma was performed through acetonitrile precipitation technique. Chromatographic analysis was developed on a C8 column (dimension 50 x 2.1 mm, particle 1.9 μ m) with isocratic elution at a flow rate of 0.2 ml/min using a mobile phase of 7.5 mM ammonium bicarbonate : acetonitril (65 : 35, v/v). The Thermo vantage UPLC-MS/MS was operated under the multi reaction-monitoring mode using the positive ion mode, with transitions at (m/z) 130.1 $\rightarrow$ 71.1 for (MET), 468.2 $\rightarrow$ 355.0 for (EMP), 136.1 $\rightarrow$ 77.1 for (MET-d6), and 472.2 $\rightarrow$ 359.0 for (EMP-d4). The obtained linearity covered the concentration ranges of 15 – 3000 ng/mL and 1.5 – 300.0 ng/mL for MET and EMP, respectively. Total run time was 3.8 min only. This method can be used for BA-BE studies of metformin and empagliflozin combination preparations.

(Ngày nhận bài: 14/02/2023; Ngày phản biện: 16/02/2023; Ngày duyệt đăng: 13/03/2023)

XÁC ĐỊNH ĐỒNG THỜI 10 CHẤT CÓ TÁC DỤNG CHỐNG NẮNG TRONG MẪU MỸ PHẨM DẠNG KEM BẰNG PHƯƠNG PHÁP HPLC – DAD

TÓNG THỊ THANH VƯỢNG

Trường Đại học Dược Hà Nội

NGUYỄN VĂN HẢI, LÊ VĂN ĐẠT
NGÔ THỊ DUYÊN, LÊ QUANG THẢO✉
Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương

Từ khóa: *Chất chống nắng, mỹ phẩm dạng kem, HPLC-DAD*

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Kem chống nắng đã được sử dụng từ những năm 1970 để bảo vệ da khỏi tác hại từ ánh nắng mặt trời [1], giúp giảm nguy cơ cháy nắng, sạm da và ung thư da [2] [3]. Tuy nhiên, một vài nghiên cứu gần đây cho thấy một số chất chống nắng hữu cơ trong kem chống nắng có thể gây ảnh hưởng đến sức khỏe con người và môi trường sống như ảnh hưởng đến nguồn nước, đến chuỗi thức ăn và nguy cơ tẩy trắng các rạn san hô [3]. Để đảm bảo an toàn cho người sử dụng, cơ quan quản lý các nước như ASEAN, Châu Âu hay Mỹ đã ban hành danh mục các chất chống nắng (CCN) được phép sử dụng trong mỹ phẩm kèm theo điều kiện áp dụng và giới hạn về hàm lượng [4] [5].

Hiện nay, có nhiều loại mỹ phẩm chứa chất chống nắng, trong đó mỹ phẩm dạng kem chiếm một tỷ lệ lớn, được phân phối rất phổ biến trên thị trường Việt Nam với nguồn gốc, xuất xứ rất đa dạng. Tuy nhiên, chưa có nghiên cứu thực nghiệm nào được tiến hành để xác định hàm lượng thực các chất chống nắng trong mỹ phẩm so với công bố trên bao bì, nhãn mác cũng như so với

giới hạn về hàm lượng, nồng độ sử dụng được quy định, khuyến cáo nhằm đảm bảo hiệu quả sử dụng cũng như an toàn sức khỏe cho người dùng.

Xuất phát từ thực tế trên, chúng tôi đã tiến hành thực hiện đề tài “*Xác định đồng thời 10 chất có tác dụng chống nắng trong mẫu mỹ phẩm dạng kem bằng phương pháp HPLC – DAD*” để góp phần phục vụ cho công tác kiểm tra chất lượng mỹ phẩm ở Việt Nam.

2. THỰC NGHIỆM

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

2.1.1. Thiết bị, dụng cụ

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

2.1.2. Hóa chất, chất chuẩn

- Chất chuẩn: Thông tin các chất chuẩn sử dụng trong quá trình nghiên cứu được thể hiện ở Bảng 1.

Bảng 1. Thông tin các chất chuẩn sử dụng

STT	Tên chất chuẩn	Viết tắt	Nguồn gốc	Số lô	Hàm lượng (%)
1	Benzophenon-4	BZP-4	Sigma	09649-10G	98,5 ^(*)
2	Oxybenzon (Benzophenon-3)	BZP-3	Sigma	LRAB3268	99,96
3	4-Methylbenzyliden camphor	MBC	Toronto	2-LWJ-67-1	98,0
4	Octocrylen	OTC	Sigma	LRAB3748	99,5
5	Menthyl anthranilat	MAN	Sigma	LRACD702	98,7
6	Octyl dimethyl PABA	ODP	Accustand	23172	99,3
7	Butyl methoxydibenzoylmethan	BDM	Supelco	LRAC3159	98,4
8	Octyl methoxycinnamat	OMC	Supelco	LRAC3165	99,5
9	Octyl salicylat	OS	Supelco	LRAC3040	99,8
10	Homosalat	HMS	LGC	G164621	98,86

Ghi chú: ^(*): Độ ẩm 1,9 %, các chất khác tinh theo nguyên trạng.

- *Dung môi (methanol, ethanol)*: Đạt tiêu chuẩn tinh khiết dùng cho HPLC.

- *Hóa chất (natri acetat, acid acetic)*: đạt tiêu chuẩn tinh khiết dùng cho phân tích.

- *Dung dịch đệm natri acetat pH 3,85*: Hòa tan 380 mg natri acetat vào 900 ml nước, điều chỉnh đến pH 3,85 bằng acid acetic, thêm nước đến 1000 ml.

2.2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Đối tượng nghiên cứu

- *Mẫu placebo*: Là mẫu kem chống nắng không chứa các chất chống nắng cần nghiên cứu, được cung cấp bởi Công ty Cổ phần Dược phẩm Gia Nguyễn.

- *Mẫu tự tạo*: Là mẫu placebo có chứa các chất chống nắng ở các nồng độ khác nhau.

- *Mẫu thử*: Một số mẫu mỹ phẩm chống nắng dạng kem có mặt trên thị trường.

2.2.2. Phương pháp nghiên cứu

Dựa trên các tài liệu tham khảo [1][2], nghiên cứu khảo sát lựa chọn phương pháp phân tích các chất trên các hệ pha động khác nhau, các cột phân tích khác nhau với nhiều tốc độ dòng và bước sóng phát hiện để chọn điều kiện phân tích tối ưu.

2.2.3. Phương pháp chuẩn bị mẫu

Dựa trên tính chất lý hóa của các CCN và tham khảo tài liệu, nghiên cứu lựa chọn phương pháp chuẩn bị mẫu như sau:

- *Dung môi pha mẫu*: Hỗn hợp methanol : Dung dịch đệm natri acetat pH 3,85 (80:20).

- *Dung dịch chuẩn*:

+ *Dung dịch chuẩn hỗn hợp gốc 1*: Cân 59,88 mg BZP-4, 49,40 mg OTC, 29,71 mg OMC và 20,01 mg mỗi chất chuẩn BZP-3, 20,19 mg MBC và 21,10 mg ODP vào bình định mức 20 ml. Hòa tan và thêm vừa đủ đến vạch bằng methanol.

+ *Dung dịch chuẩn hỗn hợp gốc 2*: Cân 10,04 mg BDM và 19,76 mg MAN, 19,96 mg OS, 21,04 mg HMS vào bình định mức 20 ml, thêm 2,0 ml *dung dịch chuẩn hỗn hợp gốc 1*, thêm 10 ml methanol, lắc siêu âm cho tan hoàn toàn. Thêm methanol vừa đủ đến vạch, lắc đều.

+ *Dãy dung dịch chuẩn*: Từ *dung dịch chuẩn hỗn hợp gốc 2*, pha loãng bằng dung môi pha mẫu để thu được từ 6 dung dịch chuẩn trở lên có nồng độ từ LOQ đến 100 lần nồng độ LOQ.

