

VIỆN KIỂM NGHIỆM THUỐC TRUNG ƯƠNG

ISSN 1859 - 0055

TẠP CHÍ

**KIỂM  
NGHIỆM  
thuốc**

JOURNAL OF DRUG QUALITY CONTROL

**SỐ 2.2023**

**TẬP 21-SỐ 80**

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 2/2023**

JOURNAL OF DRUG QUALITY CONTROL N<sup>o</sup> 2/2023

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 07 năm 2023.

# XÂY DỰNG PHƯƠNG PHÁP ĐỊNH LƯỢNG AZITHROMYCIN TRONG NỀN VIÊN NÉN CÓ THÀNH PHẦN XÁC ĐỊNH BẰNG PHƯƠNG PHÁP QUANG PHỔ HỒNG NGOẠI PHẢN XẠ (FTIR-ATR)

Bùi Văn Trung<sup>1</sup>, Bùi Trọng Huy<sup>2</sup>, Trần Thị Bích Vân<sup>1</sup>, Đoàn Cao Sơn<sup>1</sup>, Lê Đình Chi<sup>3,✉</sup>

<sup>1</sup>Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương; <sup>2</sup>Học viện Y Dược học cổ truyền Việt Nam;

<sup>3</sup>Trường Đại học Dược Hà Nội.

**Từ khóa:** Azithromycin, FTIR-ATR, định lượng nhanh.

## 1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Azithromycin là một kháng sinh macrolid có khả năng ức chế tổng hợp protein ở các vi khuẩn nhạy cảm bằng cách gắn vào các cấu trúc dưới phân tử (subunit) của ribosom 50S. Ở nồng độ thấp, azithromycin có tính chất kìm khuẩn và ở nồng độ cao có thể diệt khuẩn đối với một số chủng chọn lọc. Trên nghiên cứu *in vitro*, azithromycin có khả năng diệt một số chủng vi khuẩn như *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus pneumoniae* và *H. influenzae*. Azithromycin có phổ hoạt động rộng hơn so với một số khác sinh cùng nhóm như erythromycin và clarithromycin. Dạng bào chế hay dùng của azithromycin là viên nén, viên nang, bột pha uống, thuốc tiêm tĩnh mạch và dung dịch nhỏ mắt [1].

Đối với các chế phẩm chứa azithromycin được bào chế dưới dạng bào chế viên nén, có khoảng 160 sản phẩm đã được cấp số đăng ký lưu hành tại Việt Nam [2]. Phương pháp quang phổ hồng ngoại (IR) và sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) được sử dụng để định tính azithromycin dạng nguyên liệu, còn hoạt chất này trong viên nén được định lượng bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao với detector DAD. Tuy nhiên do hoạt chất này ít hấp thụ bức xạ UV-VIS nên khi phân tích phải sử dụng detector đặt ở bước sóng ngắn (210 nm), do đó có thể gây ra sai số bởi sự hấp thụ của nền mẫu và hệ sắc ký phải dùng đến chương trình pha động khá phức tạp [3], [4]. Năm 2011, Yan Li và cộng sự đã xây dựng phương pháp định lượng nhanh azithromycin trong viên nén bằng quang phổ Raman [5], nhưng khoảng làm việc của phương pháp này còn hẹp, chưa đáp ứng các yêu cầu của phương pháp thường quy theo qui định của ICH và AOAC international [6,7].

Phương pháp quang phổ hồng ngoại chuyển dạng Fourier (FTIR) với kỹ thuật đo phản xạ toàn phần suy biến (ATR) có thể giúp phân tích nhanh, phân tích trực tiếp

dạng mẫu rắn mà ít phải chuẩn bị mẫu. Qua đó có thể giúp rút ngắn thời gian phân tích, thời gian chuẩn bị mẫu, giảm chi phí kiểm nghiệm và ít ảnh hưởng tới môi trường cũng như con người. Nhằm khai thác ưu điểm ấy của phương pháp, chúng tôi tiến hành nghiên cứu xây dựng qui trình định lượng azithromycin trong mẫu viên nén tự tạo bằng phương pháp quang phổ FTIR-ATR.

## 2. THỰC NGHIỆM

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

#### 2.1.1. Thiết bị, dụng cụ

Máy quang phổ hồng ngoại Thermo IS50 (Mỹ), cân phân tích Mettler Toledo MS105 (Thụy Sĩ) có độ chính xác  $d = 0,01$  mg. Các thiết bị sử dụng được đảm bảo các yêu cầu theo ISO/IEC 17025. Chày, cối mã não thích hợp dùng trộn bột viên.

#### 2.1.2. Nguyên vật liệu

Nguyên liệu azithromycin dihydrat (Lô 103 210224-1, sản xuất bởi Zhejiang Guabang Pharmaceutical CO., LTD. – Trung Quốc), được nhóm nghiên cứu xác định hàm lượng azithromycin là 95,13 % (nguyên trạng) theo phương pháp định lượng trong chuyên luận Azithromycin, USP 44 [4] (kết quả không công bố trong bài báo này). Các tá dược dùng chế tạo viên nén gồm: lactose, natri crosscarmellose, HPMC 606, aerosil, magnesi stearat đạt tiêu chuẩn Dược điển Việt Nam V.

### 2.2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

#### 2.2.1. Đối tượng nghiên cứu

Mẫu hỗn hợp bột viên gồm nguyên liệu azithromycin và các tá dược mô phỏng công thức viên nén có hàm lượng azithromycin là 69,4 % (kl/kl) với các thành phần như Bảng 1.

**Bảng 1. Công thức bào chế cho viên nén nghiên cứu**

| TT          | Tên nguyên liệu       | Khối lượng    |
|-------------|-----------------------|---------------|
| 1           | Azithromycin dihydrat | 524 mg        |
| 2           | Lactose               | 150 mg        |
| 3           | Natri crosscarmellose | 10 mg         |
| 4           | HPMC 606              | 5 mg          |
| 5           | Aerosil               | 6 mg          |
| 6           | Magnesi stearat       | 25 mg         |
| <b>Tổng</b> |                       | <b>720 mg</b> |

Mẫu hỗn hợp các bột viên nghiên cứu được trộn bởi azithromycin nguyên liệu và nền mẫu (gồm hỗn hợp các tá dược với tỷ lệ như bảng trên – không có thành phần dược chất) ở các tỷ lệ khác nhau.

### 2.2.2. Phương pháp nghiên cứu

#### 2.2.2.1. Xây dựng mô hình định lượng bằng phương pháp quang phổ FTIR-ATR

Để xây dựng mô hình định lượng, tiến hành trộn mẫu nguyên liệu azithromycin (dưới dạng azithromycin dihydrat) và nền mẫu để được các hỗn hợp bột viên có hàm lượng azithromycin (khan) lần lượt khoảng 35 %, 52 %, 69 % và 87 %, tương ứng với khoảng 50 %, 75 %, 100 % và 125 % so với hàm lượng đích (69 %). Mỗi điểm nồng độ chế tạo 02 mẫu độc lập. Lần lượt đo phổ FTIR-ATR của hỗn hợp các mẫu trên và mẫu nguyên liệu azithromycin, mỗi mẫu hỗn hợp đo 10 lần ở 10 vị trí lấy mẫu khác nhau, mẫu nguyên liệu đo 20 lần. Phổ IR được đo lặp lại 16 lần quét/1 lần thu phổ trong khoảng từ 400  $\text{cm}^{-1}$  – 2000  $\text{cm}^{-1}$  với độ phân giải là 4  $\text{cm}^{-1}$ . Phổ thô sau đó được tiền xử lý bằng phần mềm Microsoft Excel version 2019 để thiết lập mô hình định lượng bằng các thuật toán chemometrics thích hợp đã được tích hợp sẵn trong phần mềm TQ-Analyst version 9.2 của hãng Thermo Fischer Scientific. Sau khi có mô hình định lượng, phổ FTIR-ATR của mẫu bột viên được áp vào mô hình đã xây dựng để cho ra kết quả giúp tính toán hàm lượng azithromycin trong mẫu so với hàm lượng theo công thức đã thiết kế.

Mô hình định lượng bằng FTIR-ATR sử dụng mô hình chemometrics đã xây dựng sẽ được thẩm định các chỉ tiêu độ đặc hiệu, độ thích hợp hệ thống, độ tuyến tính, độ đúng, độ lặp lại và độ chính xác trung gian theo các yêu cầu của ICH và AOAC [6,7].

#### 2.2.2.2. Phương pháp xử lý số liệu

Tính toán và đánh giá kết quả bằng phần mềm Microsoft Excel version 2019. Phần mềm TQ-Analyst version 9.2 (gồm các thuật toán tiền xử lý phổ và các mô hình định tính, định lượng bằng các thuật toán toán hóa thích hợp).

## 3. KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN

### 3.1. Xây dựng mô hình định lượng

Chế tạo các mẫu bột viên bằng cách trộn nguyên liệu azithromycin vào nền placebo ở các tỷ lệ khác nhau, thu được hỗn hợp bột viên với nồng độ azithromycin xung quanh giá trị hàm lượng azithromycin trong công thức bào chế. Kết quả thu được như Bảng 2.

**Bảng 2. Hỗn hợp bột azithromycin và placebo sử dụng để xây dựng mô hình định lượng**

| TT | Tên mẫu     | $m_{\text{azi}}$<br>(mg) | $m_{\text{placebo}}$<br>(mg) | % azi<br>(kl/kl) |
|----|-------------|--------------------------|------------------------------|------------------|
| 1  | 50          | 261,48                   | 457,13                       | 34,61            |
| 2  |             | 261,03                   | 457,61                       | 34,55            |
| 3  | 75          | 392,25                   | 326,36                       | 51,93            |
| 4  |             | 393,94                   | 326,05                       | 52,05            |
| 5  | 100         | 523,36                   | 195,45                       | 69,26            |
| 6  |             | 522,67                   | 195,85                       | 69,20            |
| 7  | 125         | 654,25                   | 66,24                        | 86,38            |
| 8  |             | 654,31                   | 66,70                        | 86,33            |
| 9  | Nguyên liệu |                          | 0,00                         | 95,13            |
| 10 |             |                          | 0,00                         | 95,13            |

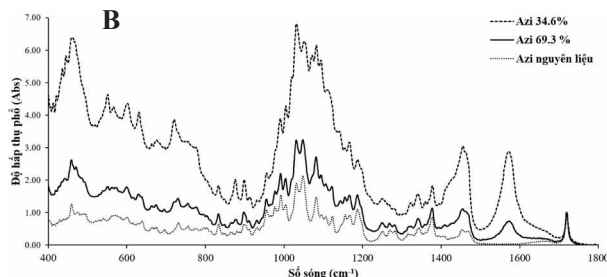
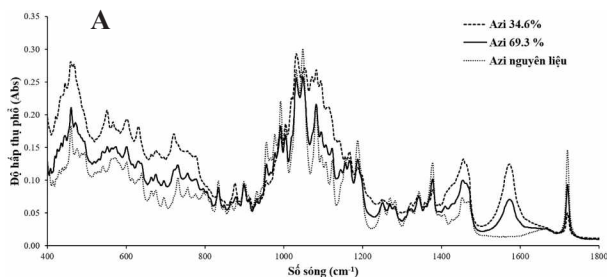
Tiến hành đo phổ FTIR-ATR của các hỗn hợp trên. Các phổ thu được và giá trị nồng độ tương ứng của chúng sẽ được sử dụng làm dữ liệu xây dựng mô hình định lượng.

Trước khi tiền xử lý phổ, phổ gốc đại diện của các hỗn hợp ở các nồng độ khác nhau được biểu diễn như Hình 1A. Kết quả chồng phổ cho thấy các phổ ban đầu (phổ gốc) của các mẫu bột (nồng độ khác nhau) có hình dáng thay đổi không theo quy luật về sự thay đổi của nồng độ. Trong phân tích quang phổ, hình dáng phổ của mẫu phân tích phụ thuộc chủ yếu vào bản chất của chất phân tích và quang trình của phép đo. Đối với phổ IR đo bằng kỹ thuật ATR, bức xạ hồng ngoại xuyên qua mẫu phân tích ở khoảng rất nhỏ, quang trình chủ yếu phụ thuộc vào phụ thuộc vào mật độ mẫu và diện tích tiếp xúc của mẫu phân tích tại vị trí tiếp xúc với tinh thể ATR (bằng kim cương). Trong đó, diện tích tiếp xúc thường thường đã được bao phủ bởi mẫu đo nên ít thay đổi, còn mật độ mẫu phân tích phụ thuộc vào lực nén bột mẫu của thiết bị. Lực nén này thường không cố định nên hầu như quang trình mẫu phân tích luôn không ổn định giữa các lần đo khác nhau. Muốn đánh giá được sự thay đổi tín hiệu phổ theo nồng độ azithromycin trong mẫu (bản chất mẫu đo), cần phải có phương pháp xử lý phổ thích hợp để loại bỏ sự ảnh hưởng bởi quang trình.

Qua khảo sát phổ của các hỗn hợp bột viên, nhận thấy phổ hỗn hợp bột viên ở các nồng độ khác nhau đều có

chung cực đại tại  $1720\text{ cm}^{-1}$ . Cực đại này chính là cực đại trên phổ của nguyên liệu azithromycin mà khi phối hợp azithromycin với nền placebo ở các tỷ lệ khác nhau thì vị trí cực đại này không bị dịch chuyển. Do đó, lựa chọn đỉnh  $1720\text{ cm}^{-1}$  là mốc để biến đổi phổ của các hỗn hợp đã thu được. Phép biến đổi tiền xử lý phổ được tiến hành nhằm đưa kết quả cường độ phổ biểu kiến của đỉnh  $1720\text{ cm}^{-1}$  ở tất cả các phổ đều có giá trị bằng 1. Để thực

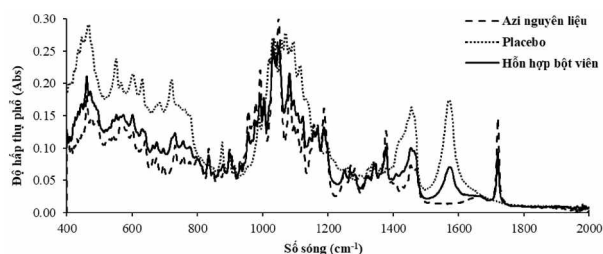
hiện điều này, phổ gốc sau khi đo sẽ xuất ra dưới dạng file csv và biến đổi bằng phần mềm Microsoft excel. Sau khi biến đổi, phổ các nồng độ đã tách nhau rõ ràng theo các nồng độ khác nhau của azithromycin trong mẫu (Hình 1B). Kết quả sau chuyển đổi cho thấy cường độ phổ của các mẫu hầu được dự đoán là đã thay đổi tuyến tính theo tỷ lệ của azithromycin có trong mẫu, nhưng với các hệ số đã chuyển đổi thích hợp.



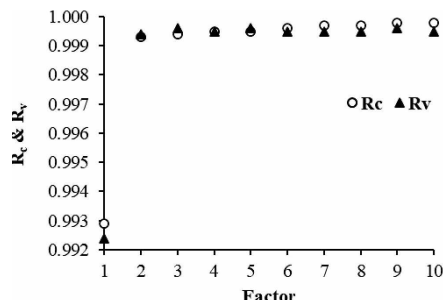
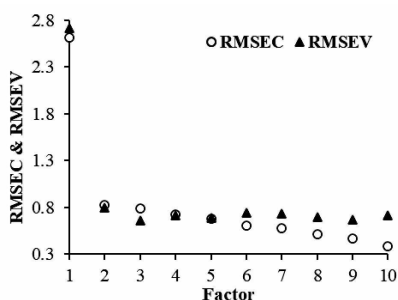
**Hình 1.** Phổ FTIR-ATR đại diện của các hỗn hợp mẫu tự tạo chứa azithromycin  
A) Phổ trước khi biến đổi phổ B) Phổ sau khi biến đổi phổ

Nhập các dữ liệu phổ (dạng file csv) sau khi biến đổi vào phần mềm TQ-Analyst để xây dựng mô hình định lượng. Theo dự đoán trên, cường độ phổ sau biến đổi sẽ phụ thuộc vào hàm lượng chất phân tích trong mẫu, do đó mô hình phân tích đa biến bình phương tối thiểu từng phần (Partial Least Square – PLS) sẽ được lựa chọn để thiết lập mô hình định lượng. Đồng thời, phổ các hỗn hợp bột viên lúc này biến đổi theo tỷ lệ chất phân tích và tỷ lệ nền mẫu (placebo) trộn vào, nên vùng phổ được lựa chọn dự kiến sẽ là vùng mà các tín hiệu của azithromycin và tá dược có đáp ứng tốt nhất nhằm giảm bớt tác động của các yếu tố nhiễu gây ra bởi thiết bị, điều kiện đo... Kết quả so sánh phổ của azithromycin, nền mẫu và hỗn hợp bột viên cho thấy vùng phổ từ  $920\text{ cm}^{-1}$  đến  $1500\text{ cm}^{-1}$  đáp ứng được các yêu cầu trên và đã được lựa chọn để xây dựng phương

pháp (Hình 2). Cuối cùng, để tối ưu hóa mô hình, đối với mỗi hỗn hợp, lựa chọn ngẫu nhiên 2 phổ (trong 10 phổ) làm mẫu đánh giá nội mô hình.



**Hình 2.** Phổ nguyên liệu azithromycin, phổ nền mẫu và phổ hỗn hợp bột viên



**Hình 3.** Kết quả tối ưu hóa mô hình dựa trên số factor

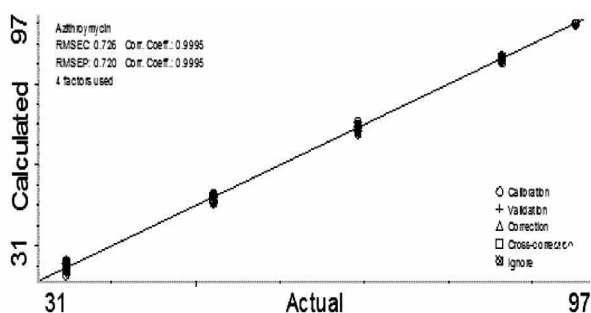
Tiến hành xây dựng mô hình và tối ưu mô hình thông qua số lượng các factor được sử dụng. Để đáp ứng yêu cầu về độ tuyến tính của phương pháp và việc cân bằng

nội mô hình, hệ số tương quan  $R_c$  của mô hình yêu cầu phải không ít hơn 0,998, đồng thời các giá trị căn bậc hai của bình phương sai số trung bình của mô hình xây dựng



(RMSEC) và mô hình thẩm định (RMSEV) phải nhỏ nhất và sai khác nhau ít nhất.

Theo kết quả đã khảo sát mô hình (Hình 3), tại giá trị số factor từ 3 trở lên, giá trị  $R_c$  và  $R_v$  hầu như không thay đổi và đều lớn hơn 0,998. Từ giá trị factor 4 trở đi, RMSEC và RMSEV hầu như không thay đổi, tại giá trị factor là 4 và factor là 5 thì hai giá trị này gần nhau nhất. Với số factor ít hơn thì nguy cơ quá bão hòa mô hình (over fitting) ít hơn nên trong trường hợp này số factor xây dựng mô hình được lựa chọn là 4. Mô hình định lượng với các giá trị sau tối ưu được biểu diễn như Hình 4.



**Hình 4.** Mô hình định lượng azithromycin trong hỗn hợp nền mẫu viên nén tự tạo

Sau khi đã xây dựng được mô hình định lượng, đối với các mẫu chứa azithromycin cùng nền mẫu như công thức trên, chỉ cần đo phổ IR, áp phổ vào mô hình sẽ cho kết quả hàm lượng azithromycin trong mẫu.

### 3.3. Thẩm định quy trình định lượng azithromycin bằng phương pháp quang phổ FTIR-ATR

Để đáp ứng các yêu cầu của mô hình định lượng thường quy, mô hình định lượng azithromycin đã xây dựng sẽ được thẩm định các chỉ tiêu về độ chọn lọc, độ thích hợp hệ thống, độ tuyến tính, độ đúng, độ lặp lại và độ chính xác trung gian.

Về độ chọn lọc của phương pháp, phổ IR được xem là phổ vân tay để nhận dạng các mẫu, phổ IR của nguyên liệu azithromycin và của nền mẫu đã được lựa chọn các vùng phân tích và xây dựng phương pháp đặc trưng cho các thành phần này, do đó kết quả phân tích chỉ phụ thuộc vào tỷ lệ hai thành phần này (nguyên liệu và nền mẫu) trong các mẫu phân tích. Thêm vào đó, kết quả đánh giá độ đúng cho thấy sai số ở các nồng độ đánh giá độ đúng không quá 1,3 % so với giá trị thực (xem kết quả phân đánh giá độ đúng). Như vậy phương pháp đã xây dựng là đặc hiệu.

Tiến hành đo phổ lặp lại của mẫu phân tích có hàm lượng 100 % so với hàm lượng trong công thức bào chế

(sử dụng thử 1 của phần đánh giá độ lặp lại). Xác định RSD của kết quả định lượng. Sau 06 lần đo lặp lại liên tiếp, giá trị trung bình là 69,1 % và RSD là 0,6 %. Giá trị hàm lượng thu được đáp ứng yêu cầu về độ thích hợp hệ thống ( $RSD \leq 1,3 \%$ ). Như vậy phương pháp đã xây dựng đảm bảo về độ thích hợp hệ thống để định lượng azithromycin trong mẫu bột viên đã thiết kế.

Độ tuyến tính của phương pháp được đánh giá thông qua hệ số tương quan giữa hàm lượng azithromycin thực sử dụng để xây dựng phương pháp và hàm lượng azithromycin tính toán được từ mô hình đã xây dựng. Kết quả ở Hình 4 cho thấy hệ số tương quan của mô hình là 0,9994 đáp ứng yêu cầu của AOAC ( $R \geq 0,998$ ). Như vậy phương pháp định lượng đã xây dựng đảm bảo độ tuyến tính để định lượng azithromycin trong mẫu bột viên đã thiết lập.

Để đánh giá độ đúng của phương pháp, nguyên liệu azithromycin được trộn vào nền mẫu để thu được hỗn hợp bột có hàm lượng (kl/kl) azithromycin khoảng 55 %; 70 % và 83 %, tương ứng với khoảng 80 %, 100 % và 120 % nồng độ định lượng. Mỗi điểm nồng độ chế tạo 06 mẫu độc lập. Với mỗi mẫu, tiến hành lấy mẫu tại 5 vị trí khác nhau trong hỗn hợp bột, đo phổ và đưa vào mô hình để xác định hàm lượng. Giá trị hàm lượng của mỗi mẫu chính là giá trị trung bình hàm lượng của 5 vị trí lấy mẫu, giá trị trung bình chỉ có ý nghĩa khi RSD của 5 kết quả không quá 2,0 %.

Đối với các hỗn hợp mẫu, tại ba mức nồng độ 80 %, 100 % và 120 % so với nồng độ định lượng, kết quả định lượng tại 5 vị trí lấy mẫu của từng hỗn hợp bột có RSD nằm trong khoảng từ 0,4 % đến 1,9 %, kết quả này đáp ứng yêu cầu về việc kiểm soát sự đồng nhất khi trộn mẫu ( $RSD \leq 2,0 \%$ ). Mô hình định lượng đã xây dựng có độ thu hồi trung bình từ 99,3 % đến 101,6 %; RSD lớn nhất là 0,8 %, đã đáp ứng được các yêu cầu của ICH và AOAC (độ thu hồi từ 98,0 % đến 102,0 % và  $RSD \leq 1,3 \%$ ). Như vậy phương pháp định lượng đã xây dựng đáp ứng yêu cầu về độ đúng để định lượng azithromycin trong mẫu bột viên nghiên cứu trên.

Từ kết quả đánh giá độ tuyến tính và độ đúng, phương pháp đã xây dựng có khoảng làm việc tính theo hàm lượng azithromycin (% kl/kl) trong bột từ khoảng 55 % tới 83 %. Với hàm lượng làm việc trong bột viên tự tạo khoảng 69 % (kl/kl), khoảng làm việc này tương ứng 80 – 120 % hàm lượng làm việc, phù hợp với các quy định hiện hành của ICH về hiệu năng của phương pháp phân tích.

Độ lặp lại của phương pháp được đánh giá trên các giá trị định lượng azithromycin trong mẫu hỗn hợp bột có nồng độ bằng nồng độ đích (khoảng 69 %) đã được thiết lập ở phần thử độ đúng. Tiếp tục chế tạo thêm 06 hỗn hợp bột có nồng độ 100 % nồng độ định lượng, thực hiện bởi

kiểm nghiệm viên khác và ngày phân tích khác ngày đánh giá độ đúng. Tiến hành định lượng các mẫu đã chế tạo như tương tự như qui trình đã làm với phần thử độ đúng. Ở kết quả độ lặp lại, hàm lượng azithromycin trung bình đạt 69,1 % với độ lặp lại, RSD, là 0,6 %. Kết hợp kết quả hai ngày định lượng, hàm lượng azithromycin trung bình đạt 69,1 % và độ lặp lại, RSD, là 0,6 %. Như vậy cả độ lặp lại và độ chính xác trung gian đều cho RSD đáp ứng yêu cầu (trong ngày < 1,3 % và khác ngày < 2 %).

### 3.4. Bàn luận

Với một viên nén biết rõ thành phần công thức bào chế, kết quả ở phần 3.2 trên một bột viên tự tạo có công thức bào chế và tỷ lệ thành phần biết trước cho thấy tính khả thi của việc xây dựng phương pháp định lượng azithromycin trong viên nén sử dụng kỹ thuật FTIR-ATR.

Các phổ FTIR-ATR sau khi được đồng nhất hóa bằng quá trình biến đổi phổ đơn giản để giảm thiểu sự dao động cường độ tuyệt đối giữa các lần đo phổ gây ra bởi sự không ổn định về quang trình. Tiếp đến chỉ cần trải qua quá trình xây dựng mô hình theo thuật toán hồi quy PLS đã được tích hợp sẵn trên phần mềm xử lý phổ, không cần phải áp dụng các cách tiếp cận toán hóa phức tạp hơn, thuật toán này được tích hợp hầu hết ở các phần mềm xử lý phổ thông dụng. Do đó, đây là một điểm thuận lợi cho áp dụng thường quy tại các phòng thí nghiệm phân tích có trang bị thiết bị FTIR-ATR, do không đòi hỏi ở người vận hành quá nhiều kiến thức chuyên sâu về toán hóa và phân tích dữ liệu.

Từ kết quả thu được có thể thấy rằng để phương pháp định lượng bằng FTIR-ATR trực tiếp trên mẫu bột viên ở dạng rắn có được độ đúng, độ lặp lại chấp nhận được cho việc ứng dụng thường quy trong kiểm nghiệm, mỗi mô hình định lượng cần được thiết lập trên đúng nền có các thành phần như công thức bào chế của sản phẩm thực. Đây có thể là một hạn chế vì phương pháp thiết lập được chưa cho phép cho phép áp dụng trên một mẫu viên nên có công thức bào chế bất kỳ chứa azithromycin. Tuy nhiên, trong trường hợp cần kiểm soát chất lượng của số lượng lớn lô sản xuất của cùng sản phẩm viên nén với cùng thành phần công thức bào chế, cách tiếp cận đã thực hiện trong nghiên cứu này là khả thi để xây dựng phương pháp định lượng azithromycin bằng FTIR-ATR trong sản phẩm viên nén.

### 4. KẾT LUẬN

Phương pháp định lượng azithromycin trong bột viên nén đã biết trước thành phần đã được xây dựng sử dụng kỹ thuật FTIR-ATR và sử dụng xử lý sơ bộ phổ bằng chuyển đổi phổ cùng tỷ lệ tại  $1720\text{ cm}^{-1}$ , kết hợp hồi quy tuyến tính một phần (PLS) để thiết lập mô hình định lượng. Nguyên tắc xử lý phổ và thiết lập mô hình đơn giản, sử dụng các tiện ích sẵn có trên phần mềm xử lý phổ thương mại, thuận lợi cho áp dụng thường quy mà không cần hiểu biết quá sâu về toán hóa hay sử dụng các phần mềm chuyên dụng cho toán hóa. Mô hình được thẩm định theo các quy định hiện hành về đánh giá hiệu năng phương pháp phân tích trong kiểm nghiệm thuốc. Kết quả thẩm định phương pháp cho thấy phương pháp dựa trên kỹ thuật FTIR-ATR đảm bảo độ tin cậy cho ứng dụng dự kiến.

### TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Hội đồng Dược thư Quốc gia (2015), *Dược thư Quốc gia Việt Nam*, Nhà xuất bản Y học, pp. 227-231.
2. Dược Cục Quản lý (2022), “Drugbank.vn”, Retrieved 13/11/2022, 2022, from <https://drugbank.vn/>.
3. Commission British Pharmacopoeia (2022), Azithromycin, *British Pharmacopoeia 2021*, pp 239-242.
4. Commission United States Pharmacopeia (2021), *United States Pharmacopeia 44 NF 39*.
5. Y. Li, et al. (2011), Classification and Quantitative Analysis of Azithromycin Tablets by Raman Spectroscopy and Chemometrics. *American Journal of Analytical Chemistry*, 2, pp. 135-141.
6. European Medicines Agency (1996), *Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2(R1)*.
7. AOAC International (2016), *Guidelines for Standard Method Performance Requirements*. Appendix F.

### SUMMARY

An FTIR-ATR based method was developed for quantitation of azithromycin in tablet powder with known composition. The method employed spectra of reference mixture containing from 35 % to 95 % azithromycin (w/w) recorded in wavenumber zone from  $400\text{ cm}^{-1}$  to  $2000\text{ cm}^{-1}$  and normalized at wavenumber  $1720\text{ cm}^{-1}$  to build PLS assay model using 4 factors. The method was validated according to current international requirements on performance of analytical method, and was proved as suitable for intended purpose.

(Ngày nhận bài: 28/12/2022; Ngày phản biện: 06/02/2023; Ngày duyệt đăng: 17/02/2023)

# XÂY DỰNG VÀ THẨM ĐỊNH PHƯƠNG PHÁP XÁC ĐỊNH DƯ LƯỢNG MỘT SỐ CHẤT GÂY NGHIỆN TRONG Bùn THẢI BẰNG LC-MS/MS

Trần Thị Thanh Huệ<sup>1,2</sup>, Nguyễn Thị Lan Anh<sup>2,3</sup>, Hoàng Văn Đức<sup>1</sup>,  
Nguyễn Thị Dung<sup>1</sup>, Thái Khánh Phong<sup>4</sup>, Nguyễn Thị Kiều Anh<sup>2,✉</sup>

<sup>1</sup>Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương; <sup>2</sup>Trường Đại học Dược Hà Nội;

<sup>3</sup>Trường Cao đẳng Y tế Hà Nội, <sup>4</sup>Đại học Queensland – Úc.

**Từ khoá:** Bùn thải, Chất gây nghiện, LC-MS/MS, Methamphetamin

## 1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Nằm gần khu vực “Tam giác Vàng” cùng đường biên giới dài và địa hình 3/4 là đồi núi nên số lượng chất gây nghiện bất hợp pháp bị bắt giữ ở Việt Nam tăng mạnh trong giai đoạn gần đây tuy nhiên các số liệu về lượng sử dụng thực tế trong cộng đồng vẫn hạn chế. Trong những thập kỷ gần đây, phương pháp dịch tễ học nước thải (Wastewater-Based Epidemiology) đã được phát triển và áp dụng rộng rãi nhằm cung cấp thông tin về việc tiêu thụ hoặc phơi nhiễm với các hóa chất bao gồm thuốc, sản phẩm chăm sóc sức khỏe, rượu, thuốc lá và đặc biệt là chất gây nghiện ở nhiều nước khác nhau trên thế giới. Nguyên lý của phương pháp này ước tính lượng tiêu thụ các chất dựa vào các số liệu về dư lượng của các chất chuyển hoá hay chất gốc được thải ra môi trường nên khách quan hơn. Tại Việt Nam, hiện có nghiên cứu phân tích dư lượng một số chất gây nghiện trong nước thải và ước tính tỷ lệ tiêu thụ trái phép các chất này trong cộng đồng [1], [2]. Tuy nhiên, tính kỵ nước và các cơ chế khác như tạo cầu nối cation, trao đổi cation, liên kết hydro... làm cho một phần các chất này tồn tại trong nước thải bị hấp phụ vào bùn [3], [4]. Để có cái nhìn toàn diện về các chất xả thải ra môi trường nhằm phục vụ phương pháp WBE thì ngoài việc phân tích trong nước thải còn cần đến dữ liệu dư lượng các chất này trong bùn thải. Đây cũng là hướng nghiên cứu mới chưa được thực hiện tại Việt Nam.

Xuất phát từ những lý do trên, chúng tôi thực hiện nghiên cứu “**Xây dựng và thẩm định phương pháp xác định dư lượng của một số chất gây nghiện trong bùn thải bằng phương pháp LC-MS/MS**” nhằm xây dựng được một phương pháp có độ đặc hiệu, độ nhạy, độ chính xác để định lượng đồng thời dư lượng của một số chất gây nghiện trong bùn thải.

## 2. NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1. Nguyên vật liệu

- Các chuẩn chất gây nghiện và chuẩn nội đồng vị sản xuất bởi Cerilliant (Mỹ) gồm: Amphetamin (AMP): lô FE5061406, hàm lượng 1 mg/ml Methanol; Ketamin (KET): lô FE012110-01, hàm lượng 1 mg/ml; 3,4-Methylenedioxymethamphetamin (MDMA): lô FE043013-07, hàm lượng 1 mg/ml; Methamphetamin (METH): lô FE082712-03, hàm lượng 1 mg/ml; KET-d<sub>4</sub>: lô FE04141401, hàm lượng 100 µg/ml; METH - d<sub>5</sub>: lô FE012012-02, hàm lượng 1 mg/ml; MDMA - d<sub>5</sub>: lô FE051413-01, hàm lượng 1 mg/ml.

- Các dung môi, hoá chất: Methanol (HPLC): Merck (Đức); Acid formic (LC-MS): Fisher (Mỹ); Acid formic, Dicloromethan, Dinatri hydrophosphat, Acid citric, Dinatri EDTA (P.A): Scharlau (Tây Ban Nha).

### 2.2. Mẫu nghiên cứu

- Mẫu nền: mẫu bùn ao không có chất phân tích. Địa điểm lấy mẫu nền: tại ao chứa nước không lưu thông với các nguồn nước ao, hồ, sông khác ở đội 10, thôn Lưu Tuyền, xã Hải Thanh, Hải Hậu, Nam Định.