- *Dung dịch thử*: Cân chính xác khoảng 0,2 g mẫu kem vào cốc có mỏ 50 ml, thêm khoảng 20 ml dung môi

pha mẫu, dùng thìa thủy tinh phân tán đều kem trong cốc. Đặt trên cách thủy ở 60 °C trong 10 phút, thỉnh thoảng khuấy, lắc siêu âm 5 phút. Chuyển hỗn hợp vào bình định mức 50 ml, tráng rửa cốc 3 lần với dung môi pha mẫu, mỗi lần 5 ml. Để nguội, thêm dung môi pha mẫu vừa đủ đến vạch, lắc đều. Để trong nước đá 30 phút, ly tâm ở 10.000 vòng/phút trong 10 phút. Lọc lớp dịch trong qua màng lọc 0,45 µm.

3. KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN

3.1. Xây dựng quy trình phân tích

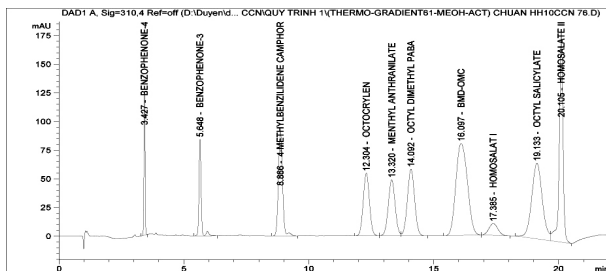
- *Khảo sát lựa chọn cột*: Khi dùng cột Thermo betasil C18 (125 x 4 mm, 5 µm), hai pic BDM và OMC đồng rửa giải. Khi dùng cột Agilent Poroshell 120 C18 (100 x 4,6 mm; 2,7 µm) 10 pic CCN tách khỏi nhau ($R_s \geq 1,8$), pic cân đối, thời gian phân tích khoảng 25 phút, phù hợp để xác định đồng thời 10 CCN (Hình 5, Hình 6).

- *Khảo sát pha động*: Tiến hành khảo sát trên các hệ pha động là hỗn hợp của dung môi hữu cơ (ACN, EtOH hoặc MeOH) và dung dịch đệm (acid phosphoric 0,1 M, acid acetic 0,1 % hoặc dung dịch đệm natri acetat pH 3,85). Kết quả cho thấy, khi sử dụng hệ pha động gồm MeOH và dung dịch đệm natri acetat pH 3,85 thì các pic CCN có hình dáng cân đối và khả năng tách tốt hơn so với các hệ còn lại. Khi tiến hành sắc ký với hệ pha động MeOH : Dung dịch đệm natri acetat pH 3,85 (70:30)) pic BZP-4 có dấu hiệu bị che pic và rửa giải sớm (t_R -BZP-4 $\approx$ 1 phút), hệ số phân giải giữa BDM và OMC còn thấp ($R_s = 1,5$) (Hình 2). Khi tiến hành sắc ký bằng chương trình gradient dung môi, các pic cân đối và tách hoàn toàn khỏi nhau ($R_s \geq 1,8$) (Hình 5, Hình 6). Do đó, chương trình gradient được lựa chọn để tiếp tục nghiên cứu.

- *Khảo sát tốc độ dòng*: Khi tiến hành sắc ký ở tốc độ dòng 1,0 ml/phút các pic rửa giải sớm, tuy nhiên hệ số phân giải giữa OTC và MAN $< 1,5$. Với tốc độ dòng nhỏ hơn 0,5 thì pic Homoslat trùng với khoảng thay đổi của pha động. Với tốc độ dòng 0,8 ml/phút, các pic CCN tách khỏi nhau với hệ số phân giải $R_s \geq 1,8$.

- *Lựa chọn bước sóng phân tích*:

Tham khảo các tài liệu [1] [2] và dựa trên sắc ký đồ thu được tại các bước sóng 300, 310 và 350 nm, chúng tôi chọn bước sóng phân tích đồng thời 10 CCN là 310 nm.



Hình 1. SKĐ 10 CCN khi sử dụng cột Thermo betasil C18 (125 x 4 mm, 5 μ m)

* Điều kiện sắc ký cho nghiên cứu:

- Phương pháp phân tích sử dụng kỹ thuật sắc ký lỏng pha đảo với detector DAD, cột Agilent Poroshell 120-C18 (100 x 4,6 mm; 2,7 μ m), tốc độ dòng 0,8 ml/phút, thể tích tiêm 20 μ l, bước sóng 310 nm, nhiệt độ cột 40 $^{\circ}$ C, pha động gồm MeOH (A) và dung dịch đệm natri acetat pH 3,85 (B) theo chương trình gradient: 0 phút, 8 % A; 2 – 18 phút, 80 % A; 18,1 phút, 100 % A; 20 - 25 phút, 8 % A.

- Mẫu trắng: Dung môi pha mẫu

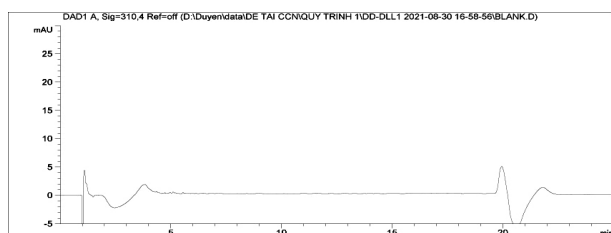
* *Chú ý:* Thứ tự rửa giải của các pic như sau: BZP-4, BZP-3, MBC, OTC, MAN, ODP, BDM, OMC, OS, HMS.

3.2. Thẩm định quy trình phân tích

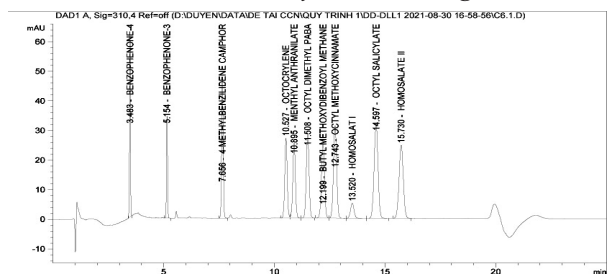
3.2.1. Tính đặc hiệu

Chuẩn bị các Dung dịch: chuẩn hỗn hợp, mẫu tự tạo, mẫu placebo theo quy trình phân tích và tiêm vào hệ thống sắc ký, ghi lại các sắc ký đồ. Kết quả:

- Trên sắc ký đồ (SKĐ) của mẫu trắng và mẫu

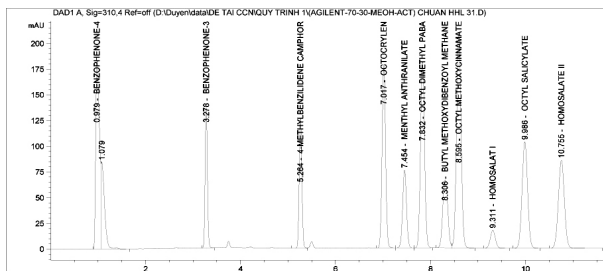


Hình 3. Sắc ký đồ mẫu trắng



Hình 5. Sắc ký đồ mẫu chuẩn

* Nhận xét: Phương pháp đạt yêu cầu về độ đặc hiệu.



Hình 2. SKĐ 10 CCN trong pha động MeOH- dung dịch đệm natri acetat pH 3,85 (70:30))

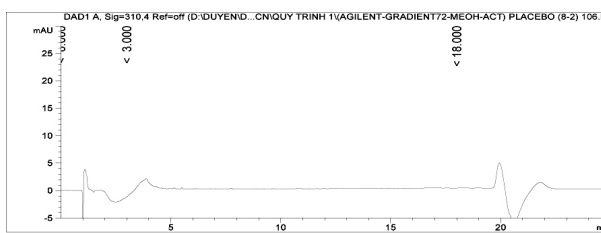
placebo (Hình 3 và Hình 4) không xuất hiện pic có thời gian lưu tương ứng với thời gian lưu của các pic CCN thu được từ SKĐ mẫu chuẩn (Hình 5) và mẫu tự tạo (Hình 6).