- Mẫu tự tạo: Mẫu nền có thêm các chất chuẩn nghiên cứu với tỉ lệ nhất định.

### 2.3. Thiết bị, dụng cụ

- Các thiết bị sử dụng trong nghiên cứu: Cân phân tích Sartorius CP224S (Đức, độ chính xác d = 0,01mg); Hệ thống sắc ký lỏng khối phổ 2 lần LC - MS/MS Waters Xevo TQD (Mỹ); Máy siêu âm Elma S100H (Đức); Bộ dụng cụ chiết pha rắn Phenomenex 12 vị trí (Mỹ); Máy ly tâm lạnh Sigma 4-16KS (Đức); Thiết bị cô đuổi dung môi bằng khí nitơ Thermo 24 vị trí TS-18824 (Mỹ); Cột chiết pha rắn InertSep HLB FF 500 mg/6 ml (Nhật).

- Các dụng cụ thủy tinh: Bình định mức, pipet loại A, ống ly tâm...



### 3. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

#### 3.1. Khảo sát điều kiện khối phổ

Lựa chọn chuẩn nội là đồng vị của các chất phân tích nghiên cứu. METH - d5, MDMA - d5, KET - d4 là nội chuẩn tương ứng của METH, MDMA, KET. Riêng AMP do không có chuẩn đồng vị tương ứng nên sử dụng METH - d5 được lựa chọn làm chuẩn nội của AMP (do có cấu tạo gần giống). Các chất chuẩn đồng vị có công thức cấu tạo, tính chất lý hóa tương tự với chất phân tích, chỉ khác nhau về số khối và không có trong tự nhiên nên giảm được các sai số trong quá trình xử lý mẫu, giảm được hiện tượng khử ion.

Tiêm trực tiếp dung dịch chuẩn đơn mỗi chất phân tích/chuẩn nội có nồng độ 100 ppb vào hệ thống khối phổ, không qua cột với hệ dung môi methanol (MEOH) và nước có chứa acid formic (FA) 0,1 % vào hệ thống MS để xác định ion mẹ và hai ion con: ion con có tín hiệu lớn và ổn định hơn làm ion định lượng, ion con còn lại dùng để định tính. Các điều kiện phân mảnh ion như điện thế Cone, thế phân mảnh được tối ưu hóa tự động theo thiết bị khối phổ.

#### 3.2. Khảo sát điều kiện sắc ký

Tiến hành pha dung dịch chuẩn hỗn hợp gồm các chất phân tích AMP, KET, METH, MDMA nồng độ 5 ppb và nội chuẩn METH - d5, MDMA - d5, KET - d4 nồng độ 5 ppb bằng dung môi nước để khảo sát lựa chọn các điều kiện sắc ký như sau:

Khảo sát trên cột sắc ký C18 là Agilent Eclipse XBD C18 (5  $\mu$ m; 4,6 x 150 mm) và Acquity BEH C18 (1,7  $\mu$ m; 2,1 x 50 mm). Sử dụng cùng hệ pha động MeOH : nước (đều chứa FA 0,1 %).

Khảo sát hệ pha động gồm hệ pha động **1**) gồm kênh A là MeOH và kênh B là nước (đều có amoni acetat 5 mM và điều chỉnh về pH 3,8 bằng acid formic) với chương trình gradient bắt đầu với 5 % kênh A, từ phút thứ 3 tăng dần kênh A lên 30 % ở phút thứ 4; tiếp tục tăng dần kênh A đến 50 % ở phút thứ 4,5 và 90 % ở phút thứ 5; đến phút thứ 6 tỷ lệ kênh A là 100 %; sau đó giảm tỷ lệ kênh A còn 5 % ở phút thứ 8. Đồng thời khảo sát hệ pha động **2**) gồm kênh A là MeOH và kênh B là nước (đều có FA 0,1 %) với chương trình gradient bắt đầu với 10 % kênh A và duy trì đến phút thứ 2; tăng tỷ lệ kênh A đến 95 % ở phút thứ 4 và duy trì đến phút thứ 10; đến 10,1 phút giảm còn 10 % kênh A; tổng thời gian chương trình là 15 phút. Cố định các điều kiện sắc ký cột Acquity BEH C18 (1,7  $\mu$ m; 2,1 x 50 mm), nhiệt độ cột 40 °C, thể tích tiêm 10  $\mu$ l, tốc độ dòng 0,2 ml/phút, điều kiện khối phổ đã được lựa chọn. Sau khi lựa chọn được các pha động và chương trình chạy, tiếp tục

khảo sát với các tốc độ dòng khác nhau 0,1 ml/phút; 0,2 ml/phút và 0,3 ml/phút.

Trong phương pháp phân tích LC-MS/MS, lượng mẫu có thể ảnh hưởng tới quá trình ion hoá nên sẽ ảnh hưởng đến tín hiệu, hình dạng pic. Do hệ thống sắc ký sử dụng khuyến cáo thể tích tiêm mẫu tối đa là 10  $\mu$ l, nên khảo sát với 2 thể tích tiêm mẫu là 5, 10  $\mu$ l.

Tiêu chí lựa chọn cột sắc ký, hệ pha động và điều kiện chạy, tốc độ dòng, thể tích tiêm mẫu là pic cân xứng, gọn, đẹp và cường độ tín hiệu cao.

#### 3.3. Xử lý mẫu

Trong hầu hết các nghiên cứu, cột chiết pha rắn HLB là cột hấp phụ cân bằng dầu nước phù hợp với các chất phân tích được lựa chọn. Do đó, trong nghiên cứu này sử dụng cột chiết pha rắn InertSep HLB FF (500 mg, 6 ml) để chiết các chất phân tích từ bùn thải.

Chuẩn bị mẫu tự tạo gồm 1 g mẫu bùn (sau khi phơi khô, nghiền nhỏ) không chứa các chất phân tích được thêm 30  $\mu$ l dung dịch chuẩn hỗn hợp AMP, KET, METH, MDMA nồng độ 100 ppb mỗi chất (tương ứng với 3 ng mỗi chất phân tích) và 5 ng mỗi chất chuẩn nội METH - d5, MDMA - d5, KET - d4 (50  $\mu$ l hỗn hợp dung dịch chuẩn nội nồng độ mỗi chất 100 ppb) để khảo sát lựa chọn dung môi hòa tan mẫu và dung môi rửa giải chiết pha rắn. Kết quả được so sánh với đáp ứng diện tích pic của dung dịch chuẩn chứa các chất phân tích AMP, KET, METH, MDMA nồng độ 6 ppb và các nội chuẩn METH - d5, MDMA - d5, KET - d4 nồng độ 10 ppb từ dung dịch chuẩn hỗn hợp 100 ppb và nội chuẩn hỗn hợp 100 ppb với dung môi nước. Xây dựng phương pháp chiết tách các chất phân tích trong bùn thải với 1 g mẫu bùn đã xử lý thô bằng cách ly tâm tách nước và phơi khô tự nhiên đến hàm ẩm nhỏ hơn 15 %. Thêm 3 ng các chất phân tích và 5 ng các nội chuẩn (như trên). Lắc đều trong 60 giây, để ổn định 15 phút. Phân tán mẫu trong dung môi 3 lần, mỗi lần 5 ml hỗn hợp dung môi phân tán, lắc xoáy 15 giây, siêu âm 10 phút, ly tâm 4000 vòng/phút trong 15 phút, hút lấy phần dịch trong vào bình đựng mức 250 ml. Thêm nước vừa đủ 250 ml, lắc đều. Hoạt hóa cột SPE với 6 ml MeOH, 6 ml nước, đưa toàn bộ 250 ml mẫu lên cột SPE chảy tự do dưới tác dụng của trọng lực. Loại tạp bằng 5 ml nước, sau đó rửa giải bằng dung môi. Cô dịch rửa giải dưới dòng khí N<sub>2</sub> ở nhiệt độ 40 °C. Hòa tan cân trong 0,5 ml hỗn hợp dung môi nước : MeOH (9:1), lắc xoáy 60 giây và phân tích trên hệ thống LC - MS/MS.

Pha mẫu chuẩn gồm các chất phân tích nồng độ 6 ppb và nội chuẩn 10 ppb. Tiêm vào hệ thống sắc ký với cùng điều kiện như trên. Hiệu suất chiết được tính bằng tỷ số diện tích pic của chất phân tích trong mẫu tự tạo và mẫu chuẩn.

**Khảo sát dung môi phân tán mẫu:** Tiến hành khảo sát khả năng phân tán các chất phân tích từ nền mẫu bằng 2 hệ dung môi khác nhau là **1)** đệm McIlvain pH 4,5 (có chứa EDTA 0,1 %) : MeOH (1 : 1) và **2)** nước (có chứa FA 0,5 % và EDTA 0,1 %) : MeOH (1 : 1).

**Khảo sát dung môi rửa giải SPE:** Tiến hành khảo sát các dung môi khác nhau là **1)** 6 ml MeOH; 3 ml hỗn hợp MeOH : dicloromethan (1:1); **2)** 9 ml MeOH và **3)** 9 ml MeOH có FA 0,1 %. Lựa chọn dung môi rửa giải cho hiệu suất chiết cao và rút ngắn được thời gian xử lý mẫu.

**3.4. Thẩm định phương pháp phân tích:** Tiến hành thẩm định phương pháp đã xây dựng được theo các tiêu chí của AOAC 2016 và 2002/657/EC.

## 4. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

### 4.1. Khảo sát điều kiện MS

Kết quả khảo sát đã tối ưu hoá được các thông số của thiết bị khối phổ như sau: nhiệt độ hóa hơi 500 °C; tốc độ khí 800 L/h; điện thế mao quản 1,0 kV và tốc độ khí Cone 30 L/h. Ngoài ra, kết quả khảo sát các điều kiện khối phổ để phát hiện các chất gây nghiện và chất chuẩn nội (IS) được trình bày Bảng 1.

**Bảng 1.** Các điều kiện khối phổ để phân tích các ma túy và nội chuẩn nghiên cứu

| TT | Tên chất/<br>nội chuẩn | Ion mẹ<br>(m/z) | Ion định lượng |                      |                      | Ion định tính |                      |                      |
|----|------------------------|-----------------|----------------|----------------------|----------------------|---------------|----------------------|----------------------|
|    |                        |                 | Ion<br>(m/z)   | Điện thế<br>Cone (V) | Thế phân<br>mảnh (V) | Ion<br>(m/z)  | Điện thế<br>Cone (V) | Thế phân<br>mảnh (V) |
| 1  | AMP                    | 136,00          | 91,00          | 20                   | 14                   | 65,02         | 20                   | 32                   |
| 2  | KET                    | 237,99          | 124,97         | 30                   | 26                   | 206,99        | 30                   | 14                   |
| 3  | KET-d4                 | 242,07          | 128,97         | 30                   | 26                   | 211,00        | 30                   | 14                   |
| 4  | METH                   | 150,00          | 90,99          | 18                   | 16                   | 119,00        | 18                   | 12                   |
| 5  | METH - d5              | 155,12          | 91,76          | 24                   | 16                   | 121,03        | 24                   | 10                   |
| 6  | MDMA                   | 194,07          | 163,04         | 24                   | 12                   | 104,95        | 24                   | 24                   |
| 7  | MDMA - d5              | 199,11          | 165,04         | 26                   | 12                   | 107,03        | 26                   | 24                   |

### 4.2. Khảo sát điều kiện sắc ký

Kết quả khảo sát lựa chọn cột phân tích cho thấy khi phân tích bằng cột Agilent Eclipse XBD C18 (5 µm; 4,6 x 150 mm) pic không cân xứng (pic bị doãng), cường độ tín hiệu với tất cả các chất cũng thấp hơn ở cột Acquity BEH C18 (1,7 µm; 2,1 x 50 mm). Do đó, cột Acquity BEH C18 (1,7 µm; 2,1 x 50 mm) được lựa chọn để khảo sát tiếp theo.

Kết quả khảo sát lựa chọn hệ dung môi pha động cho thấy với hệ pha động 2 với chương trình gradient như đã khảo sát cho pic các chất phân tích đều cân xứng, gọn, đẹp hơn.

Kết quả khảo sát tốc độ dòng cho thấy với tốc độ dòng 0,2 ml/phút pic các chất phân tích cân đối, đáp ứng tín hiệu cao, thời gian phân tích ngắn.

Kết quả khảo sát thể tích tiêm cho thấy với thể tích tiêm 10 µl, pic các chất phân tích và nội chuẩn vẫn gọn, đẹp, cân xứng, đáp ứng tín hiệu cao hơn so với tiêm 5 µl.

### 4.3. Xử lý mẫu

#### 4.3.1. Kết quả khảo sát điều kiện phân tán mẫu

Hệ dung môi 1 cho hiệu suất chiết AMP cao hơn so với hệ dung môi 2 (22,7 % so với 14,9 %). Tuy nhiên đối với những chất còn lại hiệu suất chiết với hệ dung môi 2

cao hơn KET (69,3 %), KET - d4 (74,5 %), METH (38,2 %), METH - d5 (39,1 %), MDMA (65,8 %), MDMA - d5 (70,9 %) so với KET (33,0 %), KET - d4 (30,6 %), METH (28,6 %), METH - d5 (26,6 %), MDMA (33,9 %), MDMA - d5 (32,8 %). Đồng thời, khi ly tâm để lấy dịch, hệ dung môi 2 cho dịch trong, ít tạp hơn. Do đó, chúng tôi lựa chọn hệ dung môi 2 để phân tán mẫu.

#### 4.3.2. Kết quả khảo sát dung môi rửa giải SPE

Rửa giải với dung môi 3: quan sát cần sau cô dưới dòng khí N<sub>2</sub> khi xuất hiện nhiều tinh thể kết tinh màu trắng, không hòa tan trong dung môi pha mẫu là nước : MeOH (9 : 1); MEOH; nước. Có thể EDTA đã tham gia tạo muối khó tan trong quá trình xử lý mẫu. Do đó, dịch sau chiết pha rắn không được tiêm vào hệ thống LC - MS/MS. Rửa giải với dung môi 1 cho hiệu suất chiết của KET, KET - d4 cao hơn (tương ứng là 69,3 % so với 64,3 % và 74,5 % so với 66,7 %) nhưng hiệu suất chiết của AMP lại thấp hơn (14,9 % so với 16,0 %) rửa giải với dung môi 2. Hiệu suất chiết của METH, METH - d5; MDMA, MDMA - d5 gần như tương đồng giữa 2 hệ dung môi rửa giải trên (khoảng từ 38,2 % đến 40,4 % với METH, METH - d5 và từ 65,8 % đến 70,9 % với MDMA, MDMA - d5). Đồng thời, rửa giải với dung môi 2 dịch rửa giải cô nhanh hơn khoảng 1 giờ so với dung môi 1 nên rút ngắn thời gian xử lý mẫu.

Do đó, nghiên cứu sử dụng 6 ml MeOH sau đó là 3 ml hỗn hợp MeOH : dicloromethan (1:1) để rửa giải cột SPE.

Từ các kết quả khảo sát, điều kiện phân tích các gây nghiện trong bùn thải được lựa chọn là:

Điều kiện sắc ký: Cột Acquity BEH C18 (1,7 µm; 2,1 x 50 mm); điều nhiệt cột: 40 °C; tốc độ dòng: 0,2 ml/phút; thể tích tiêm: 10 µl; Pha động: kênh A MeOH chứa FA 0,1 %, kênh B là nước chứa FA 0,1 % với chương trình gradient: 10 % kênh A và duy trì đến phút thứ 2; tăng tỷ lệ kênh A đến 95 % ở phút thứ 4 và duy trì đến phút thứ 10; đến 10,1 phút giảm còn 10 % kênh A; tổng thời gian chương trình là 15 phút

Điều kiện khối phổ: Kiểu khối phổ hai lần (MS/MS), nguồn ion hóa ESI (+). Các thông số của thiết bị khối phổ: nhiệt độ hóa hơi 500 °C; tốc độ khí 800 L/h; điện thế mao quản 1,0 kV và tốc độ khí Cone 30 L/h. Các điều kiện khối phổ để phát hiện các chất gây nghiện và chất chuẩn nội (IS) được trình bày ở Bảng 2.

Chuẩn bị dãy dung dịch chuẩn: Chuẩn bị dãy dung dịch chuẩn gồm 9 dung dịch chuẩn hỗn hợp có nồng độ KET, METH, MDMA, AMP có nồng độ lần lượt là 0,125; 0,25; 0,5; 1; 2; 5; 8; 10; 15 ppb và 3 chuẩn nội METH - d5, MDMA - d5, KET - d4 có nồng độ mỗi chất 5 ppb.