- Trên SKĐ của mẫu tự tạo (Hình 6), các pic CCN có thời gian lưu tương ứng với thời gian lưu của các pic CCN thu được từ SKĐ mẫu chuẩn hỗn hợp (Hình 5). Các pic này tách khỏi nền mẫu và tách khỏi nhau với hệ số phân giải $\geq 1,8$.

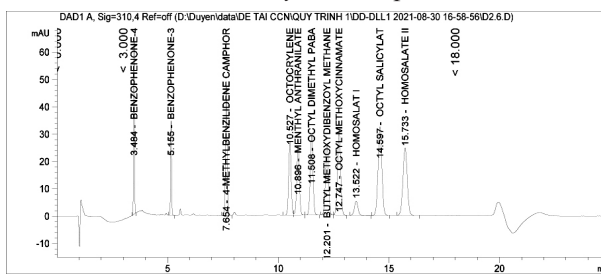
- Trong 10 CCN nghiên cứu thì Homosalat có 2 pic là HMS I và HMS II. Trên SKĐ mẫu chuẩn và mẫu tự tạo, hai pic này tách rõ khỏi nhau và tách khỏi các CCN khác với hệ số phân giải $\geq 2,2$. (Khi tính toán kết quả của HMS, chỉ tính kết quả dựa trên diện tích pic HMS II [6]).

- Độ tinh khiết của tất cả các pic chất chống nắng ở mẫu tự tạo và mẫu chuẩn đều $> 99,9\%$.

- So sánh phổ hấp thụ UV của các chất chống nắng ở mẫu tự tạo với mẫu chuẩn, kết quả cho hệ số tương đồng với cả 10 chất chống nắng đều > 999 .



Hình 4. Sắc ký đồ mẫu placebo



Hình 6. Sắc ký đồ mẫu tự tạo

3.2.2. Tính thích hợp của hệ thống sắc ký

Tiến hành tiêm lặp lại 6 lần dung dịch chuẩn hỗn hợp mục 3.2.1 vào hệ thống sắc ký, ghi lại sắc ký đồ. Kết quả đánh giá độ phù hợp của hệ thống sắc ký được trình bày trong Bảng 3.

Bảng 3. Kết quả tính thích hợp của hệ thống sắc ký

Tên chất		BZP-4	BZP-3	MBC	OTC	MAN	ODP	BDM	OMC	OS	HMS
RSD (%)	t_R	0,1	0,2	0,3	0,3	0,3	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
	Spic	0,4	0,4	0,4	0,2	0,4	0,3	0,4	0,2	0,3	0,4

Kết quả cho thấy giá trị RSD của thời gian lưu của tất cả các chất < 1,0 % và diện tích pic < 2 %. Như vậy, hệ thống sắc ký phù hợp để định tính, định lượng đồng thời 10 chất chống nắng trong mỹ phẩm.

3.2.3. Giới hạn phát hiện (LOD), giới hạn định lượng (LOQ)

Tiến hành phân tích các mẫu chuẩn với nồng độ thấp dần bằng cách pha loãng dung dịch chuẩn hỗn hợp ở mục 3.2.1 trong dung môi pha mẫu. Giá trị LOD được xác định tại nồng độ có tỷ lệ giữa tín hiệu chiều cao pic của các chất và cường độ nhiễu nền tại lân cận pic ít nhất bằng 3. Giá trị LOQ được xác định tại nồng độ có tỷ lệ giữa tín hiệu chiều cao pic của các chất và cường độ nhiễu nền tại lân cận pic ít nhất bằng 10 [7].

Kết quả thực nghiệm thu được giá trị giới hạn phát hiện và giới hạn định lượng của các chất chống nắng như Bảng 4.

Bảng 4. Giá trị LOD và LOQ của các chất chống nắng trong dung dịch

Tên chất	BZP-4	BZP-3	MBC	OTC	MAN	ODP	BDM	OMC	OS	HMS
LOD ($\mu\text{g/ml}$)	0,15	0,05	0,05	0,12	0,49	0,05	0,25	0,07	0,05	0,52
LOQ ($\mu\text{g/ml}$)	0,3	0,1	0,1	0,24	0,98	0,1	0,5	0,14	1	1,04

3.2.4. Xây dựng đường chuẩn và khoảng tuyến tính

Chuẩn bị dãy đường chuẩn chứa 10 điểm nồng độ của hỗn hợp 10 CCN với nồng độ từ LOQ đến nồng độ gấp khoảng 100 lần nồng độ LOQ. Tiến hành phân tích các mẫu chuẩn và ghi lại SKĐ. Kết quả xác định mối tương quan tuyến tính được thể hiện trong Bảng 5.

Bảng 5. Kết quả khảo sát khoảng tuyến tính của các chất chống nắng

Tên chất	Khoảng tuyến tính ($\mu\text{g/ml}$)	PT hồi qui ($y = ax + b$)	r	% thu hồi (min-max)
BZP-4	0,29 - 29,49	$y = 31,445x - 0,0944$	0,9999	98,5 – 101,6
BZP-3	0,10 - 10,00	$y = 54,16x + 1,457$	0,9999	96,5 – 101,3
MBC	0,10 - 9,89	$y = 117,98x + 0,935$	0,9999	98,4 – 101,1
OTC	0,25 - 24,58	$y = 41,534x + 0,1461$	0,9999	98,6 – 103,4
MAN	0,98 - 97,52	$y = 10,316x + 0,9232$	1,0000	88,4 – 103,0
ODP	0,10 - 10,48	$y = 118,92x + 1,3096$	0,9999	96,1 – 101,7
BDM	0,49 - 49,40	$y = 25,016x - 0,3409$	1,0000	98,3 – 106,1
OMC	0,15 - 14,78	$y = 104,28x + 1,2549$	0,9999	98,1 – 101,9
OS	1,00 - 99,60	$y = 19,442x + 2,1506$	0,9999	88,4 – 101,9
HMS	1,04 - 104,37	$y = 15,487x + 1,746$	1,0000	95,6 – 100,8

Kết quả cho thấy, hệ số tương quan tuyến tính của 10 CCN đều lớn hơn 0,998 và độ thu hồi từ 96,1 % - 106,1 %. Như vậy, có sự tương quan tuyến tính chặt chẽ giữa diện tích pic của các CCN với nồng độ trong khoảng nồng độ khảo sát.

3.2.5. Độ đúng, độ lặp lại của phương pháp

Đánh giá độ đúng, độ lặp lại của phương pháp trên các mẫu tự tạo được chuẩn bị bằng cách thêm chính xác một thể tích dung dịch chuẩn gốc vào các mẫu placebo để thu được dung dịch các mẫu tự tạo ở 3 mức nồng

độ: nồng độ thấp (LOQ), nồng độ trung bình (MQC) và nồng độ cao (HQC). Các mẫu tự tạo được xử lý theo quy trình phân tích. Tại mỗi mức nồng độ, tiến hành phân tích 6 mẫu độc lập. Kết quả được thể hiện trong Bảng 6.

Kết quả ở Bảng 6 cho thấy, ∀ nồng độ LOQ tỷ lệ thu hồi từ 87,6 % - 98,0 %, RSD ≤ 4,7 %, nồng độ MQC tỷ lệ thu hồi từ 98,8% - 100,4%, RSD ≤ 0,7 % và nồng độ HQC tỷ lệ thu hồi từ 98,5 % - 100,7 %, RSD ≤ 0,5 %. Phương pháp phân tích đạt yêu cầu về độ đúng, độ lặp lại theo yêu cầu của USFDA [7].