Xử lý mẫu: Cân chính xác khoảng 1 g bùn (khô, nghiền nhỏ) cho vào ống falcon dung tích 15 ml. Thêm 50 µl dung dịch nội chuẩn hỗn hợp METH - d5, MDMA - d5, KET - d4 nồng độ mỗi chất 100 ppb (tương đương 5 ng mỗi nội chuẩn). Lắc xoáy 60 giây, để ổn định 15 phút. Phân tán mẫu trong 5 ml hỗn hợp nước chứa FA 0,5 % và EDTA 0,1 % : MeOH = 1 : 1, lắc xoáy 15 giây, siêu âm 10 phút, ly tâm 4000 vòng/phút trong 15 phút, gạn phần dịch trong vào bình đựng mức 250 ml. Lặp lại 2 lần nữa, mỗi lần với 5 ml hỗn hợp dung môi chiết. Thêm nước vừa đủ 250 ml, lắc đều, đưa toàn bộ mẫu lên cột chiết pha rắn InertSep HLB FF (500 mg/6 ml) đã được hoạt hóa trước đó bằng 6 ml MeOH, 6 ml nước. Loại tạp bằng 5 ml nước. Làm khô cột bằng hút chân không trong 15 phút. Cho lần lượt 6 ml MeOH và 3 ml hỗn hợp MeOH : dicloromethan (1 : 1), rửa giải dưới tác động của trọng lực. Dịch rửa giải được cô dưới dòng khí N<sub>2</sub> ở nhiệt độ 40 °C và hòa tan cân bằng 0,5 ml hỗn hợp nước - MeOH (9 : 1), lắc xoáy 60 giây.

Tính toán kết quả: Nồng độ các chất gây nghiện KET, METH, MDMA trong mẫu được tính toán dựa vào phương trình hồi quy tuyến tính, tỷ lệ đáp ứng của chất phân tích/nội chuẩn tương ứng. Nồng độ các chất AMP trong mẫu được tính toán dựa vào phương trình hồi quy tuyến tính, tỷ lệ đáp ứng của chất phân tích/nội chuẩn METH-d5 và hệ số chuyển (tỷ lệ hiệu suất chiết của METH-d5 và hiệu suất chiết AMP).

4.4. Thẩm định phương pháp phân tích

4.4.1. Hiệu suất chiết mẫu

Tiến hành chiết mẫu tự tạo theo quy trình đã xây dựng. Mẫu tự tạo sau khi chiết tách được tiêm vào hệ thống sắc ký. Hiệu suất chiết được tính bằng tỷ số diện tích pic của chất phân tích trong mẫu tự tạo và mẫu chuẩn. Kết quả thu được cho thấy với quy trình xử lý mẫu đã xây dựng, hiệu suất chiết của KET, MDMA, METH và AMP lần lượt là 69,3 %, 62,5 %, 38,2 %, 14,9 %. Hiệu suất chiết của các chuẩn nội gần tương đương với các chất phân tích tương ứng, cụ thể KET-d4 là 74,5 %; MDMA-d5 là 70,9 % và MAMP-d5 là 39,1 %.

4.4.2. Độ thích hợp của hệ thống

Độ thích hợp của hệ thống được đánh bằng kết quả tiêm lặp lại sáu lần dung dịch chuẩn hỗn hợp các chất phân tích nồng độ 10 ppb và chuẩn nội nồng độ 5 ppb pha bằng dung môi nước vào hệ thống LC - MS/MS. Kết quả phân tích thu được theo Bảng 2 cho thấy hệ số biến thiên (RSD %) của thời gian lưu rất thấp (< 2 %) và RSD của tỷ lệ diện tích pic các chất phân tích với chuẩn nội đều < 5 %. Như vậy các điều kiện sắc ký đã lựa chọn, hệ thống LC - MS/MS sử dụng là phù hợp và đảm bảo độ ổn định để phân tích các chất AMP, METH, MDMA và KET.

Bảng 2. Kết quả đánh giá độ phù hợp của hệ thống LC - MS/MS

| Tên chất             |           | TB   | RSD (%) |
|----------------------|-----------|------|---------|
| Thời gian lưu (phút) | AMP       | 4,43 | 0,12    |
|                      | METH      | 4,61 | 0,12    |
|                      | MDMA      | 4,67 | 0,00    |
|                      | KET       | 4,97 | 0,00    |
|                      | METH - d5 | 4,59 | 0,09    |
|                      | MDMA - d5 | 4,66 | 0,00    |
|                      | KET-d4    | 4,97 | 0,10    |
| Tỷ lệ diện tích      | AMP/IS    | 3,92 | 2,99    |
|                      | METH/IS   | 6,18 | 2,48    |
|                      | MDMA/IS   | 1,64 | 0,96    |
|                      | KET/IS    | 2,47 | 0,29    |

4.4.3. Độ chọn lọc/đặc hiệu

Tiến hành phân tích các mẫu trắng, mẫu trắng thêm chuẩn và mẫu chuẩn, kết quả như sau: Trên sắc ký đồ của mẫu trắng thêm chuẩn cho các pic có thời gian lưu trùng với thời gian lưu của các pic trên sắc ký đồ các mẫu chuẩn. Trên sắc ký đồ mẫu trắng tại thời gian lưu của các chất phân tích AMP, METH, MDMA, KET đáp ứng là

rất thấp, không đáng kể; METH - d5, MDMA - d5, KET - d4 không có pic. Mỗi chất phân tích đều được xác nhận bằng 1 ion mẹ và hai ion con, đạt yêu cầu về độ đặc hiệu của phương pháp LC - MS/MS với số điểm IP là 4 (đáp ứng quy định của Châu Âu 2002/657/EC về phân tích dư lượng).

#### 4.4.4. Đường chuẩn và khoảng tuyến tính

Phân tích các dung dịch chuẩn có chứa các chất phân tích nồng độ từ 0,125 ppb đến 15 ppb và các nội chuẩn nồng độ 5 ppb. Xác định sự tương quan giữa nồng độ các chất gây nghiện và tỉ lệ diện tích pic của các chất này so với chuẩn nội thu được trên sắc ký đồ bằng phương pháp hồi qui tuyến tính. Kết quả được trình bày theo Bảng 3.

**Bảng 3.** Kết quả khảo sát độ tuyến tính của phương pháp

| Tên chất | Phương trình hồi quy   | Hệ số tương quan |
|----------|------------------------|------------------|
| AMP      | $y = 0,3022x + 0,0206$ | 0,9998           |
| METH     | $y = 0,4489x + 0,0207$ | 0,9999           |
| KET      | $y = 0,1747x + 0,0179$ | 0,9990           |
| MDMA     | $y = 0,1248x - 0,0065$ | 0,9998           |

Kết quả thẩm định cho thấy đường tuyến tính của cả 4 chất nghiên cứu có hệ số tương quan  $r > 0,995$  trong khoảng nồng độ khảo sát. Như vậy có sự phụ thuộc tuyến tính giữa tỷ lệ diện tích pic các chất phân tích/ chuẩn nội tương ứng vào nồng độ các chất phân tích nghiên cứu.

#### 4.4.5. Độ đúng - Độ chính xác

Tiến hành phân tích các mẫu nền đã được thêm các chất phân tích nồng độ thấp 0,5 ppb, trung bình 5 ppb, cao 10 ppb; cố định nồng độ nội chuẩn 5 ppb. Tính kết quả lượng tìm lại dựa vào đường chuẩn phân tích cùng ngày với  $r \geq 0,995$  và tỷ lệ đáp ứng của chất phân tích/nội chuẩn và hệ số chuyển đổi với AMP (bằng tỷ số hiệu suất chiết của METH-d5 và AMP). Kết quả phân tích thu được theo Bảng 4.

Tại nồng độ 0,5 ppb, độ đúng của các chất phân tích phân tích đều nằm trong khoảng từ 40 % đến 120 % và hệ số biến thiên RSD đều  $< 30 \%$ . Tại nồng độ 5 ppb và 10 ppb, độ đúng đều nằm trong khoảng từ 60 % đến 115 %, hệ số biến thiên RSD đều  $< 21 \%$ . Như vậy, phương pháp đã xây dựng cho độ đúng và độ chính xác đáp ứng theo yêu cầu của AOAC và 2002/657/EC.

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

| Nồng độ          | AMP   |                     | METH  |                       | MDMA  |                      | KET   |                      |
|------------------|-------|---------------------|-------|-----------------------|-------|----------------------|-------|----------------------|
|                  | R (%) | Thống kê (%)        | R (%) | Thống kê (%)          | R (%) | Thống kê (%)         | R (%) | Thống kê (%)         |
| LQC<br>(0,5 ppb) | 70,3  | TB=70,0<br>RSD=7,25 | 110,7 | TB=110,1<br>RSD=1,87  | 113,9 | TB=114,5<br>RSD=1,99 | 88,7  | TB=87,5<br>RSD=2,69  |
|                  | 74,9  |                     | 107,8 |                       | 112,5 |                      | 84,8  |                      |
|                  | 64,7  |                     | 111,8 |                       | 117,0 |                      | 89,0  |                      |
| MQC<br>(5 ppb)   | 90,5  | TB=90,4<br>RSD=1,52 | 105,5 | TB=106,0<br>RSD=1,11  | 108,2 | TB=107,3<br>RSD=0,85 | 106,0 | TB=106,3<br>RSD=1,13 |
|                  | 91,7  |                     | 107,4 |                       | 107,1 |                      | 105,3 |                      |
|                  | 89,0  |                     | 105,2 |                       | 106,4 |                      | 107,6 |                      |
| HQC<br>(10 ppb)  | 88,0  | TB=88,4<br>RSD=1,16 | 108,5 | TB =108,1<br>RSD=0,68 | 108,5 | TB=108,0<br>RSD=0,72 | 109,8 | TB=107,4<br>RSD=1,88 |
|                  | 89,6  |                     | 108,6 |                       | 107,1 |                      | 106,2 |                      |
|                  | 87,6  |                     | 107,3 |                       | 108,3 |                      | 106,3 |                      |

#### 4.4.6. Giới hạn định lượng (LOQ)

Tiến hành chiết tách và phân tích các mẫu tự tạo chứa các chất phân tích nồng độ 0,1 ppb;0,2 ppb và nội chuẩn nồng độ 5 ppb theo quy trình đã xây dựng. Lượng chuẩn thêm vào được tính dựa vào đường chuẩn xây dựng cùng ngày phân tích với  $r > 0,995$ . Đối với AMP do hiệu suất chiết của AMP (14,9 %) và chuẩn

nội METH (39,1 %) chênh lệch lớn nên phải kết hợp với hệ số chuyển. Kết quả theo Bảng 5, đối với KET, MDMA đều đạt độ đúng và độ chính xác tại nồng độ 0,1 ppb; METH chỉ đạt độ đúng, độ chính xác tại nồng độ 0,2 ppb; riêng AMP không đạt độ đúng, độ chính xác ở các nồng độ này nên nồng độ 0,5 ppb được xác nhận là LOQ của AMP.



**Bảng 5. Kết quả khảo sát LOQ của phương pháp**

| Chất phân tích   | KET<br>(0,1 ppb) | MDMA<br>(0,1 ppb) | METH<br>(0,2 ppb) |
|------------------|------------------|-------------------|-------------------|
| Độ đúng (%)      | 100,9            | 118,9             | 97,7              |
| Độ chính xác (%) | 7,35             | 0,88              | 5,10              |

## 5. BÀN LUẬN

### 5.1. Kỹ thuật xử lý mẫu

Với mục tiêu của nghiên cứu là xác định dư lượng chất phân tích trong bùn thải, việc lựa chọn kỹ thuật xử lý mẫu đóng vai trò quan trọng đến kết quả nghiên cứu. Đề tài đã xây dựng quy trình xử lý mẫu bằng cách phơi khô trong điều kiện thường sau đó phân tán mẫu bằng dung môi ở điều kiện áp suất thường kết hợp chiết pha rắn. Với việc phơi mẫu bùn ở điều kiện thường, chất phân tích ít bị ảnh hưởng hơn so với sấy ở nhiệt độ cao, đồng thời có tính ứng dụng cao hơn ở Việt Nam so với những nghiên cứu trước đó sử dụng kỹ thuật đông khô trong nghiên cứu của Rodrigo Álvarez-Ruiz [3], Nicola Mastroianni [5], Paula Arbeláez [6].

Chiết pha rắn với ưu điểm làm giàu và làm sạch mẫu tốt, chọn lọc là phương pháp được dùng phổ biến trong các nghiên cứu về dư lượng các chất trong môi trường. Methanol là dung môi rửa giải được sử dụng nhiều nhất. Sử dụng hỗn hợp MeOH : dicloromethan rửa giải hiệu suất vẫn giữ nguyên, thời gian cô mẫu giảm đáng kể so với chỉ sử dụng MeOH. Nghiên cứu đã tiến hành chiết với tốc độ đưa mẫu qua cột thấp (chảy dưới tác dụng của trọng lực) và cho kết quả hiệu suất chiết khá cao (KET 69,3 %, MDMA 62,5 %, METH 38,2 %, AMP 14,9 %). So sánh với các nghiên cứu tương tự trên thế giới, hiệu suất chiết của KET, MDMA cũng tương đương nghiên cứu của Rodrigo Álvarez - Ruiz [3], cao hơn nghiên cứu của Nicola Mastroianni [9]. Hiệu suất chiết của METH khá tương đương nghiên cứu Nicola Mastroianni [5] và nghiên cứu Paula Arbeláez [6]. Đối với AMP hiệu suất chỉ đạt 14,9 %; thấp hơn nghiên cứu Rodrigo Álvarez – Ruiz ( $68 \pm 14$  %) [4] và nghiên cứu của Nicola Mastroianni (41 %) [5] có thể do AMP chảy lỏng và thăng hoa ngay ở điều kiện thường 25 °C.

### 5.2. Phương pháp phân tích

Phương pháp LC-MS/MS hiện nay được ứng dụng phổ biến trên thế giới trong phân tích các mẫu dư lượng trong môi trường do có độ nhạy và độ đặc hiệu cao. Nghiên cứu sử dụng pha tĩnh Acquity BEH C18 (1,7  $\mu$ m; 2,1 x 50 mm) là loại phổ biến, hạt nhồi có kích thước nhỏ, kích thước cột ngắn giúp giảm thời gian phân tích, giảm tốc độ của pha động làm tăng khả năng hình thành các giọt solvat hóa từ đó tăng tín hiệu của mảnh ion mẹ. Trong kỹ thuật ion hóa ESI (+), các chất cung cấp proton (ví dụ: acid formic, acid acetic, amoni format, amoni acetat...) thường được thêm vào pha động để tăng khả năng ion hóa các chất phân tích. Chúng tôi đã khảo sát và lựa chọn được pha động chứa acid formic 0,1 % cho pic cân xứng, đẹp. Như vậy, với thời gian phân tích không quá dài chỉ 15 phút đã bao gồm cả thời gian cân bằng cột, phương pháp đã phân tích được đồng thời 4 chất phân tích AMP, METH, MDMA, KET và 3 nội chuẩn METH - d5, MDMA - d5, KET - d4. Đặc biệt, LOQ của phương pháp không làm theo phương pháp ngoại suy trên mẫu thực mà được xác định bằng thực nghiệm bằng cách thêm chuẩn vào mẫu nền sau đó tiến hành chiết tách và phân tích. So sánh với các nghiên cứu trước đó [3], [5] phương pháp này có LOQ thấp hơn rất phù hợp để xác định dư lượng.

## 6. KẾT LUẬN

Nghiên cứu đã xây dựng được phương pháp xác định dư lượng của 4 chất gây nghiện là AMP, METH, MDMA và KET trong bùn thải bằng phương pháp LC-MS/MS. Kết quả thẩm định cho thấy: phương pháp có LOQ nhỏ (từ 0,1 - 0,5 ppb tùy chất); khoảng tuyến tính rộng (từ 0,125 ppb đến 15 ppb); độ đúng dao động trong khoảng 70,0 đến 114,5 %; độ lặp lại tốt với giá trị RSD % nhỏ (0,68 - 7,25 %); thời gian phân tích phù hợp (15 phút), đáp ứng yêu cầu của phương pháp xác định dư lượng các chất. Phương pháp xây dựng được có thể ứng dụng để phân tích các chất gây nghiện trong bùn thải, phục vụ các nghiên cứu về dịch tễ học từ phân tích nước thải sau này.

## LỜI CẢM ƠN

Nhóm nghiên cứu xin gửi lời cảm ơn sự tài trợ từ Quỹ phát triển Khoa học và Công nghệ Quốc gia NAFOSTED (Đề tài: 105.99-2020.22).

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Hue T. Nguyen, Phong K. Thai, Sarit L. Kaserzon, Jake W.O'Brien, Eaglesham, G. and Mueller, J.F.(2018), Assessment of drugs and personal care products biomarkers in the influent and effluent of two wastewater treatment plants in Ho Chi Minh City, Vietnam, *Science of the Total Environment*, 631-632, pp. 469-475.
2. Tran Thi Thanh Hue, Qiuda Zheng, et al. (2022), Prevalence of illicit drug consumption in a population of Hanoi: an estimation using wastewater-based epidemiology, *Science of the Total Environment*, 815 (2022) pp. 152724.
3. Álvarez-Ruiz R, Andrés-Costa MJ, et al. (2015), Simultaneous determination of traditional and emerging illicit drugs in sediments, sludges and particulate matter, *Journal of Chromatography A*, 1405, pp. 103-115.



4. U.S Environmental Protection Agency (2007), Method 1694: pharmaceuticals and personal care products in water, soil, sediment, and biosolids by HPLC/MS/MS.
5. Mastroianni N, Postigo C, et al. (2013), Illicit and abused drugs in sewage sludge: method optimization and occurrence, *Journal of Chromatography A*, 1322, pp. 29-37.
6. Arbeláez P, Borrull F, et al. (2014), Simultaneous determination of drugs of abuse and their main metabolites using pressurized liquid extraction and liquid chromatography–tandem mass spectrometry, *Talanta*, 125, pp. 65-71.

### SUMMARY

*Locating the 'Golden Triangle' with a long border and  $\frac{3}{4}$  terrain of mountains, the number of seized drugs of Vietnam raised significantly. In the last decade, WBE emerges as an effective tool for providing spatio-temporal variations of drug use among population, especially in areas where surveys are not effective. To use this method, we should analyze the residue of drug and its metabolites in environment. In Vietnam, some studies aimed to analyze illicit drugs in wastewater; however, in the sewage sludge, there are no study have been conducted. In this study, we aimed to develop a method to analyze Amphetamine, Methamphetamine, MDMA and Ketamine in the sewage sludge by SPE extraction before injected to LC-MS/MS. The validation results show that the method had good sensitivity (LOQ from 0.1 - 0.5 ppb); good linear range (from 0.125 ppb to 15 ppb); accuracy ranges from 70.0 to 114.5 %; good repeatability (RSD % values 0.68 - 7.25 %). The developed method can be applied to analyze these illicit drugs in sewage sludge of Vietnam.*

(Ngày nhận bài: 09/3/2023; Ngày phản biện: 27/3/2023; Ngày duyệt đăng: 18/4/2023)

## NGHIÊN CỨU XÂY DỰNG QUY TRÌNH PHÂN LẬP VÀ TÍNH CHẾ TENUIFOLIN TỪ DƯỢC LIỆU VIỄN CHÍ (*RADIX POLYGALAE*) LÀM NGUYÊN LIỆU THIẾT LẬP CHẤT CHUẨN

Nguyễn Thị Thu Hằng<sup>1</sup>, Bạch Thị Thắm<sup>1</sup>, Trần Thị Thu Trang<sup>1</sup>,  
Nguyễn Tuấn Anh<sup>1</sup>, Đoàn Cao Sơn<sup>1</sup>, Nguyễn Lâm Hồng<sup>2,✉</sup>

<sup>1</sup>Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung Ương; <sup>2</sup>Trường Đại học Dược Hà Nội.

**Từ khóa:** *Tenuifolin, Radix polygalae, viễn chí, phân lập, tính chế.*

### 1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Dược liệu Viễn chí (*Radix polygalae*) là rễ phơi hay sấy khô của cây Viễn chí lá nhỏ (*Polygala tenuifolia* Wild.) và cây Viễn chí lá trứng (*Polygala sibirica* L.), họ Viễn chí (Polygalaceae). Từ xưa vị dược liệu này đã được sử dụng để điều trị ho nhiều đờm, viêm phế quản mãn tính, suy nhược thần kinh, mất ngủ... Viễn chí có mặt ở nhiều bài thuốc cổ truyền, được ghi chép trong Dược điển Việt Nam V (Hoàn quy tỷ, Hoàn sâm nhung bổ thận, Hoàn thiên vương bổ tâm).

Thành phần hóa học chính của Viễn chí là các saponin triterpenoid thuộc nhóm olean, trong đó, *tenuifolin* là một trong những thành phần dùng để kiểm soát chất lượng Viễn chí theo Dược điển Trung Quốc 2020 và Dược điển Việt Nam V [1, 2]. Tuy nhiên, hiện nay chưa có sẵn chất chuẩn này để phục vụ kiểm tra chất lượng dược liệu đang

sử dụng và lưu hành trên thị trường. Từ nhu cầu thực tiễn đòi hỏi phải có chất chuẩn *tenuifolin* (TEN) nhằm phục vụ công tác kiểm tra và quản lý chất lượng dược liệu Viễn chí, rất cần thiết có “Nghiên cứu xây dựng quy trình phân lập và tính chế *tenuifolin* từ dược liệu Viễn chí (*Radix polygalae*) sử dụng làm nguyên liệu thiết lập chất chuẩn”.

### 2. THỰC NGHIỆM

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

##### 2.1.1. Thiết bị, dụng cụ

- **Thiết bị:** Máy lắc siêu âm ELMASONIC S100; Máy HPLC/DAD Shimadzu UFLC (Khoa Đông dược - Viện kiểm nghiệm thuốc Trung ương); Máy quang phổ hồng ngoại THERMO (Khoa Vật lý đo lường - Viện kiểm nghiệm thuốc Trung ương); Máy cộng hưởng từ hạt nhân NMR – BRUKER – 600MHZ & 500MHZ (Viện Hoá học

- Viện Hàn lâm khoa học và công nghệ Việt Nam); Máy LC/MS Xevo TQD, Waters (Khoa Mỹ phẩm - Viện kiểm nghiệm thuốc Trung ương) ...

- *Dụng cụ*: Bình định mức, pipet, cột sắc ký...

### 2.1.2. Hóa chất, chất chuẩn

*Tenuifolin* – chất chuẩn của Chengdu, số lô: PRF21040741, hàm lượng: 99,5 %, độ ẩm: 1,7 %. Các dung môi, hóa chất có độ tinh khiết phù hợp dùng cho phân tích hoặc sắc ký HPLC.

## 2.2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

### 2.2.1. Đối tượng nghiên cứu

Dược liệu Viễn chí được mua trên thị trường được kiểm tra sự có mặt của *tenuifolin* và xác định được hàm lượng *tenuifolin* trong nguyên liệu theo tiêu chuẩn Dược điển Việt Nam V (hàm lượng 2,2 % tính trên nguyên trạng).

### 2.2.2. Phương pháp nghiên cứu:

#### 2.2.2.1. Phân lập và tinh chế *tenuifolin*

Tiến hành khảo sát dung môi, kỹ thuật chiết ban đầu và điều kiện thủy phân, sau đó chiết *n*-butanol, để đưa ra quy trình chiết xuất cao Viễn chí chứa *tenuifolin* với hàm lượng cao. Tiếp tục tiến hành phân lập *tenuifolin* từ cao Viễn chí lần lượt trên các cột silica gel pha thuận và pha đảo để loại tạp và thu được *tenuifolin* với độ tinh khiết phù hợp. Sau đó, tiến hành kết tinh trong dung môi phù hợp để nâng cao độ tinh khiết của *tenuifolin* thu được [3, 4].

Trong quá trình chiết xuất, phân lập và tinh chế, tiến hành kiểm tra sự có mặt của *tenuifolin* bằng phương pháp sắc ký lớp mỏng pha thuận (sử dụng bản mỏng silica gel 60 F<sub>254</sub> với hệ dung môi khai triển là hỗn hợp chloroform – methanol - nước tỷ lệ 7:3:1 (tt/tt) hoặc pha đảo (sử dụng bản mỏng silica gel 60 RP-18 GF<sub>254</sub> với hệ dung môi khai triển là hỗn hợp ethanol - nước tỷ lệ 60:40 (tt/tt)). Kiểm tra vết các chất sau quá trình sắc ký bằng dung dịch acid sulfuric 10 % trong ethanol, quan sát dưới ánh sáng thường hoặc ánh sáng tử ngoại ở bước sóng 366 nm [1, 2].

#### 2.2.2.2. Khẳng định cấu trúc *tenuifolin*

So phổ UV, IR, MS, NMR của chất tinh chế và chất chuẩn *tenuifolin* [3].

2.2.2.3. Định tính, định lượng *tenuifolin*: bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao (đã được thẩm định).

a. Điều kiện sắc ký: Quá trình sắc ký được thực hiện trên cột pha đảo Phenomenex Gemini RP-18 (250 × 4,6 mm; 5 μm); sử dụng pha động là hỗn hợp hỗn hợp methanol – dung dịch acid phosphoric 0,05 % tỷ lệ 70:30 (tt/tt); tốc độ dòng 1,0 ml/phút; thể tích tiêm 10 μl; bước sóng phát hiện: 210 nm.

b. Phương pháp chuẩn bị mẫu:

*Dung dịch chuẩn*: Cân chính xác khoảng 10 mg *tenuifolin* (chất chuẩn) vào trong bình định mức 20 ml, thêm khoảng 10 ml methanol, lắc siêu âm 10 phút, để nguội và thêm vừa đủ đến vạch bằng methanol, lắc đều.

*Dung dịch thử*: Cân chính xác khoảng 10 mg mẫu thử vào trong bình định mức 20 ml, thêm khoảng 20 ml methanol, lắc siêu âm 10 phút, để nguội và thêm vừa đủ đến vạch bằng methanol, lắc đều [1, 2].

## 3. KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN

### 3.1. Xây dựng phương pháp phân lập, tinh chế *tenuifolin* từ Viễn chí

Qua tham khảo Dược điển Trung Quốc (CP 2020), Dược điển Việt Nam V và dựa vào tính chất của chất nghiên cứu, tiến hành khảo sát một số điều kiện chiết xuất để lựa chọn được quy trình cho hiệu suất chiết *tenuifolin* cao.

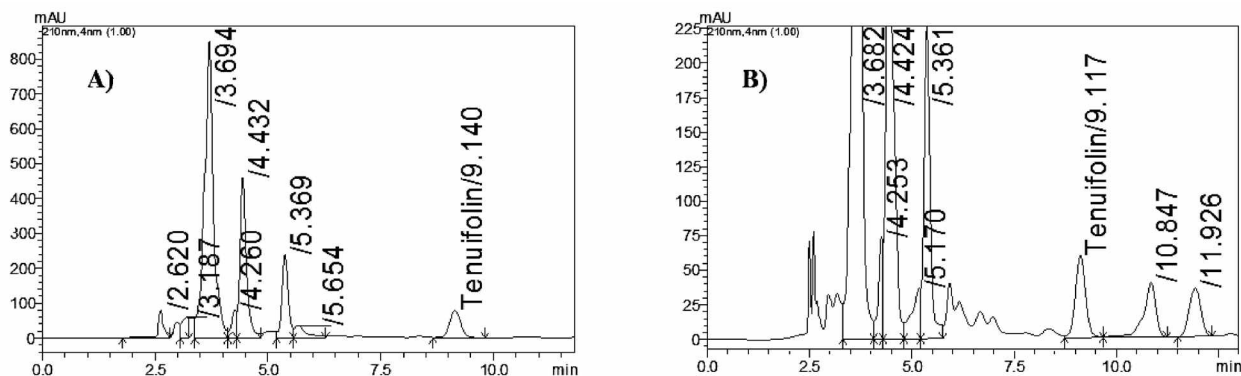
Để lựa chọn dung môi chiết xuất, tiến hành chiết siêu âm với methanol 70 % và ethanol 70 % x 2 lần theo quy trình ở ĐBVN V, kết quả cho thấy hàm lượng *tenuifolin* tính trên nguyên trạng khi chiết với hai dung môi khác nhau không đáng kể (2,1 %). Vì vậy ethanol 70 % được lựa chọn vì ít độc tính hơn để tiếp tục khảo sát kỹ thuật chiết siêu âm và chiết hồi lưu. Từ sắc ký đồ (Hình 2) cho thấy, hàm lượng *tenuifolin* khi chiết hồi lưu giảm đi 40 % so với chiết siêu âm và xuất hiện thêm nhiều tạp chất rửa giải sau *tenuifolin* làm cho quy trình phân lập sẽ khó hơn và hiệu suất phân lập *tenuifolin* sẽ giảm đi. Vì vậy, chiết siêu âm được lựa chọn để tiếp tục nghiên cứu.

Tiếp tục khảo sát điều kiện thủy phân bằng NaOH 5 %, NaOH 10 % và NaOH 15 %, hàm lượng *tenuifolin* khi thủy phân bằng NaOH 10 % chiếm khoảng 160 % so với thủy phân bằng NaOH 5 % và không có sự khác biệt so với khi thủy phân bằng NaOH 15 %. Vì vậy, lựa chọn thủy phân bằng NaOH 10 %, sau đó acid hóa bằng HCl đến pH 4-5 và chiết xuất bằng dung môi chiết chọn lọc saponin là *n*-butanol bão hòa nước, thu dịch chiết *n*-butanol và cô quay chân không thu được 32 g cao Viễn chí.

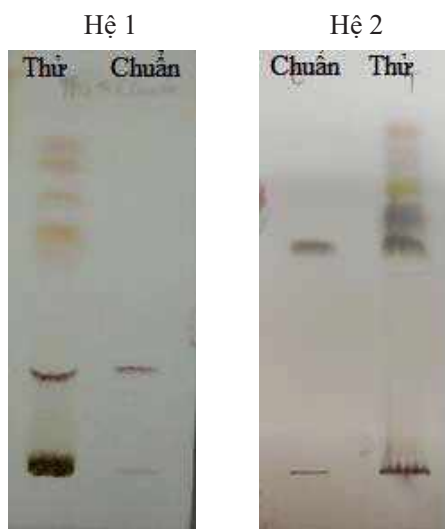
Cao Viễn chí được tiến hành phân lập thô bằng phương pháp sắc ký cột pha thuận nhờ *silica gel* 60, để lựa chọn dung môi pha động, tiến hành khảo sát trên bản mỏng với pha động CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> – MeOH – H<sub>2</sub>O (40:10:1) (Hệ 1) (Hình 3a) và CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> – MeOH – H<sub>2</sub>O (20:10:1) (Hệ 2) (Hình 3b). Sắc ký đồ cho thấy vết *tenuifolin* tách được khá nhiều tạp chất và R<sub>f</sub> của *tenuifolin* khi chạy bằng pha động Hệ 2 cao hơn so với Hệ 1. Vì vậy, quy trình phân lập bước đầu sử dụng Cột 1 (NP1) nhờ *silica gel* 60 kích cỡ hạt lớn (63-200 μm) và rửa giải bằng Hệ 2 để loại thô các tạp chất và chất mang màu. Sau

đó tiếp tục đưa lên cột 2 (NP2) nhờ *silica gel* 60 cỡ hạt nhỏ hơn (40 - 63  $\mu\text{m}$ ) và rửa giải bằng Hệ 1 để rửa giải các chất chậm hơn giúp loại tạp được tốt hơn và thu được các phân đoạn chứa *tenuifolin* sạch hơn. Các phân đoạn chứa *tenuifolin* được chấm đối chiếu với dung dịch

chuẩn *tenuifolin* nồng độ 0,1 mg/ml trong methanol trên sắc ký lớp mỏng với hệ dung môi pha động là  $\text{CHCl}_3 - \text{MeOH} - \text{H}_2\text{O}$  (7:3:1) cô quay chân không, được 3 g căn B (Hàm lượng *tenuifolin* khoảng 60,3 %, **Hình 4a**) nên cần tiếp tục phân lập trên cột pha đảo.



**Hình 2.** Sắc ký đồ khảo sát ảnh hưởng của kỹ thuật chiết (A – Chiết siêu âm; B – Chiết hồi lưu)

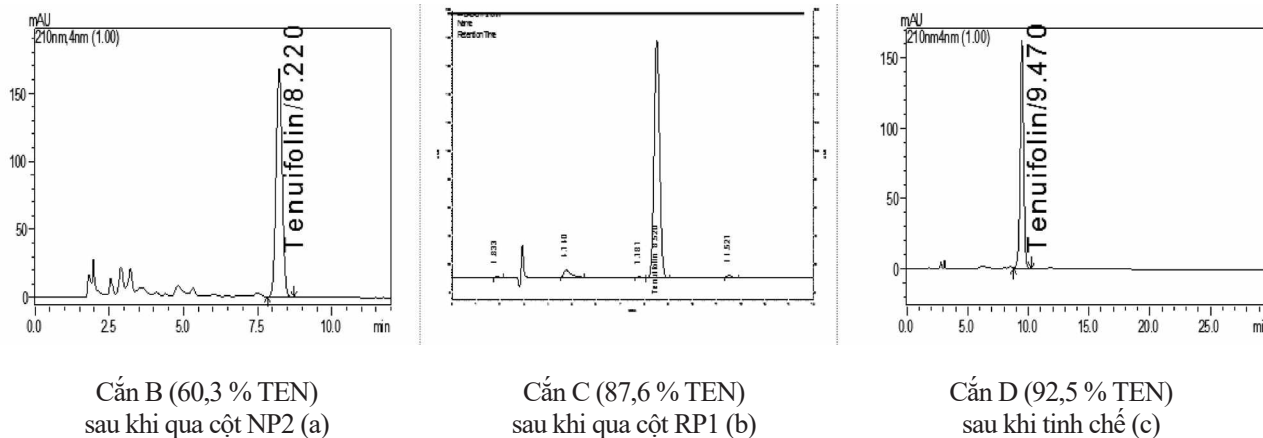


**Hình 3:** TLC khảo sát tỷ lệ dung môi triển khai cột pha thuận tách *tenuifolin* khỏi tạp chất trong mẫu cao chiết *n*-butanol

Lấy 3 g căn B tiếp tục tiến hành phân lập tinh bằng phương pháp sắc ký cột pha đảo với nhờ *silica gel* pha đảo RP-18 (150 mm) (Cột 3 – RP1), rửa giải bằng hệ dung môi là ethanol – nước (50:50). Gộp các phân đoạn chứa *tenuifolin* thu được 1,6 g căn C (**Hình 4b**-độ tinh khiết *tenuifolin* khoảng 87 %). Căn C được kết tinh trong hệ dung môi ethanol – nước thu được 1,3 g căn D với hàm lượng *tenuifolin* khoảng 92 % theo nguyên trạng. Hàm lượng *tenuifolin* trong các mẫu được xác

định bằng HPLC/DAD theo chương trình sắc ký của mục 2 (**Hình 4c**).