Bảng 6. Kết quả khảo sát độ đúng, độ lặp lại của phương pháp

Tên chất	LQC			MQC			HQC		
	Nồng độ (µg/ml)	TB ± SD ((%), n=6)	RSD (%)	Nồng độ (µg/ml)	TB ± SD ((%), n=6)	RSD (%)	Nồng độ (µg/ml)	TB ± SD ((%), n=6)	RSD (%)
BZP-4	0,30	96,4 ± 1,5	1,4	5,97	99,8 ± 0,7	0,7	29,85	100,1 ± 0,5	0,4
BZP-3	0,10	94,7 ± 2,8	2,7	2,05	98,9 ± 0,6	0,6	10,24	98,7 ± 0,4	0,4
MBC	0,10	95,9 ± 4,1	3,9	2,03	98,9 ± 0,8	0,7	10,15	98,5 ± 0,5	0,4
OTC	0,25	98,0 ± 3,8	3,5	4,99	100,4 ± 0,7	0,6	24,93	99,5 ± 0,5	0,5
MAN	1,00	87,6 ± 3,6	3,8	19,94	100,3 ± 0,5	0,5	99,69	100,3 ± 0,4	0,4
ODP	0,11	94,3 ± 4,2	4,0	2,13	99,9 ± 0,3	0,3	10,63	99,5 ± 0,5	0,4
BDM	0,51	95,6 ± 4,8	4,6	10,15	98,8 ± 0,4	0,4	50,77	99,9 ± 0,4	0,4
OMC	0,15	98,0 ± 5,0	4,7	2,99	100,3 ± 0,7	0,7	14,95	99,8 ± 0,5	0,4
OS	1,01	88,3 ± 1,8	1,8	20,28	99,6 ± 0,4	0,3	101,4	100,2 ± 0,4	0,4
HMS	1,06	87,9 ± 3,3	3,5	21,19	100,1 ± 0,5	0,4	106,0	100,7 ± 0,5	0,5

3.2.6. Độ chính xác

Độ chính xác của phương pháp gồm độ lặp lại (mục 3.2.5) và độ chính xác trung gian. Độ chính xác trung gian được đánh giá trên các mẫu tự tạo tương tự độ lặp lại nhưng khác ngày và khác kiểm nghiệm viên. Kết quả độ chính xác của phương pháp được thể hiện trong Bảng 7.

Bảng 7. Kết quả độ chính xác của phương pháp

Tên chất	LQC (%)		MQC (%)		HQC (%)	
	TB ± SD, (n = 12)	RSD, (n = 12)	TB ± SD, (n = 12)	RSD, (n = 12)	TB ± SD, (n = 12)	RSD, (n = 12)
BZP-4	100,4 ± 4,4	4,4	99,8 ± 0,6	0,6	99,7 ± 0,6	0,6
BZP-3	99,2 ± 5,5	5,5	98,4 ± 0,8	0,8	98,0 ± 0,9	1,0
MBC	99,7 ± 5,0	5,0	99,9 ± 1,2	1,2	99,1 ± 0,8	0,8
OTC	100,3 ± 3,6	3,6	100,2 ± 0,6	0,6	98,9 ± 0,8	0,8
MAN	90,3 ± 4,3	4,7	100,0 ± 0,7	0,7	99,6 ± 0,8	0,8
ODP	98,8 ± 5,5	5,6	100,3 ± 0,7	0,7	99,5 ± 0,5	0,5
BDM	99,5 ± 5,3	5,3	99,4 ± 0,8	0,8	100,1 ± 0,5	0,5
OMC	102,4 ± 5,8	5,7	100,7 ± 0,8	0,8	99,8 ± 0,5	0,5
OS	91,4 ± 3,7	4,1	99,2 ± 0,7	0,7	99,4 ± 1,0	1,0
HMS	92,3 ± 5,4	5,9	99,7 ± 0,6	0,6	99,9 ± 1,0	1,0

Kết quả ở Bảng 6 và Bảng 7 cho thấy giá trị RSD kết quả định lượng của mỗi kiểm nghiệm viên và cả hai kiểm nghiệm viên đều đạt yêu cầu quy định của USFDA [7]. Như vậy, phương pháp đạt yêu cầu về độ chính xác.

3.3. Ứng dụng

Áp dụng phương pháp vừa xây dựng được để xác định hàm lượng của các chất chống nắng trong 14 mẫu mỹ phẩm dạng kem trên thị trường. Các mẫu được xử lý theo quy trình phân tích. Kết quả cho thấy, hàm lượng của các chất chống nắng trong mẫu từ 0,02 – 8,03 % (Bảng 8).

Bảng 8. Kết quả phân tích chất chống nắng trong một số mẫu mỹ phẩm

Mẫu	Thành phần CCN	Hàm lượng (% , kl/kl)	Mẫu	Thành phần CCN	Hàm lượng (% , kl/k)
M2	OMC	0,03	M8	OMC	0,02
M3	OMC	5,67		OS	0,02
	OS	1,90	M9	OMC	5,36
M4	OMC	7,28	M11	OMC	6,79
	OS	4,22	M12	MBC	1,35
M5	OTC	1,76		BDM	1,90
	OMC	4,08		OS	1,31
	OS	1,85	M13	OMC	6,70
M6	MBC	0,93	M14	OMC	7,71
	OTC	1,78	M15	OMC	7,74
	OMC	6,54	M16	OMC	0,05
	OS	2,34			
M7	OMC	8,03			
	OS	4,64			

4. KẾT LUẬN

Qua quá trình thực nghiệm, đề tài đã khảo sát và lựa chọn được điều kiện sắc ký, quy trình xử lý mẫu phù hợp cho phép định tính, định lượng đồng thời 10 chất chống nắng trong nền mẫu mỹ phẩm dạng kem. Phương pháp đã được thẩm định đầy đủ về độ đặc hiệu, giới hạn phát hiện, giới hạn định lượng, khoảng tuyến tính - đường chuẩn, độ đúng, độ chính xác. Kết quả thẩm định các chỉ tiêu đạt yêu cầu của USFDA [7] về thẩm định phương pháp trong nền mẫu mỹ phẩm. Phương pháp đã được áp dụng để xác định hàm lượng của 6 chất chống nắng trong 14 mẫu mỹ phẩm dạng kem trên thị trường. Kết quả cho thấy, hàm lượng các chất chống nắng trong các mẫu được kiểm tra từ 0,02 % – 8,03 % (kl/kl).

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Hauri U., Lutolf B., et al. (2002), “Determination of organic sunscreen filters in cosmetics with HPLC/DAD”, ResearchGate, 94, pp.80-92.
- Chang, N. I., et al. (2015). “Determination of fourteen sunscreen agents in cosmetics using high-performance liquid chromatography”, Int J Cosmet Sci, 37(2), pp.175-180.
- Narla, S. and H. W. Lim (2020). “Sunscreen: FDA regulation, and environmental and health impact”, Photochem Photobiol Sci, 19(1), pp.66-70.
- Association of South East Asian nations - ASEAN (2019), Annex VII - List of UV filters which cosmetic products may contain.
- European commission (2021), Annex VI- List of UV filters allowed in cosmetic products.
- Chisvert, A., et al. (2013). “A reliable and environmentally friendly liquid-chromatographic method for multi-class determination of fat-soluble UV filters in cosmetic products”, Anal Chim Acta, 790, pp.61-67.
- Food and Drug administration - United states (2019), Guideline for the validation of chemical methods in food, feed, cosmetics and veterinary products

SUMMARY

A HPLC-based method was developed for simultaneous identification and determination of 10 UV filters in cosmetic creams. UV filters were extracted from cream matrices with a mixture of methanol and acetate buffer pH 3.85 (80:20, v/v) following by chromatographic separation on Agilent Poroshell 120-C18 (100 x 4.6 mm; 2.7µm) column with a mixture of

methanol and acetate buffer pH 3.85 with gradient program as mobile phase, maintaining at flow rate of 0.8 ml per minute, run time 25 minutes, temperature: 40 °C. The method was validated about the specificity, linear range, precision, accuracy, LOD, LOQ, and validation results proved that this method was suitable for determination of 10 UV filters in cosmetic creams.