Từ kết quả thực nghiệm, quy trình chiết xuất, phân lập, tinh chế cao Viên chí được lựa chọn như sau: Dược liệu được sấy nhẹ ở 60 °C trong 12 h, để nguội, xay thành bột thô, trộn đều. Lấy 500 g dược liệu tiến hành siêu âm 2 lần, mỗi lần 2 lít ethanol 70 % trong 1 h, để nguội, lọc qua giấy lọc. Gộp các dịch lọc đem cô quay chân không ở 60 °C đến dạng cao đặc. Thêm 500 ml dung dịch natri hydroxyd 10 %, đun hồi lưu 4 giờ, để nguội, điều chỉnh đến pH 4-5 bằng acid hydrocloric (TT). Lắc dung dịch trên với *n*-butanol bão hòa 2 lần, mỗi lần 500 ml bằng máy khuấy cơ Heidolph với tốc độ 900 vòng/phút trong 60 phút. Gộp các dịch chiết *n*-butanol và cô quay chân không 60 °C được cao Viên chí. Cao được phân lập trên 2 cột silica gel pha thuận lần lượt qua cột 1 có cỡ hạt 63 – 230  $\mu\text{m}$  với hệ dung môi  $\text{CH}_2\text{Cl}_2 - \text{MeOH} - \text{H}_2\text{O}$  (20:10:1) và cột 2 có cỡ hạt 40 – 63 với hệ dung môi  $\text{CH}_2\text{Cl}_2 - \text{MeOH} - \text{H}_2\text{O}$  (40:10:1). Gộp các phân đoạn chứa *tenuifolin* lại và cô quay chân không để thu được căn B. Căn B tiếp tục được phân lập tinh sắc ký cột nhờ *silica gel* pha đảo RP-18 (150 mm), rửa giải bằng hệ dung môi là ethanol – nước (50:50). Gộp các phân đoạn chứa *tenuifolin*, cô quay chân không thu được căn C. Cuối cùng, kết tinh trong hệ dung môi ethanol–nước thu được nguyên liệu thiết lập chất chuẩn *tenuifolin*.



**Hình 4.** SKĐ xác định hàm lượng (%) tenuifolin trong các cân sau từng giai đoạn phân lập

### 3.2. Khẳng định cấu trúc tenuifolin

Hợp chất thu được dưới dạng bột màu trắng, dễ tan trong methanol, ethanol được tiến hành đo phổ hồng ngoại, kiểm tra phổ khối, phổ UV-VIS và phổ NMR so sánh với chất chuẩn để khẳng định cấu trúc.

Phổ hồng ngoại của hợp chất sau tinh chế tương ứng với phổ hồng ngoại của chất chuẩn *tenuifolin* (hệ số tương đồng 94,65 %) và có các đỉnh đặc trưng tại 1043; 1074; 1712; 2949;  $3413 \pm 2 \text{ cm}^{-1}$ . Trong phần định lượng nguyên liệu tenuifolin sau tinh chế, sắc ký đồ của mẫu thử cho pic chính có thời gian lưu và phổ UV tương ứng với thời gian lưu và phổ UV của pic chính trên sắc ký đồ mẫu chuẩn với  $t_R = 8,29$  phút và hệ số tương đồng phổ là 0,9998.

Trên phổ khối lượng MS của nguyên liệu sau tinh chế xuất hiện pic ion phân tử giả  $[M-H]^-$  tại  $m/z \approx 679,4$ . Kết quả này phù hợp với số khối của ion  $C_{36}H_{55}O_{12}^-$ , qua đó cho phép xác định công thức phân tử của chất tinh chế là  $C_{36}H_{56}O_{12}$ , tương ứng với khối lượng phân tử của *tenuifolin* ( $M = 680,4 \text{ g/mol}$ ).

Ngoài ra, kết quả so sánh phổ  $^1\text{H-NMR}$  và  $^{13}\text{C-NMR}$  cũng cho thấy sự tương đồng về cấu trúc giữa mẫu sau tinh chế và mẫu *tenuifolin* chuẩn. Phổ của hai mẫu chuẩn và thử trùng khít nhau và có các thông số đặc trưng sau:  $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{DMSO-}d_6$ ,  $\delta_H$ , ppm): 4,12 (br s, H-2), 3,93 (d, J 3,5 Hz, H-3), 5,38 (br s, H-12), 1,24 (s, 3H-24), 1,15 (s, 3H-25), 0,63 (s, 3H-26), 0,84 (s, 3H-29), 0,87 (s, 3H-30), 4,19 (d, J 7,5 Hz, H-1').  $^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{DMSO-}d_6$ ,  $\delta_C$ , ppm): 13,2 (C-24), 16,5 (C-25), 18,1 (C-26), 20,1 (C-6), 22,0 (C-15), 22,9 (C-11), 23,4 (C-16), 23,6 (C-30), 30,5 (C-20), 32,3 (C-22), 32,7 (C-7),

33,0 (C-29), 33,5 (C-21), 36,1 (C-10), 40,0 (C-8), 40,8 (C-18), 43,5 (C-1), 44,9 (C-19), 45,4 (C-17), 46,8 (C-14), 48,0 (C-9), 51,2 (C-5), 51,3 (C-4), 61,0 (C-6'), 63,7 (C-27), 68,9 (C-2), 70,0 (C-4'), 73,7 (C-2'), 76,7 (C-3'), 76,8 (C-5'), 83,0 (C-3), 102,8 (C-1'), 125,5 (C-12), 139,4 (C-13), 178,9 (C-28), 179,0 (C-23).

Tất cả các kết quả phân tích trên đều giúp chỉ ra sự tương đồng giữa chất nghiên cứu và *tenuifolin* chuẩn. Như vậy có thể khẳng định rằng hợp chất sau tinh chế chính là *tenuifolin* như mục tiêu của nghiên cứu này.

### 3.3. Xác định hàm lượng tenuifolin trong nguyên liệu thiết lập chất chuẩn

Tiến hành xác định hàm lượng chất tinh chế bằng phương pháp HPLC như mô tả trong Mục 2.2.2.3, ghi sắc ký đồ, thời gian lưu và diện tích pic *tenuifolin* trên sắc ký đồ dung dịch chuẩn và dung dịch thử. Căn cứ vào nồng độ dung dịch chuẩn, tính kết quả hàm lượng *tenuifolin* trong mẫu thử. Kết quả thu được chất tinh chế có hàm lượng *tenuifolin* là 92,5 %, tính theo nguyên trạng (**Hình 4c**). Hiệu suất của quy trình phân lập và tinh chế là 12,1 %.

## 4. KẾT LUẬN

Từ 500 g dược liệu Viễn chí đã phân lập và tinh chế được 1,3 g *tenuifolin* làm nguyên liệu thiết lập chất chuẩn. Nguyên liệu thiết lập chất chuẩn *tenuifolin* đã được khẳng định cấu trúc gồm: bộ dữ liệu phổ NMR, HR-MS, IR, UV-VIS và xác định hàm lượng nguyên trạng của nguyên liệu thiết lập chất chuẩn *tenuifolin* là khoảng 92,5 % bằng cách so sánh với chất chuẩn gốc *tenuifolin*.



## TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Bộ Y tế (2019), Viễn chí (*Radix Polygalae*), *Dược điển Việt Nam V*, Nhà xuất bản Y học, tr. 1369-1370
  2. Chinese Pharmacopoeia Commission (2020), *Radix Polygalae*, Pharmacopoeia of The People's Republic of China, Volume Ia, tr. 371-372.
  3. Trần Hồng Quang (2018), Một số hợp chất triterpenoid saponin và xanthone glucoside từ cây viễn chí Nhật (*Polygala japonica* Houtt.), *Tạp chí Hóa học*, 56(1), tr. 86-93.
  4. Wang JQ, Lu XP (2013), *Preparation method of tenuifolin through extraction from polygala tenuifolia*, Shenzhen xingyin pharmaceutical Co Ltd, Nanjing Xingyin Pharmaceutical group Co Ltd.
- <https://patents.google.com/patent/CN104650173A/en>, tra cứu ngày 20 tháng 02 năm 2023

## SUMMARY

In China and Vietnam, *Radix polygalae* has been widely used as a traditional herbal. With reference to the quality of *Radix polygalae*, its content of tenuifolin quantified by HPLC/DAD is specified to be not less than 2.0 %. For the quality control of *Radix polygalae*, the establishment of tenuifolin as an affordable-price reference standard is prerequisite in Vietnam. In this study, 1.3 g of tenuifolin was isolated and purified from 500 g of *Radix polygalae*. The structure of tenuifolin was confirmed by <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C-NMR, HR-MS, IR, UV-VIS..., as compared to the corresponding spectra of tenuifolin reference standard. The content of tenuifolin in our purified samples was determined to be of 92.5 % by HPLC-DAD analysis.

(Ngày nhận bài: 08/4/2023; Ngày phản biện: 08/4/2023; Ngày duyệt đăng: 12/4/2023)

## XÂY DỰNG PHƯƠNG PHÁP ĐỊNH LƯỢNG ĐỒNG THỜI 2 TẠP CHẤT ĐỊNH DANH TRONG NGUYÊN LIỆU TẠP CHẤT B CỦA TERAZOSIN DÙNG THIẾT LẬP TẠP CHUẨN BẰNG SẮC KÝ LỎNG HIỆU NĂNG CAO

Đỗ Thị Thanh Thủy<sup>1,✉</sup>, Phạm Văn Quang<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Trường Đại học Dược Hà Nội; <sup>2</sup>Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương.

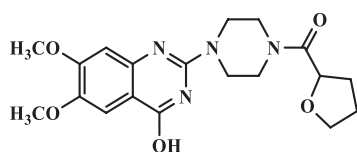
**Từ khóa:** Tạp chất B, tạp định danh, terazosin, định lượng tạp

### 1. ĐẶT VẤN ĐỀ

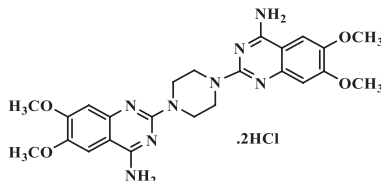
Tạp chuẩn được sử dụng để kiểm tra chỉ tiêu tạp chất liên quan trong các nguyên liệu hoá dược và các thành phẩm thuốc, tuy nhiên số lượng tạp chuẩn được thiết lập tại Việt Nam vẫn còn rất hạn chế gây khó khăn cho công tác kiểm nghiệm. Tạp chất B của terazosin (IBT) là 6,7-dimethoxy-2-(piperazin-1-yl) quinazolin-4-amin dihydroclorid (Hình 1a) đã được nhóm nghiên cứu tổng hợp thành công tại Việt Nam để làm nguồn nguyên liệu thiết lập tạp chuẩn [1].

Để tiến tới thiết lập tạp chuẩn này từ nguồn nguyên liệu tổng hợp được phải đánh giá chất lượng nguyên liệu thiết lập chuẩn trong đó chỉ tiêu độ tinh khiết của nguyên liệu thiết lập chuẩn là 1 tiêu chí quan trọng cần được

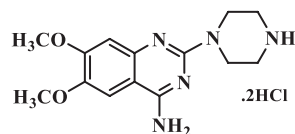
đánh giá. Quá trình tổng hợp nguyên liệu IBT có sử dụng nguyên liệu đầu vào là terazosin ((RS)-6,7-dimethoxy-2-[4-(tetrahydrofuran-2-ylcarbonyl) piperazin-1-yl] quinazolin-4-amin hydroclorid dihydrat, Hình 1b). Ngoài ra, quá trình này cũng sinh ra sản phẩm tạp chất A của terazosin là 6,7-dimethoxy-2-(piperazin-1-yl) quinazolin-4-amin dihydroclorid (Hình 1c) trong sản phẩm tổng hợp. Vì vậy nhóm nghiên cứu tiến hành xây dựng phương pháp định lượng đồng thời hai tạp chất định danh có trong nguyên liệu IBT gồm tạp chất A của terazosin (IAT) và chính terazosin (TEZ) để góp phần xây dựng tiêu chuẩn chất lượng cho nguyên liệu IBT tổng hợp được trước khi tiến hành thiết lập chuẩn cũng như để đánh giá độ ổn định của tạp chuẩn IBT sau khi thiết lập.



1a. IBT



1b. TEZ



1c. IAT

**Hình 1.** Công thức cấu tạo của IBT, TEZ và IAT

## 2. THỰC NGHIỆM

### 2.1. Thiết bị và dụng cụ

Các thiết bị và sử dụng trong nghiên cứu gồm có máy sắc ký lỏng hiệu năng cao SHIMADZU diode array UV-VIS SPD- M20A (Nhật); cân phân tích METTLER TOLEDO XPE26 có độ chính xác 0,001 mg (Thụy Sĩ) và các thiết bị phụ trợ như cột sắc ký Supelco C8 (250 x 4,6 mm, 5  $\mu$ m), máy đo pH Metrohm 780 (Thụy Sĩ), máy lắc siêu âm ELMASONIC S180 H (Đức) và các dụng cụ thủy tinh cần thiết.

### 2.2. Hoá chất, chất chuẩn

#### 2.2.1. Chất chuẩn

Các chất chuẩn sử dụng trong nghiên cứu đều là các chất chuẩn của Hội đồng dược điển Mỹ gồm có tạp chuẩn B (IBT USPRS): lô F0C218, hàm lượng nguyên trạng 100,0 %; tạp chuẩn A (IAT USPRS): lô F0C245, hàm lượng nguyên trạng 90,0 %; chất chuẩn terazosin hydroclorid (TEZ USPRS): lô G0F290, hàm lượng nguyên trạng 91,9 %.

#### 2.2.2. Hóa chất, dung môi

Hóa chất, dung môi sử dụng gồm acetonitril dùng cho HPLC; methanol, acid citric khan, natri citrat dihydrat, triethylamin đạt tiêu chuẩn tinh khiết phân tích.

### 2.3. Mẫu nghiên cứu

Tạp chất B của terazosin (IBT) được tổng hợp tại phòng thí nghiệm Bộ môn Hóa Dược, Khoa Công nghệ Hóa dược, Trường Đại học Dược Hà Nội với mục đích làm nguyên liệu thiết lập tạp chuẩn.

## 2.4. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

#### 2.4.1. Điều kiện sắc ký

Cột sắc ký C8 (250 x 4,6 mm; 5  $\mu$ m), đặt ở: 30 °C. Pha động là hỗn hợp của acetonitril và dung dịch đệm citrat pH 3,2 (16 : 84). Trong đó, dung dịch đệm citrat pH 3,2 được chuẩn bị bằng cách hòa tan 12,0 g natri citrat dihydrat và 28,5 g acid citric khan trong 1,95 lít nước, điều chỉnh tới pH 3,2  $\pm$  0,1 bằng natri citrat hoặc acid citric nếu cần. Pha loãng với nước thành 2,0 lít và lọc qua màng lọc 0,45  $\mu$ m. Tốc độ dòng 1,0 ml/phút. Detector UV 254 nm. Thể tích tiêm mẫu: 20  $\mu$ l.

#### 2.4.2. Các dung dịch tiêm sắc ký

- Dung dịch thử: Hòa tan nguyên liệu IBT trong pha động để thu được dung dịch có nồng độ 500  $\mu$ g/ml.

- Dung dịch chuẩn: Hòa tan các chất chuẩn, tạp chuẩn IBT, IAT và TEZ trong pha động để tạo ra dung dịch chuẩn hỗn hợp có nồng độ mỗi chất chuẩn, tạp chuẩn này là 2,5  $\mu$ g/ml.

- Tính kết quả % tạp IAT và TEZ trong mẫu thử IBT dựa trên các thông số của dung dịch chuẩn tương ứng.

#### 2.4.3. Yêu cầu của hệ thống sắc ký

Yêu cầu về tính thích hợp của hệ thống sắc ký được nhóm nghiên cứu đưa ra để đánh giá hệ thống sắc ký trước mỗi lần phân tích dựa trên kết quả thực tế của phương pháp xây dựng được gồm các điều kiện sau: Giá trị RSD của thời gian lưu và diện tích các pic IAT, IBT và TEZ khi tiêm lặp lại dung dịch chuẩn không lớn hơn 2%; hệ số đối xứng các pic IAT, IBT và TEZ không lớn hơn 2; số đĩa lý thuyết của pic IBT không nhỏ hơn 5000 và sắc ký đồ dung dịch chuẩn phải cho hệ số phân giải giữa pic IAT và TEZ không nhỏ hơn 10, hệ số phân giải giữa pic TEZ và IBT không nhỏ hơn 5.

## 3. KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN

### 3.1. Xây dựng phương pháp

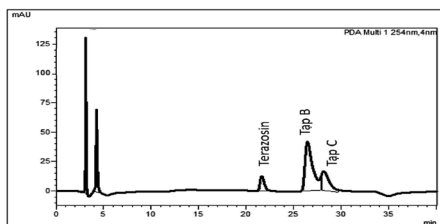
Các tạp chất này đều có nhân thơm và hệ nối đôi liên hợp nên sẽ hấp thụ bức xạ ở vùng tử ngoại, khả kiến. Do đó, detector được lựa chọn là để phân tích là detector DAD với bước sóng phân tích cài đặt ở 254 nm cho tất cả các tạp chất qua tham khảo BP [3] và USP [4]. Đây cũng là bước sóng mà cả 2 dược điển này đều sử dụng để phân tích các tạp chất liên quan của terazosin bằng sắc ký lỏng hiệu năng cao.