The method was applied to control 14 cosmetic samples (sunscreen and creams). The result show that the concentration of UV filters in samples from 0.02 % to 8.03 %.

(Ngày nhận bài: 13/02/2023 ; Ngày phản biện: 13/02/2023; Ngày duyệt đăng: 17/03/2023)

ĐỊNH TÍNH VÀ ĐỊNH LƯỢNG ĐỒNG THỜI BENZYL ALCOHOL, ACID SALICYLIC VÀ NATRI BENZOAT TRONG DẦU GỘI ĐẦU BẰNG PHƯƠNG PHÁP HPLC

TÔNG THỊ THANH VƯỢNG, LÊ ĐÌNH CHI

Đại học Dược Hà Nội

NGUYỄN VĂN HÀ, PHÙNG THỊ HỒNG✉

Viện Kiểm Nghiệm thuốc Trung Ương

Từ khóa: Benzyl alcohol, Acid salicylic, Natri benzoat, dầu gội đầu

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Sử dụng chất bảo quản (CBQ) có thể giúp ngăn ngừa sự phát triển của vi khuẩn nấm mốc, tránh ảnh hưởng đến chất lượng và duy trì tuổi thọ của sản phẩm [1]. Tuy nhiên, các CBQ cũng có thể gây ra các tác dụng không mong muốn khi sử dụng quá nồng độ cho phép. Chẳng hạn, benzyl alcohol (BA) có thể gây kích ứng da, natri benzoat (NB) có thể gây dị ứng da, acid salicylic (AS) có thể gây ra một số tác dụng phụ trên da nhạy cảm (ngứa, phát ban, nổi mề đay, khô da, v.v.). Theo hiệp định hòa hợp ASEAN trong quản lý mỹ phẩm, các chất BA, NB, AS thuộc danh mục CBQ có giới hạn (NB có giới hạn cho phép là 2,5 % trong các sản phẩm tẩy rửa, BA không quá 1 %, AS và muối của nó không được quá 0,5 %) [2].

Hiện nay, một số kỹ thuật đã được phát triển để xác định hàm lượng BA, NB, AS trong mỹ phẩm bằng HPLC, tuy nhiên chưa có phương pháp để xác định đồng thời hàm lượng các CBQ này trong dầu gội đầu. Xuất phát từ thực tế trên, chúng tôi đã thực hiện nghiên cứu này nhằm cung cấp thêm công cụ để góp phần phục vụ cho công tác kiểm tra chất lượng mỹ phẩm ở Việt Nam.

2. THỰC NGHIỆM

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

2.1.1. Thiết bị, dụng cụ

Máy sắc ký lỏng hiệu năng cao Shimadzu, cân phân tích Mettler Toledo chính xác tới 0,01 mg, máy lắc siêu âm, các bình định mức, pipet và các dụng cụ thủy tinh có độ chính xác phù hợp.

2.1.2. Hóa chất, chất chuẩn

- **Chất đối chiếu:** Benzyl alcohol (Chuẩn USP; Lô SX: R097X0; Hàm lượng: 100,0 %, nguyên trạng); Acid salicylic (Chuẩn VKNTTPHCM, Lô SX: QT158100721, Hàm lượng: 99,9 %, nguyên trạng); Natri benzoat (Chuẩn VKNTTW, Lô SX: C0322314, Hàm lượng: 99,5 %, nguyên trạng).

- **Dung môi, hóa chất:** Methanol (đạt tiêu chuẩn tinh khiết dùng cho HPLC); KH_2PO_4 , Triethylamin, H_3PO_4 (đạt tiêu chuẩn tinh khiết dùng cho phân tích).

2.2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Đối tượng nghiên cứu

- **Mẫu placebo:** là mẫu dầu gội đầu không chứa BA, NB và AS.

- **Mẫu tự tạo:** là mẫu placebo cho thêm BA, NB và AS.

- **Mẫu thử:** Mẫu dầu gội đầu L'ORE'AL paris ELSEVE total Repair 5.

- **Mẫu thử thêm chuẩn:** là mẫu thử thêm các chuẩn BA, NB và AS ở các nồng độ khác nhau.

2.2.2. Phương pháp nghiên cứu

- Sử dụng mẫu chuẩn, mẫu placebo và mẫu tự tạo, mẫu thử thêm chuẩn để xây dựng và thẩm định phương pháp. Tiến hành thực nghiệm để tìm ra điều kiện sắc ký và quy trình xử lý mẫu phù hợp. Sau khi xây dựng phương pháp, tiến hành thẩm định trên các chỉ tiêu: sự phù hợp của hệ thống sắc ký, độ đặc hiệu - chọn lọc, giới hạn phát hiện (LOD), giới hạn định lượng (LOQ), khoảng tuyến tính, độ đúng, độ chính xác (độ lặp lại và độ chính xác trung gian).

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

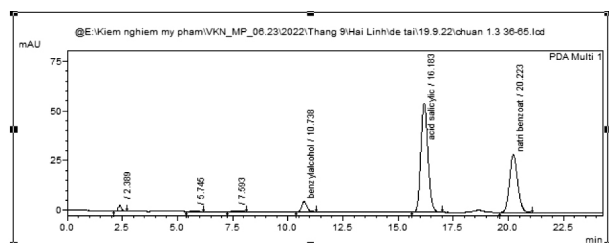
3. KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN

3.1. Xây dựng quy trình phân tích

3.1.1. Khảo sát các điều kiện sắc ký

- *Khảo sát lựa chọn cột và pha động*: Dựa trên tính chất lý hóa của BA, NB và AS, để lựa chọn cột sắc ký và pha động phù hợp cho phân tích đồng thời BA, NB và AS trong dầu gội đầu, các thí nghiệm sơ bộ đã được thực hiện trên các cột sắc ký và các pha động khác nhau. Kết quả thực nghiệm sơ bộ cho thấy với hệ pha động là hỗn hợp của dung dịch đệm KH_2PO_4 pH 2,7 và MeOH ở các tỷ lệ khác nhau, sử dụng cột YMC-Triart C18 (250 x 4,6 mm; 5 μm) cho pic cân đối, thời gian phân tích phù hợp.

- *Khảo sát lựa chọn tỷ lệ thành phần pha động*: Tiến hành khảo sát trên các tỷ lệ khác nhau của hỗn hợp dung dịch đệm KH_2PO_4 pH 2,7 và MeOH. Kết quả cho thấy khi sử dụng hỗn hợp KH_2PO_4 pH 2,7 và MeOH với tỷ lệ (65:35), pic thu được có hình dáng cân đối, đáp ứng pic cao và thời gian phân tích là phù hợp nhất. Do đó pha động gồm dung dịch đệm KH_2PO_4 pH 2,7 và MeOH với tỷ lệ (65:35) được lựa chọn để tiếp tục nghiên cứu.



Hình 1. Sắc ký đồ đại diện thu được với hệ pha động MeOH - KH_2PO_4 pH 2,7 (35:65)

- *Khảo sát lựa chọn tốc độ dòng và bước sóng phân tích*: Tham khảo tài liệu, chúng tôi lựa chọn tốc độ dòng là 1,2 ml/phút và bước sóng phân tích là 230 nm cho NB và AS. Khi lấy tín hiệu ở bước sóng 230 nm ở cùng điều kiện pha mẫu thử là 1g mẫu pha trong bình định mức 100 ml thì không phát hiện được BA. Khảo sát ở nồng độ cao nhất mà ở đó mẫu thử còn phân tán hoàn toàn (cân 1,5 g mẫu thử hòa tan trong 50 ml), BA cũng không được phát hiện ở bước sóng 230 nm trên đại đa số các mẫu dầu gội lấy trên thị trường. Khi quét phổ UV-VIS của BA cho thấy cực đại hấp thụ ở bước sóng 208 nm, khi phân tích BA ở bước sóng 208 nm cho pic cân đối, tinh khiết và tín hiệu tốt vì vậy lựa chọn bước sóng phân tích cho BA là 208 nm.