Để tách được các tạp chất nghiên cứu, hai pha động được lựa chọn khảo sát gồm hỗn hợp dung dịch đệm citrat pH 3,2 và acetonitril tỷ lệ 84: 16 (pha động 1, tương tự tỷ lệ trong USP [4]); hỗn hợp gồm đệm citrat pH 3,2 - acetonitril - triethylamin tỷ lệ 1650: 350: 2 (pha động 2) [3]. Kết quả cho thấy khi phân tích nguyên liệu IBT trên cả 2 hệ pha động này đều cho kết quả tương đương (cả 3 pic IAT, IBT và ICT đều tách khỏi nhau hoàn toàn), vì vậy lựa chọn pha động 1 là hỗn hợp gồm dung dịch đệm citrat

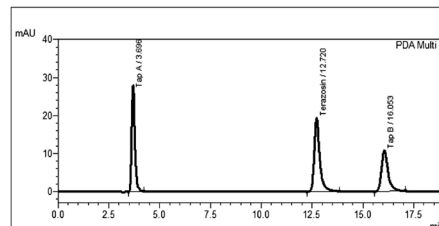
pH 3,2 tỷ lệ 84: 16 vì cách pha đơn giản hơn và không cần sử dụng triethylamin là thành phần có mùi khó chịu khi pha chế lại rất dễ bay hơi nếu thời gian phân tích và khảo sát kéo dài.

Để hòa tan các mẫu phân tích cho quá trình sắc ký, methanol và pha động được lựa chọn để khảo sát vì đây là 2 loại dung môi có khả năng hòa tan tốt cả nguyên liệu IBT và 2 tạp chất IAT, TEZ. Nếu dùng methanol thì ngoài

khả năng hòa tan mẫu tốt còn là dung môi hòa tan chỉ có 1 thành phần sẽ rất thuận tiện cho việc chuẩn bị mẫu. Tuy nhiên, kết quả khảo sát cho thấy khi hòa tan mẫu bằng methanol thì pic IAT bị trùng với pic dung môi còn pic IBT bị dính vào 1 pic tạp khác (Hình 2.a). Trong khi hòa tan mẫu bằng dung môi pha động thì các pic tách khỏi nhau hoàn toàn (Hình 2.b). Do vậy lựa chọn pha động làm dung môi pha mẫu.



2.a). Pha mẫu bằng methanol



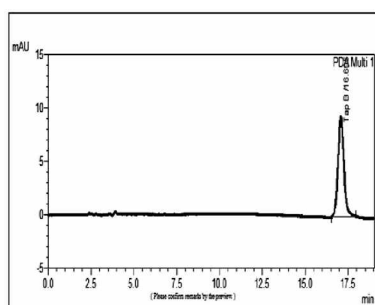
2.b). Pha mẫu bằng pha động

**Hình 2.** Kết quả khảo sát dung môi pha mẫu

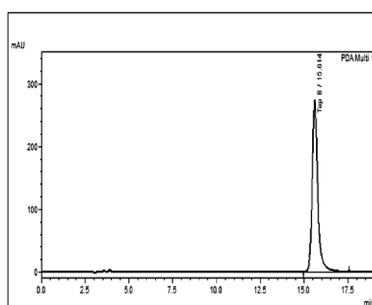
Dựa trên khả năng hòa tan của nguyên liệu IBT trong dung môi pha động, nồng độ IBT trong dung dịch thử được khảo sát ở các mức sau: 2,5 µg/ml (theo USP); 50 µg/ml và 500 µg/ml. Kết quả cho thấy ở nồng độ 2,5 µg/ml chiều cao pic IBT quá thấp chỉ khoảng 9 mAU nên không phù hợp để phân tích tạp chất (Hình 3.a); ở nồng độ 50 µg/ml chiều cao pic IBT khoảng 280 mAU và không xuất hiện pic tạp nào (Hình 3.b); ở nồng độ 500 µg/ml chiều cao pic IBT khoảng 2000 mAU và xuất hiện pic tạp

IAT ở 3,716 phút và pic tạp TEZ ở 13,200 phút (Hình 3.c). Vì vậy lựa chọn nồng độ mẫu thử IBT là 500 µg/ml để phân tích tạp IAT và TEZ trong nguyên liệu IBT.

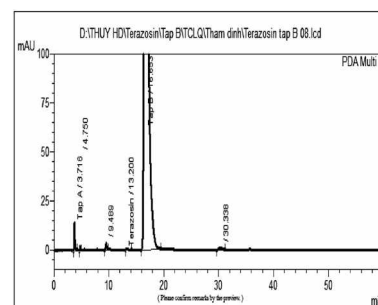
Thời gian chạy sắc ký với mẫu thử được khảo sát ở 3 khoảng thời gian khác nhau là 15 phút, 30 phút và 60 phút. Lựa chọn thời gian chạy sắc ký với mẫu thử là 60 phút để đảm bảo các pic tạp có trong nguyên liệu IBT sẽ được rửa giải ra hết.



3.a). Nồng độ 2,5 µg/ml



3.b). Nồng độ 50 µg/ml



3.c). Nồng độ 500 µg/ml

**Hình 3.** Kết quả khảo sát nồng độ IBT trong mẫu thử phân tích tạp chất

## 3.2. Thẩm định phương pháp

Tiến hành thẩm định phương pháp định lượng các tạp TEZ và IAT trong nguyên liệu IBT với các tiêu chí: tính thích hợp của hệ thống sắc ký, độ đặc hiệu, giới hạn phát hiện, giới hạn định lượng, độ tuyến tính, độ đúng, độ lặp lại và độ chính xác trung gian.

### 3.2.1. Tính thích hợp của hệ thống sắc ký

Tiến hành tiêm sắc kí lặp lại 6 lần dung dịch chuẩn. Kết quả cho thấy RSD của thời gian lưu của các pic đều nhỏ hơn 1,0 %; của diện tích các pic của các chất đều nhỏ hơn 2,0 %; hệ số đối xứng các pic đều nhỏ hơn 2 (dao động từ 1,3 đến 1,4; ); số đĩa lý thuyết của pic IBT lớn hơn 5000; độ

phân giải của IAT và TEZ lớn hơn 10; độ phân giải của IBT và TEZ lớn hơn 5 (Bảng 1). Như vậy phương pháp đạt yêu cầu về tính thích hợp của hệ thống sắc ký

**Bảng 1. Kết quả khảo sát độ thích hợp của hệ thống sắc ký khi định lượng tạp chất trong nguyên liệu IBT**

| TT | Tên chất | Thời gian lưu     |         | Diện tích pic      |         | Hệ số đối xứng | Độ phân giải |
|----|----------|-------------------|---------|--------------------|---------|----------------|--------------|
|    |          | Trung bình (phút) | RSD (%) | Trung bình (mAU.s) | RSD (%) |                |              |
| 1  | IAT      | 3,697             | 0,08    | 310599             | 0,11    | 1,326          | -            |
| 2  | TEZ      | 12,714            | 0,07    | 369170             | 0,07    | 1,499          | 23,620       |
| 3  | IBT      | 16,052            | 0,03    | 249987             | 0,40    | 1,434          | 6,481        |

3.2.2. Độ đặc hiệu

Tiêm các dung dịch sau vào hệ thống sắc ký: Mẫu trắng (pha động), dung dịch chuẩn IBT USPRS 2,560 µg/ml, dung dịch chuẩn IAT USPRS 2,436 µg/ml, dung dịch chuẩn TEZ USPRS 2,711 µg/ml, dung dịch chuẩn hỗn hợp gồm IAT, IBT và TEZ có nồng độ lần lượt là 2,436µg/ml, 2,560 µg/ml và 2,711 µg/ml. Sắc kí đồ của mẫu trắng không xuất hiện pic trong khoảng thời gian lưu tương ứng với thời gian lưu của pic chính. Sắc kí đồ của dung dịch chuẩn hỗn hợp cho các pic IAT, TEZ và IBT tách khỏi nhau hoàn toàn với độ phân giải của IAT và TEZ là 23,620; độ phân giải của TEZ và IBT là 6,418 (Bảng 1).

Tiêm dung dịch thử IBT nồng độ 496,100 µg/ml và các dung dịch thử IBT được phân hủy bằng các tác nhân hóa lý khác nhau như: NaOH 0,5 N trong 4 giờ, HCl 0,5 N trong 4 giờ, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3 % trong 5 giờ, UV trong 24 giờ, nhiệt độ 60 °C trong 4 giờ. Kết quả cho thấy trên sắc kí đồ dung dịch thử xuất hiện 5 pic tạp, trong đó tạp IAT có thời gian lưu 3,716 phút, tạp TEZ có thời gian lưu 13,200 phút. Trên sắc ký đồ của các dung dịch thử phân hủy bởi các tác nhân lý hóa ngoài 5 pic tạp tương tự như dung dịch thử còn xuất hiện thêm các pic tạp khác. Dung dịch thử phân hủy bằng NaOH và HCl đều xuất hiện thêm 1 pic tạp. Dung dịch phân hủy bằng H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> xuất hiện thêm 4 pic tạp. Dung dịch phân hủy bằng UV xuất hiện thêm 3 pic tạp. Dung dịch phân hủy bởi nhiệt độ xuất hiện thêm 5 pic tạp. Tất cả các pic tạp trong từng sắc ký đồ đều tách khỏi các pic IBT, pic dung môi và tách khỏi nhau với hệ số phân giải của 2 pic liền kề đều lớn hơn 1,5. Như vậy, phương pháp phân tích đạt yêu cầu về độ đặc hiệu.

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

Tiêm các dung dịch IAT, TEZ được pha loãng dần, nồng độ thấp nhất mà còn xuất hiện pic sắc ký chính là LOD (tương ứng với tỷ số S/N ≈ 3). Từ giá trị LOD tính ra các giá trị LOQ tương ứng. Kết quả LOD của tạp IAT là 0,079 µg/ml (tỷ số S/N là 3,83); LOQ của tạp IAT là 0,237 µg/ml; LOD của tạp TEZ là 0,042 µg/ml (tỷ số S/N là 3,7); LOQ của tạp TEZ là 0,126 µg/ml.

3.2.4. Độ lặp lại và độ chính xác trung gian của hàm lượng tạp IAT và TEZ trong IBT

Độ lặp lại được xác định bằng cách xác định hàm lượng % tạp IAT và TEZ trong nguyên liệu IBT, tiến hành trên mẫu thử nhưng cân 6 lần cân riêng biệt đem phân tích. Độ chính xác trung gian được tiến hành giống “Độ lặp lại” nhưng khác ngày và khác người phân tích. Kết quả xác định độ lặp lại và độ chính xác trung gian của tạp IAT trong nguyên liệu IBT cho thấy hàm lượng tạp IAT trung bình (n=6) ở 2 ngày khác nhau lần lượt là 0,231 % và 0,224 %, hàm lượng tạp IAT trung bình cả 2 ngày (n = 12) là 0,227 %; các giá trị RSD của hàm lượng tạp chất IAT của từng kiểm nghiệm viên (n = 6) lần lượt là 0,97 % và 1,71% và của 2 kiểm nghiệm viên (n = 12) là 2,22 % đều nhỏ hơn 5,0%.

Kết quả xác định độ lặp lại và độ chính xác trung gian của tạp TEZ trong nguyên liệu IBT cho thấy hàm lượng tạp TEZ trung bình (n=6) ở 2 ngày khác nhau lần lượt là 0,029 % và 0,028 %, hàm lượng tạp TEZ trung bình cả 2 ngày (n = 12) là 0,029 %; các giá trị RSD của hàm lượng tạp chất TEZ của từng kiểm nghiệm viên (n = 6) lần lượt là 4,83 % và 2,58 % và của 2 kiểm nghiệm viên (n = 12) là 4,29 % đều nhỏ hơn 5,0 %.

Vậy phương pháp đã xây dựng là đáp ứng yêu cầu về độ chính xác.

3.2.5. Độ tuyến tính

Tiến hành sắc ký với dãy dung dịch chuẩn IAT và dãy dung dịch chuẩn TEZ có nồng độ biến thiên trong khoảng từ LOQ đến 200 % nồng độ định lượng các tạp này trong nguyên liệu IBT. Kết quả cho thấy trong khoảng nồng độ khảo sát của IAT gồm các mức nồng độ 0,234 µg/ml; 1,218 µg/ml; 1,949 µg/ml; 2,437 µg/ml; 2,924 µg/ml; 3,655 µg/ml và 4,874 µg/ml cũng như trong khoảng nồng độ khảo sát của TEZ gồm các mức nồng độ 0,127 µg/ml; 1,355 µg/ml; 2,168 µg/ml; 2,711 µg/ml; 3,253 µg/ml; 4,066 µg/ml và 5,421 µg/ml đều có mối tương quan tuyến tính chặt chẽ giữa nồng độ và diện tích pic với phương trình hồi quy lần lượt là Y = 129502,2732 x – 5464,2580 và Y = 137627,4901 x + 2035,6697; hệ số tương quan R lần lượt là 0,9998 và 0,9999; % hệ số chắn lần lượt là 1,76 % và 0,55 % đều < 2 %.



### 3.2.6. Độ đúng và khoảng làm việc

Xác định độ đúng của phương pháp bằng cách thêm chính xác một lượng chất chuẩn IAT và chất chuẩn TEZ vào các mẫu thử tương ứng với 5 mức nồng độ LOQ, 50 %, 80 %, 100 % và 120 % so với giới hạn phần trăm tạp chất, mỗi mức nồng độ tiến hành 3 lần. Phân tích mẫu theo qui trình phân tích, tính tỷ lệ % chất chuẩn thu hồi. Kết quả % tìm lại IAT từ 95,91 % đến 103,39 %; % tìm lại TEZ từ 95,98 % đến 104,40 % đều nằm trong khoảng từ 95 % đến 105 %. Vậy phương pháp đáp ứng yêu cầu về độ đúng trong khoảng khảo sát.

Từ kết quả đánh giá độ tuyến tính, độ đúng và độ chính xác của phương pháp, suy ra khoảng làm việc của phương pháp đối với IAT và TEZ lần lượt là 0,2437 µg/ml đến 2,9241 µg/ml và 0,1355 µg/ml đến 3,2527 µg/ml.

### 3.3. Ứng dụng phương pháp đã xây dựng trong việc định lượng nguyên liệu IBT dùng để thiết lập chuẩn

Phương pháp định lượng đồng thời 2 tạp chất IBT và TEZ trong nguyên liệu IBT đã được ứng dụng để định lượng 2 tạp chất này khi kiểm tra chất lượng nguyên liệu thiết lập chuẩn IBT. Kết quả thể hiện ở Bảng 3.

**Bảng 3. Kết quả định lượng tạp IAT và TEZ trong nguyên liệu thiết lập chuẩn IBT**

| TT | m <sub>thử</sub> (mg) | Tạp IAT               |                          |               | Tạp TEZ               |                          |               |
|----|-----------------------|-----------------------|--------------------------|---------------|-----------------------|--------------------------|---------------|
|    |                       | t <sub>R</sub> (phút) | S <sub>pic</sub> (mAu.s) | % tạp (kl/kl) | t <sub>R</sub> (phút) | S <sub>pic</sub> (mAu.s) | % tạp (kl/kl) |
| 1  | 5,068                 | 3,736                 | 139657                   | 0,21          | 13,277                | 19405                    | 0,03          |
| 2  | 5,093                 | 3,749                 | 151534                   | 0,23          | 13,317                | 20597                    | 0,03          |
| 3  | 5,062                 | 3,733                 | 144456                   | 0,22          | 13,247                | 19717                    | 0,03          |
|    |                       | Trung bình            |                          | 0,22          | Trung bình            |                          | 0,03          |

Kết quả cho thấy hàm lượng tạp IAT trong nguyên liệu IBT là 0,22 %; hàm lượng tạp TEZ là 0,03 % đều nhỏ hơn 0,5 %. Như vậy nguyên liệu dùng thiết lập IBT đạt yêu cầu quy định về 2 tạp chất này trong Thường quy kỹ thuật thiết lập tạp chuẩn IBT.

## 4. KẾT LUẬN

Phương pháp HPLC được xây dựng để định lượng

đồng thời tạp chất IAT và TEZ trong nguyên liệu IBT có khả năng ứng dụng ở hầu hết các phòng thí nghiệm có độ đặc hiệu cao, độ lặp lại, độ đúng tốt và có sự tương quan tuyến tính chặt chẽ giữa nồng độ và diện tích pic trong khoảng nồng độ khảo sát; LOQ thấp (LOQ của tạp IAT là 0,237 µg/ml; LOQ của tạp TEZ là 0,126 µg/ml). Phương pháp này góp phần xây dựng chỉ tiêu chất lượng cho nguyên liệu IBT tổng hợp được.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Đỗ Thị Thanh Thủy, Phạm Văn Quang, Nguyễn Hải Nam, Đoàn Cao Sơn (2017), Nghiên cứu tổng hợp tạp chất B của terazosin và bước đầu đánh giá giới hạn tạp chất của sản phẩm, *Tạp chí Dược học*, tập 57, số 500, tr. 40-43.
2. Đỗ Thị Thanh Thủy, Phạm Văn Quang, Nguyễn Hải Nam, Đoàn Cao Sơn (2018), Xây dựng phương pháp định tính, định lượng tạp chất B của terazosin, *Tạp chí Kiểm nghiệm thuốc*, tập 16, số 59, tr.18-23.
3. The British medicines commission (2022), *British pharmacopoeia*, vol. 2, pp. 1092-1094.
4. The United States Pharmacopoeia Convention (2021), *The United States Pharmacopoeia*. ([https://online.uspnf.com/uspnf/document/1\\_GUID-57BE356B-7C6C-4C18-868A-9D9D50A1B65B\\_4\\_en-US](https://online.uspnf.com/uspnf/document/1_GUID-57BE356B-7C6C-4C18-868A-9D9D50A1B65B_4_en-US))

## SUMMARY

A high-performance liquid chromatography (HPLC) method was developed to assay 2 related substances in impurity B of terazosin (IBT) including terazosin (TEZ) and impurity A of terazosin (IAT). The chromatographic analysis was developed on a column (250 x 4.6 mm; 5.0 µm) packed with octylsilyl silica gel for chromatography used as a stationary phase with the column temperature at about 30 °C. A mixture of 16 volumes of acetonitrile and 84 volumes of citrate buffer solution pH 3.2 was used as the mobile phase with a flow rate of 1.0 ml per minute and a detection wavelength of 254 nm. The HPLC method was validated in terms of specificity, linearity, accuracy, precision, limit of detection and limit of quantification. The assay ranges are from about LOQ value to 120 percent of the limit of related substances in IBT material (0.2437 µg/ml to 2.9241 µg/ml with IAT and 0.1355 µg/ml to 3.2527 µg/ml with TEZ). All results proved the method suitable for the intended application.