3.1.2. Lựa chọn điều kiện xử lý mẫu

Dầu gội đầu là một dạng chế phẩm có thành phần phức tạp với nhiều chất điện hoạt. Độ tan của các đối tượng nghiên cứu cũng có sự khác biệt: NB tan tốt trong nước (khoảng 63 g/100 ml ở 30 $^{\circ}\text{C}$); AS kém tan trong nước (khoảng 0,25 g/100 ml ở 25 $^{\circ}\text{C}$) nhưng tan tốt trong methanol (khoảng 62 g/100 ml ở 21 $^{\circ}\text{C}$); BA phân tán ở mức trung bình trong nước (khoảng 4 g/100 ml) và phân tán tốt trong methanol. Từ các đặc tính này, hỗn hợp methanol – nước (1:1, v/v) được chọn làm dung môi pha mẫu để hòa tan tốt cả 3 chất nghiên cứu.

Do dầu gội đầu chứa nhiều chất điện hoạt nên sau khi phân tán mẫu dầu gội trong hỗn hợp methanol – nước (1:1, v/v), dịch chiết được làm lạnh bằng nước đá trong 30 phút để tách tối đa các thành phần không tan, rồi ly tâm ở tốc độ 10000 vòng/phút trong 10 phút, phần dịch trong được lọc qua màng lọc 0,45 μm trước khi tiêm sắc ký.

3.1.3. Kết quả xây dựng quy trình

* *Điều kiện sắc ký*:

Hệ sắc ký lỏng pha đảo detector DAD, với cột C18 (250 x 4,6 mm; 5 μm), rửa giải bằng hệ pha động là hỗn hợp gồm dung dịch đệm KH_2PO_4 pH 2,7 và MeOH tỷ lệ (65:35). Tốc độ dòng 1,2 ml/phút, thể tích tiêm mẫu là 20 μl . Bước sóng phát hiện NB và AS là 230 nm, BA là 208 nm. Dung dịch đệm KH_2PO_4 pH 2,7 được pha như sau: hòa tan 2,72 g KH_2PO_4 trong 1000 ml nước, thêm 3,0 ml triethylamin, điều chỉnh pH về 2,7 bằng H_3PO_4 đặc.

* *Chuẩn bị mẫu*:

Sử dụng dung dịch methanol – nước (50:50) làm dung môi pha mẫu. Các dung dịch được chuẩn bị như sau:

- *Dung dịch chuẩn gốc NB*: Hòa tan và pha loãng chính xác khoảng 30,8 mg chất chuẩn NB vừa đủ trong 100,0 ml bằng dung môi pha mẫu.

- *Dung dịch chuẩn gốc AS*: Hòa tan và pha loãng chính xác khoảng 11,8 mg chất chuẩn AS vừa đủ trong 100,0 ml bằng dung môi pha mẫu.

- *Dung dịch chuẩn gốc BA*: Hòa tan và pha loãng chính xác khoảng 40,3 mg chất chuẩn BA vừa đủ trong 100,0 ml bằng dung môi pha mẫu. Hút và pha loãng chính xác 2,0 ml dung dịch này vừa đủ trong 100,0 ml bằng dung môi pha mẫu.

- *Dung dịch chuẩn hỗn hợp*: Lấy chính xác các thể tích thích hợp khác nhau của từng dung dịch chuẩn gốc cho vào cùng một bình định mức có thể tích phù hợp, thêm dung môi pha mẫu vừa đủ đến vạch để thu được dung dịch chuẩn hỗn hợp có nồng độ chất phân tích phù hợp, lắc đều, lọc qua màng lọc 0,45 μm .

- *Dung dịch thử*: Cân chính xác khoảng 1,0 g mẫu dầu gội đầu vào bình định mức 100 ml, thêm khoảng 70 ml dung môi pha mẫu, lắc siêu âm 20 phút, để nguội về nhiệt độ phòng, thêm dung môi pha mẫu vừa đủ đến vạch, lắc đều. Để lạnh trong nước đá 30 phút, ly tâm (ở nhiệt độ phòng) ở 10000 vòng/phút trong 10 phút. Lọc lọc dịch trong qua màng lọc 0,45 μm .

3.2. Thẩm định quy trình phân tích

3.2.1. Tính thích hợp của hệ thống sắc ký

Tiến hành tiêm lặp lại 6 lần dung dịch chuẩn hỗn hợp có nồng độ BA 0,82 $\mu\text{g/ml}$, NB 1,2 $\mu\text{g/ml}$ và AS 1,9 $\mu\text{g/ml}$ vào hệ thống sắc ký, ghi lại sắc ký đồ.

Kết quả cho thấy: Các giá trị thời gian lưu và diện tích pic của BA, AS và NB đều lặp lại tốt ($\text{RSD}_{\text{IR}} < 1\%$; $\text{RSD}_{\text{Spic}} < 2\%$), pic cân đối (hệ số kéo đuôi 1,4), số đĩa lý thuyết ≥ 2500 và độ phân giải $\geq 1,5$. Như vậy, hệ thống ổn định và phù hợp để định tính, định lượng BA, AS và NB trong mẫu nghiên cứu.

3.2.2. Độ đặc hiệu

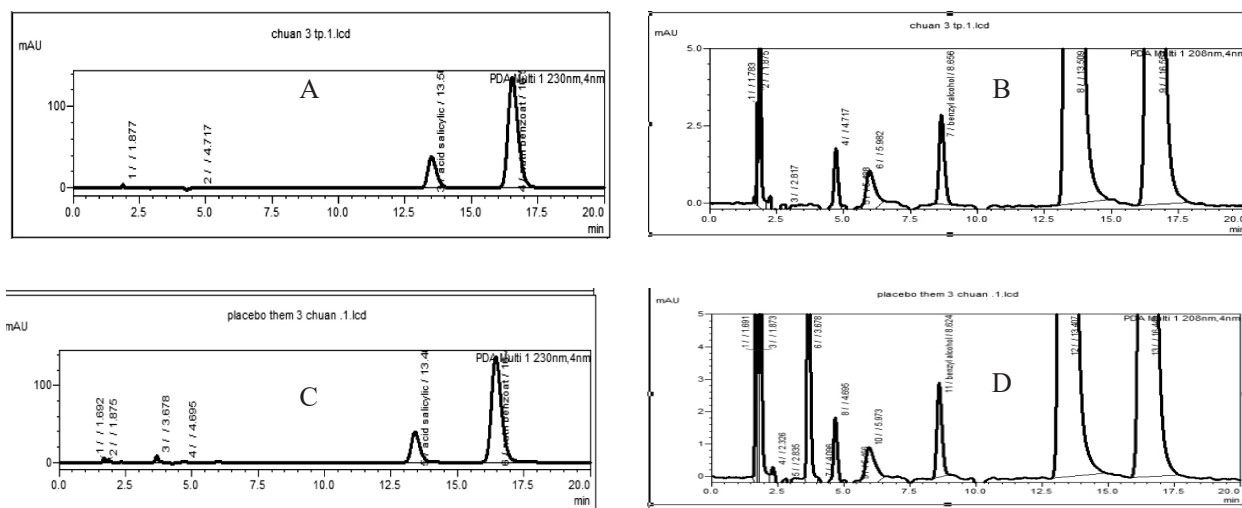
Tiến hành phân tích mẫu trắng, mẫu placebo, mẫu chuẩn và mẫu tự tạo theo quy trình phân tích. Các sắc ký đồ tiêu biểu thu được trình bày tại Hình 2 cho thấy:

- Trên sắc ký đồ của mẫu trắng không xuất hiện pic có thời gian lưu tương ứng với thời gian lưu của các pic BA, AS và NB thu được từ sắc ký đồ mẫu chuẩn và mẫu tự tạo.

- Trên sắc ký đồ của mẫu tự tạo, các pic BA, AS và NB được nhận diện rõ ràng và có thời gian lưu tương ứng với thời gian lưu của các pic BA, AS và NB thu được từ sắc ký đồ mẫu chuẩn.

- Độ tinh khiết của các pic BA, AS và NB ở mẫu tự tạo và mẫu chuẩn $\geq 0,9998$. So sánh phổ hấp thụ UV của BA, AS và NB ở mẫu tự tạo với mẫu chuẩn, kết quả cho hệ số tương đồng $\geq 0,9999$.

- Độ phân giải giữa pic NB và pic AS là 5,9 đã đáp ứng yêu cầu đặt ra ($\geq 1,5$). Như vậy, phương pháp đạt yêu cầu về độ đặc hiệu.



Hình 2. Một số sắc ký đồ đại diện khi thẩm định độ đặc hiệu: mẫu chuẩn hỗn hợp (A: 230 nm, B: 208 nm); mẫu tự tạo (C: 230 nm, D: 208 nm)

3.2.3. Độ tuyến tính

- *Tiến hành*:

+ *Chuẩn bị dung dịch chuẩn gốc*: Hòa tan và pha loãng 82,43 mg chuẩn BA; 23,76 mg chuẩn AS và 120,68 mg chuẩn NB vào vừa đủ trong 100 ml bằng dung môi pha mẫu.

+ *Dung dịch thử*: Pha loãng dung dịch chuẩn gốc trong dung môi pha mẫu để thu được dung dịch chuẩn hỗn hợp có nồng độ BA, AS và NB lần lượt trong khoảng 0,8 – 164,9 ($\mu\text{g/ml}$), 1,9 – 59,2 ($\mu\text{g/ml}$), 1,2 – 300,2 ($\mu\text{g/ml}$). Tiến hành sắc ký các dung dịch trên và đánh giá mỗi

tương quan tuyến tính giữa diện tích pic và nồng độ chất phân tích.

- *Kết quả*: Thiết lập phương trình tuyến tính giữa diện tích pic và nồng độ các chất phân tích. Phương trình của BA là $y = 50347x + 32971$, $r = 0,9999$; của AS là $y = 37094x + 11975$, $r = 0,9996$; của NB là $y = 57976x + 21700$, $r = 1,0000$. Kết quả thực nghiệm cho thấy, hệ số tương quan tuyến tính của BA, AS và NB đều lớn hơn 0,995. Như vậy, có sự tương quan tuyến tính chặt chẽ giữa diện tích pic của BA, AS và NB với nồng độ trong khoảng nồng độ khảo sát.

3.2.4. Giới hạn phát hiện, giới hạn định lượng

Tiến hành pha loãng dung dịch chuẩn của các chất trong mẫu placebo để thu được các mẫu đáp ứng chất phân tích gấp khoảng 3 lần độ nhiễu đường nền để xác định giới hạn phát hiện của phương pháp (LOD). Tiếp đó pha dung dịch có nồng độ chất phân tích gấp 3,3 lần nồng độ LOD để thu được mẫu thử giới hạn định lượng (LOQ).

Từ các kết quả thực nghiệm, xác định được LOD và LOQ của các chất BA, AS và NB trong mẫu tự tạo lần lượt như sau: 2,5 và 82 ($\mu\text{g/g}$); 58 và 190 ($\mu\text{g/g}$); 36 và 120 ($\mu\text{g/g}$).

3.2.5. Độ chính xác

* **Độ lặp lại:** Độ lặp lại của phương pháp được đánh giá dựa trên RSD của kết quả 06 mẫu thử được tiến hành độc lập, sử dụng dung dịch chuẩn ở phần độ thích hợp hệ thống, mẫu thử và mẫu chuẩn được xử lý theo quy trình phân tích đã khảo sát ở trên. Kết quả thu được như sau: hàm lượng trung bình BA là 0,006 % (RSD = 1,6 %), AS là 0,199 % (RSD = 1,3 %), NB là 0,487 % (RSD = 1,2 %). Như vậy phương pháp đạt yêu cầu về độ lặp lại.

* **Độ chính xác trung gian:** Tiến hành như độ lặp lại ở ngày khác và kiểm nghiệm viên khác. Kết quả thu được như sau: hàm lượng trung bình BA là 0,006 % (RSD = 1,0 %, n=12); AS là 0,199 % (RSD = 1,5 %, n=12); NB là 0,487 %, (RSD = 1,5 %, n=12). Như vậy, phương pháp đạt yêu cầu về độ chính xác trung gian.

3.2.6. Độ đúng của phương pháp

Đánh giá độ đúng của phương pháp trên các mẫu thử thêm chuẩn được chuẩn bị bằng cách thêm chính xác

một lượng chuẩn BA, AS và NB ở 3 mức nồng độ: nồng độ thấp (LQC), nồng độ trung bình (MQC) và nồng độ cao (HQC). Cụ thể như sau:

+ **Mẫu tự tạo thêm chuẩn ở nồng độ LQC:** Cân chính xác khoảng 1,0 g mẫu thử vào bình định mức 100 ml, thêm chuẩn BA, AS và NB ở lượng thích hợp và tiến hành xử lý mẫu như quy trình để thu được dung dịch có nồng độ BA, AS và NB lần lượt khoảng 1,45 $\mu\text{g/ml}$; 22,35 $\mu\text{g/ml}$; 51,37 $\mu\text{g/ml}$. Tiến hành trên 03 mẫu thử LQC độc lập.

+ **Mẫu tự tạo thêm chuẩn ở nồng độ MQC:** Cân chính xác 1,0 g mẫu thử vào bình định mức 100 ml, thêm chuẩn BA, AS và NB ở lượng thích hợp và tiến hành xử lý mẫu như quy trình để thu được dung dịch có nồng độ BA, AS và NB lần lượt khoảng 17,25 $\mu\text{g/ml}$; 25,70 $\mu\text{g/ml}$; 108,57 $\mu\text{g/ml}$. Tiến hành trên 03 mẫu thử MQC độc lập.

+ **Mẫu tự tạo thêm chuẩn ở nồng độ HQC:** Cân chính xác 1,0 g mẫu thử vào bình định mức 100 ml, thêm chuẩn BA, AS và NB ở lượng thích hợp và tiến hành xử lý mẫu như quy trình để thu được dung dịch có nồng độ BA, AS và NB lần lượt khoảng 126,12 $\mu\text{g/ml}$; 44,75 $\mu\text{g/ml}$; 170,13 $\mu\text{g/ml}$. Tiến hành trên 03 mẫu thử HQC độc lập.

Tiến hành sắc ký các mẫu trên theo qui trình, xác định độ thu hồi của phương pháp thông qua đánh giá tỷ lệ chất xác định từ phương pháp so với tổng tỷ lệ chất trong mẫu thử và lượng chuẩn thêm vào. Kết quả thu được như Bảng 1, và phương pháp đáp ứng yêu cầu về độ đúng theo hướng dẫn của AOAC.

Bảng 1. Độ đúng của phương pháp BA, AS và NB

Mức nồng độ	BA		AS		NB	
	% thu hồi	RSD (%)	% thu hồi	RSD (%)	% thu hồi	RSD (%)
LQC	101,3	0,7	101,6	0,7	101,7	0,3
MQC	101,4	0,8	99,3	1,2	99,9	0,4
HQC	101,8	0,1	100,4	1,3	99,8	1,5

3.3. Ứng dụng

Áp dụng phương pháp vừa xây dựng được để xác định hàm lượng của BA, AS, NB trong 18 mẫu dầu gội đầu trên thị trường. Kết quả thu được như Bảng 2.

Bảng 2. Hàm lượng BA, AS và NB trong một số mẫu dầu gội trên thị trường

Mẫu	HL _{BA} (%)	HL _{AS} (%)	HL _{NB} (%)	Mẫu	HL _{BA} (%)	HL _{AS} (%)	HL _{NB} (%)
M1	-	0,10	0,30	M10	-	-	0,30
M2	-	0,25	0,03	M11	-	0,26	0,07
M3	0,01	0,02	0,55	M12	-	-	-
M4	0,01	0,20	0,49	M13	-	-	0,47
M5	0,01	-	0,26	M14	-	0,28	0,52
M6	-	0,25	0,15	M15	0,01	0,20	0,52
M7	-	-	0,29	M16	0,62	-	0,17
M8	0,25	-	0,50	M17	-	-	0,29
M9	-	-	0,26	M18	-	-	0,28

Theo quy định của Asean, NB có giới hạn cho phép là 2,5 % trong các sản phẩm tẩy rửa, BA cho phép không quá 1 %, AS và muối của nó không được quá 0,5 %. Kết quả ở Bảng 2 cho thấy các mẫu dầu gội đều đạt giới hạn cho phép về các chất nghiên cứu.

4. KẾT LUẬN

Đề tài đã xây dựng được qui trình phân tích bằng phương pháp HPLC để định lượng đồng thời BA, AS

và NB trong các mẫu dầu gội. Phương pháp đã được thẩm định đầy đủ theo hướng dẫn của AOAC về độ đặc hiệu, độ tuyến tính, giới hạn phát hiện, giới hạn định lượng, độ chính xác. Phương pháp đã được áp dụng để phân tích 18 mẫu dầu gội thực tế trên thị trường. Theo đó, hàm lượng BA, AS và NB phân tích được trong các mẫu đều đạt yêu cầu về giới hạn cho phép sử dụng của ASEAN.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. <https://kiemnghiemhanoi.gov.vn/tin-tuc/chi-tiet/quy-dinh-ve-chat-bao-quan-trong-my-pham>
2. Association of South East Asian nation - ASEAN (2022), *Annex VI - List of Preservatives which cosmetic products may contain*, Version No: 2022-01. p.1-7.
3. Viện kiểm nghiệm thuốc Trung ương (2010), *Đảm bảo chất lượng thuốc và một số phương pháp kiểm nghiệm thuốc*, Tài liệu đào tạo.
4. Airin Aojama, Takahiro Doi, Takaomi Tagami, Keiji Kajimura (2013) “Simultaneous Determination of 11 Preservatives in Cosmetics by High-Performance Liquid Chromatography” *Journal of Chromatographic science*, 52(9), 1010-1015.
5. AOAC International official methods of Analysis (2012), Appendix F: guidelines for standard method performance requirements.

SUMMARY

A HPLC-based method was developed for identification and determination of benzyl alcohol, salicylic acid, sodium benzoate in shampoo. These three analytes were extracted from shampoo matrices with methanol - water (1:1) and analyzed using an YMC – Triart C18 (250 x 4,6 mm; 5 μ m) column as stationary phase, a mixture of phosphate buffer solution pH 2,7 and methanol (65:35, v/v) being maintained at flow rate of 1.2 mililiters per minute as mobile phase. The UV detection was set at wavelength of 208 nm for benzyl alcohol and at wavelength of 230 nm for salicylic acid and sodium benzoate. The developed method was validated in terms of specificity, linear range, precision and accuracy according to the requirements of AOAC International and FDA. This method was suitable for simultaneously determination of benzyl alcohol, salicylic acid, and sodium benzoate in shampoo.

(Ngày nhận bài: 17/01/2023; - Ngày phản biện: 18/01/2023; - Ngày duyệt đăng: 15/03/2023)

MỤC LỤC

	<i>Trang</i>
• Quản lý – Trao đổi nghiệp vụ	
- Định hướng nhiệm vụ công tác kiểm tra và giám sát chất lượng thuốc năm 2023.	1
	<i>PGS.TS. ĐOÀN CAO SON</i>
• Nghiên cứu khoa học	
- Xây dựng qui trình định tính, định lượng đồng thời một số flavonoid trong Diệp cá trồng ở Nam Bộ và Lâm Đồng bằng phương pháp HPLC.	2
	<i>HUỖNH NGOC NHƯ QUỲNH, HÀ DIỄU LY[✉], THIẾU THỊ THU LIỄU, LÊ HẢI ĐƯỜNG, NGUYỄN THỊ ÁNH MAI</i>
- Nghiên cứu xác định gelsemin trong máu bằng sắc ký lỏng khối phổ.	9
	<i>ĐOÀN THỊ HẢI HẠNH, NGUYỄN MAI DUNG, PHẠM THỊ THANH HÀ, PHẠM QUỐC CHINH[✉]</i>
- Xây dựng phương pháp định lượng đồng thời metformin và empagliflozin trong huyết tương người bằng phương pháp LC-MS/MS.	15
	<i>PHẠM THANH HUYỀN, NGUYỄN THỊ DUNG, LÊ THỊ LA, PHAN THỊ NGHĨA, NGUYỄN THỊ KIỀU ANH, NGUYỄN THỊ LIÊN[✉]</i>
- Xác định đồng thời 10 chất có tác dụng chống nắng trong mẫu mỹ phẩm dạng kem bằng phương pháp HPLC-DAD.	21
	<i>NGUYỄN VĂN HÀ, LÊ VĂN ĐẠT, NGÔ THỊ DUYỀN, TÔNG THỊ THANH VƯỢNG, LÊ QUANG THẢO[✉]</i>
- Định tính và định lượng đồng thời benzyl alcohol, acid salicylic và natri benzoat trong dầu gội đầu bằng phương pháp HPLC.	27
	<i>TÔNG THỊ THANH VƯỢNG, LÊ ĐÌNH CHI, NGUYỄN VĂN HÀ, PHÙNG THỊ HỒNG[✉]</i>

CONTENTS

	<i>Page</i>
• Management – Professional exchange	
Objectives and activities of the drug quality control and monitoring for the year 2023.	1
	<i>Associate Prof. DOAN CAO SON, Ph.D., Director of NIDQC</i>
• Scientific researches	
- Simultaneous quantification of six flavonoids in <i>Houttuynia cordata</i> Thumb. Grown in the southern and Lam Dong province by HPLC.	2
	<i>HUỖNH NGOC NHƯ QUỲNH, HÀ DIỄU LY[✉], THIẾU THỊ THU LIỄU, LÊ HẢI ĐƯỜNG, NGUYỄN THỊ ÁNH MAI</i>
- Determination of gelsemine in human blood by liquid chromatography tandem mass spectrometry.	9
	<i>ĐOÀN THỊ HẢI HẠNH, NGUYỄN MAI DUNG, PHẠM THỊ THANH HÀ, PHẠM QUỐC CHINH[✉]</i>
- Simultaneous quantification of metformin and empagliflozin in human plasma using liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS/MS).	15
	<i>PHẠM THANH HUYỀN, NGUYỄN THỊ DUNG, LÊ THỊ LA, PHAN THỊ NGHĨA, NGUYỄN THỊ KIỀU ANH, NGUYỄN THỊ LIÊN[✉]</i>
- Determination of ten sunscreen agents in cosmetics creams using HPLC – DAD	21
	<i>NGUYỄN VĂN HÀ, LÊ VĂN ĐẠT, NGÔ THỊ DUYỀN, TÔNG THỊ THANH VƯỢNG, LÊ QUANG THẢO[✉]</i>
- Identification and Determination of Benzyl alcohol, Salicylic acid, Sodium benzoate in shampoo by HPLC.	27
	<i>TÔNG THỊ THANH VƯỢNG, LÊ ĐÌNH CHI, NGUYỄN VĂN HÀ, PHÙNG THỊ HỒNG[✉]</i>