(Ngày nhận bài: 27/4/2023; Ngày phản biện: 01/6/2023; Ngày duyệt đăng: 05/06/2023)

# XÂY DỰNG PHƯƠNG PHÁP ĐỊNH TÍNH VÀ ĐỊNH LƯỢNG 3,5-DIMETHOXY-4-HYDROXY-1- $\beta$ -GLUCOPYRANOSID TRONG PHẦN GỖ CÂY BÀN TAY MA ĐỎ (*HELICIOPSIS LOBATA*) BẰNG PHƯƠNG PHÁP SẮC KÝ LỎNG HIỆU NĂNG CAO

Bùi Văn Trung<sup>1,2</sup>, Hà Thị Thu Thủy<sup>1</sup>, Dương Hồng Anh<sup>3</sup>, Phạm Hùng Việt<sup>3</sup>✉

<sup>1</sup>Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương; <sup>2</sup>Học Viện Khoa học và Công nghệ - VAST;

<sup>3</sup>Trường đại học Khoa học tự nhiên – ĐHQGHN.

**Từ khóa:** Bàn tay ma đỏ, *Heliciopsis lobata*, 3,5-dimethoxy-4-hydroxy-1- $\beta$ -D-glucopyranoside

## 1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Cây Bàn tay ma đỏ (*Heliciopsis lobata* (Merr.) Sleumer), còn được gọi là cây Dừng, cây Địa chẹn..., được người dân một số tỉnh miền núi phía Bắc sử dụng để điều trị các bệnh thấp khớp, phục hồi sức khỏe cho phụ nữ sau sinh và chữa một số bệnh về gan [1, 2]. Gần đây, phần gỗ của cây Bàn tay ma đỏ được chứng minh là có tác dụng bảo vệ gan *in vivo* trên mô hình chuột nhắt trắng chủng *Swiss albino* [3]. Đồng thời trong các thành phần được phân lập từ phần gỗ của dược liệu này, hợp chất 3,5-dimethoxy-4-hydroxy-1- $\beta$ -D-glucopyranosid có tỷ lệ hàm lượng tương đối lượng tương đối cao, có tác dụng bảo vệ tế bào gan và chống oxy hóa [4]. Do vậy, hợp chất này rất tiềm năng có thể sử dụng làm chất đánh dấu định hướng tác dụng bảo vệ gan cho dược liệu Bàn tay ma đỏ. Nghiên cứu này trình bày việc xây dựng quy trình định tính và định lượng hợp chất 3,5-dimethoxy-4-hydroxy-1- $\beta$ -D-glucopyranosid phục vụ cho công tác tiêu chuẩn hóa và đánh giá chất lượng dược liệu Bàn tay ma đỏ.

## 2. THỰC NGHIỆM

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

Thiết bị sắc ký lỏng hiệu năng cao Shimadzu LC20A (Nhật Bản), cân phân tích Mettler Toledo MS105 (Thụy Sĩ) chính xác tới 0,01 mg; máy lắc siêu âm; các bình định mức, cốc có mỏ, pipet và các dụng cụ thủy tinh có độ chính xác phù hợp.

Chất chuẩn phòng thí nghiệm được thiết lập bởi Khoa Vật lý – Đo lường, Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương, bao gồm: 3,5-dimethoxy-4-hydroxy-1- $\beta$ -D-glucopyranosid, isotachiosid và tachiosid với hàm lượng lần lượt là 96,4 %, 93,5 % và 94,1 % tính theo chế phẩm nguyên trạng.

Các dung môi methanol, ethanol, acetonitril (loại tinh khiết dùng cho sắc ký), acid phosphoric (loại tinh khiết phân tích), và nước deion RO.

### 2.2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

#### 2.2.1. Đối tượng nghiên cứu

Phần gỗ (thân và cành) dược liệu Bàn tay ma đỏ (*Heliciopsis lobata*) được thu hái tháng 12/2021 và giám định thực vật bởi ThS. Nghiêm Đức Trọng, Trường ĐH Dược Hà Nội. Dược liệu sau thu hái được cắt mỏng, phơi khô, nghiền thành bột (hàm ẩm 8,4 %).

#### 2.2.2. Phương pháp nghiên cứu

Quy trình định tính, định lượng được xây dựng bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao pha đảo (RP-HPLC); mẫu phân tích được chuẩn bị bằng các phương pháp chiết loại tạp và làm giàu chất phân tích. Phương pháp được thẩm định theo các hướng dẫn của ICH và AOAC international [5, 6].

## 3. KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN

### 3.1. Xây dựng quy trình định tính và định lượng 3,5-dimethoxy-4-hydroxy-1- $\beta$ -D-glucopyranosid

Quá trình xây dựng phương pháp định tính và định lượng chất nghiên cứu được thực hiện qua các bước: i) Xác định dung môi hòa tan chất nghiên cứu và chiết chất nghiên cứu từ dược liệu; ii) Khảo sát xác định điều kiện sắc ký tối ưu để phân tích các chất nghiên cứu; iii) Khảo sát điều kiện chuẩn bị mẫu dược liệu cho quy trình phân tích. Sau đây là các kết quả khảo sát để xây dựng phương pháp định tính và định lượng 3,5-dimethoxy-4-hydroxy-1- $\beta$ -D-glucopyranosid (viết tắt là HL11) trong dược liệu Bàn tay ma đỏ:

#### 3.1.1. Khảo sát điều kiện hòa tan của 3,5-dimethoxy-4-hydroxy-1- $\beta$ -D-glucopyranosid

Lấy khoảng 5 mg hợp chất HL11 (đã sấy chân không 24 giờ) cho vào các ống nghiệm riêng biệt, thêm 1,0 ml dung môi nghiên cứu (nước, acetonitril, methanol, ethanol, ethanol 50 %, methanol 50 %, acetonitril 50 %), siêu âm 30 phút. Sau 30 phút siêu âm, ống nào HL11 chưa tan lại tiếp

tục bổ sung dung môi để được các thể tích sau khi thêm lần lượt là 2 ml, 5 ml, 10 ml, 20 ml, 50 ml, 100 ml và 200 ml. Sau mỗi lần thêm dung môi, tiến hành siêu âm tiếp 30 phút, và kiểm tra sự hòa tan của hợp chất HL11 trong các ống

th nghiệm sau khi siêu âm. Nhiệt độ của trong quá trình siêu âm luôn được duy trì ở  $25 \pm 5^\circ\text{C}$ . Với mỗi ống nghiệm, quá trình siêu âm được dừng lại khi hợp chất HL11 trong ống nghiệm đó được hòa tan toàn toàn.

**Bảng 1.** Kết quả thử độ tan của hợp chất, 5-dimethoxy-4-hydroxy-1- $\beta$ -D glucopyranosid trong một số dung môi

| Thể tích (ml)    | 2,0 | 5,0 | 10 | 20 | 50 | 100 | 200 |
|------------------|-----|-----|----|----|----|-----|-----|
| Nước             | -   | -   | -  | -  | -  | -   | -   |
| Acetonitril      | -   | -   | -  | -  | +  |     |     |
| Methanol         | -   | -   | -  | +  |    |     |     |
| Ethanol          | -   | -   | -  | -  | -  | -   | -   |
| Ethanol 50 %     | +   |     |    |    |    |     |     |
| Methanol 50 %    | -   | -   | -  | +  |    |     |     |
| Acetonitril 50 % | -   | -   | +  |    |    |     |     |

Trong đó: +) tan hoàn toàn

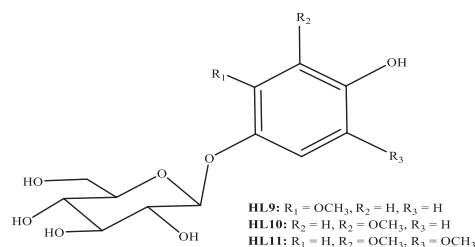
-) chưa tan

Kết quả trong bảng 1 cho thấy, so với các dung môi thông dụng đã thử, hỗn hợp ethanol – nước với tỷ lệ 50 – 50 có khả năng hòa tan chất nghiên cứu tốt nhất. Hỗn hợp dung môi này sẽ được lựa chọn làm dung môi chiết hợp chất HL11 từ mẫu được liệu nghiên cứu, cũng như làm dung môi pha mẫu trong quá trình định lượng.

### 3.1.2. Khảo sát điều kiện sắc ký

Hợp chất HL11 thu được từ pha nước của dịch chiết được liệu Bàn tay ma đỏ là hợp chất khá phân cực, nghiên cứu này lựa chọn hệ sắc ký pha đảo để xây dựng phương pháp định lượng cho hợp chất HL11 trong được liệu Bàn tay ma đỏ. Cột phân tích được lựa chọn để khảo sát ban đầu là cột C18 (250 x 4,6 mm; 5  $\mu\text{m}$ ).

Trong nền mẫu được liệu có nhiều thành phần có thể gây ảnh hưởng cho chất nghiên cứu trong quá trình phân tích định tính và định lượng, vì vậy để đảm bảo hiệu quả phân tích cần phải đánh giá khả năng tách các chất của phương pháp trên cơ sở xác định độ phân giải R giữa hợp chất HL11 với các hợp chất có cấu trúc hóa học tương tự có trong thành phần của dịch cao chiết được liệu. Trong nghiên cứu về phần gỗ cây Bàn tay ma đỏ, ba hợp chất isotachiosid, tachioside và 3,5-dimethoxy-4-hydroxy-1- $\beta$ -D-glucopyranosid (được ký hiệu lần lượt là HL9, HL10 và HL11) được phân lập có cấu trúc hóa học tương tự nhau (Hình 1). Hai hợp chất HL9 và HL10 vừa tan tốt trong methanol, ethanol, cũng tan tốt trong ethanol 50 % và có khả năng sẽ rửa giải hầu như đồng thời với hợp chất HL11. Do đó, các hợp chất HL9 và HL10 được sử dụng để khảo sát nhằm lựa chọn chất đánh giá độ phân giải của hệ sắc ký lỏng hiệu năng cao nhằm tối ưu điều kiện phân tích hợp chất HL11.



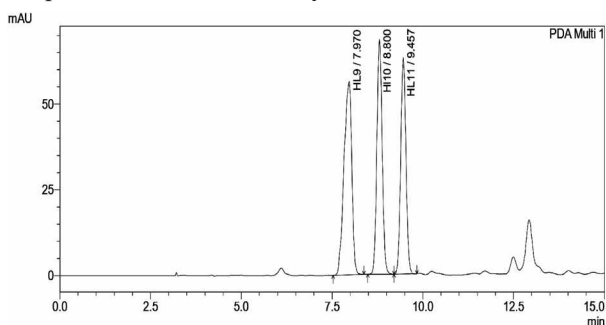
**Hình 1.** Cấu trúc hóa học các chất HL9 (A), HL10 (B) và HL11 (C)

Cả 3 hợp chất HL9, HL10 và HL11 đều có nhân thơm trong cấu trúc nên có khả năng hấp thụ các bức xạ trong vùng ánh sáng tử ngoại và/hoặc khả kiến. Do đó, nghiên cứu này dự kiến sẽ sử dụng detector DAD để phát hiện và phân tích các hợp chất trên. Thật vậy, phổ UV của cả 3 hợp chất trên đo trong khoảng bước sóng tử ngoại từ 190 – 350 nm. Phổ UV của hợp chất HL11 có 2 cực đại tại 201 nm và tại 278 nm và ở khoảng 225 nm phổ có đáng dốc nhẹ. Nếu phân tích chất tinh khiết có thể chọn phân tích ở 201 nm hoặc 225 nm. Tuy nhiên, ở các bước sóng ngắn rất nhiều tạp chất trong nền mẫu được liệu có thể hấp thụ và gây sai số khi phân tích. Bên cạnh đó, khi phân tích đồng thời cùng hai hợp chất HL9 và HL10, các hợp chất này cũng có cực đại hấp thụ ở 282 nm, gần với cực đại hấp thụ 278 nm của hợp chất HL11. Do đó, sử dụng bước sóng 278 nm có thể phân tích được đồng thời cả ba chất trên.

Để giảm khả năng tương tác hút và đẩy giữa các chất khi tồn tại ở dạng ion trong hệ sắc ký, có thể làm ảnh hưởng đến khả năng tách các chất, pha động được sử dụng là hỗn hợp acid phosphoric 0,1 % với dung môi hữu cơ là acetonitril hoặc methanol. Do độ tan của HL11

trong hỗn hợp acetonitril và nước tốt hơn là methanol và nước, nên hệ pha động ưu tiên lựa chọn là hỗn hợp acid phosphoric 0,1 % và acetonitril ở tỷ lệ thích hợp để tránh hiện tượng bão hòa chất trong cột khi tiến hành sắc ký khi tăng nồng độ chất phân tích hoặc thể tích tiêm mẫu.

Nghiên cứu này cũng đã tiến hành khảo sát một số điều kiện pha động của hỗn hợp acetonitril và acid phosphoric 0,1 % để tách hỗn hợp HL9, HL10 và HL11 với cùng nồng độ 0,5 mg/ml, tốc độ dòng 1,0 ml/phút, gồm các điều kiện pha động như sau: Hằng dòng ở tỷ lệ dung môi khác nhau (5 %, 7,5 % và 10 %) và gradient dung môi ở các điều kiện khác nhau. Sau quá trình khảo sát đã lựa chọn được chương trình pha động cho kết quả tách tốt nhất đối với 3 chất cần quan tâm (độ phân giải giữa HL9 và HL10 là 2,85; độ phân giải giữa HL10 và HL11 là 2,35) và thời gian lưu mẫu HL11 là khoảng 9,5 phút. Kết hợp với quá trình khảo sát phân tích mẫu thử, chương trình pha động đã được thiết kế thêm để rửa giải các tạp chất ít phân cực hơn ra khỏi cột sau khi phân tích, kết quả chi tiết được trình bày ở Mục 3.2.



**Hình 2.** Sắc ký đồ mẫu hỗn hợp HL9, HL10 và HL11 ở thể tích tiêm 5  $\mu$ l được phân tích ở bước sóng 278 nm.

Kết quả khảo sát trên cũng cho thấy thứ tự rửa giải của các hợp chất trên lần lượt là HL9, HL10 và HL11 (Hình 2). Điều này cũng hoàn toàn phù hợp với sự tương tự về cấu trúc của 3 hợp chất đang phân tích. Cụ thể là: Hợp chất HL10 có cùng nhóm thế ( $-\text{OCH}_3$  và  $\text{OH}$ ) với hợp chất HL9, nhưng vị trí nhóm thế ( $\text{OCH}_3$ ) của hợp chất HL10 gần với vị trí nhóm thế của hợp chất HL11 hơn. Do đó, muốn tách được hợp chất HL11 khỏi hai hợp chất HL9 và HL10 ở hệ sắc ký lỏng pha đảo chỉ cần tách được hai hợp chất HL11 và HL10 ra khỏi nhau. Như vậy, để đảm bảo hiệu năng của phương pháp định lượng HL11, chất đánh giá độ phân giải chất phân giải được lựa chọn là hợp chất HL10, đồng thời độ phân giải của các pic hai hợp chất HL10 và HL11 tối thiểu phải là 1,5.

Thể tích tiêm mẫu lựa chọn là thể tích thông dụng, đảm bảo độ sai số cho phép và cho khả năng tách tốt nhất. Kết quả đánh giá độ phân giải của ba chất HL9,

HL10 và HL11 khi thay đổi thể tích tiêm từ 5  $\mu$ l lên 10  $\mu$ l cũng cho thấy khi sử dụng thể tích tiêm là 5  $\mu$ l, độ phân giải giữa HL9, HL10 và HL11 lần lượt là 2,85 và 2,35; khi sử dụng thể tích tiêm 10  $\mu$ l, các thông số này thay đổi tương ứng là 1,88 và 1,66. Ở cả hai trường hợp sử dụng thể tích tiêm 5  $\mu$ l lên 10  $\mu$ l các đáp ứng pic đủ lớn. Theo đó, thể tích tiêm mẫu được lựa chọn là 5  $\mu$ l để phân tích.

### 3.1.3. Khảo sát điều kiện chuẩn bị mẫu

Cân chính xác khoảng 2,0 g mẫu bột dược liệu Bàn tay ma đỏ, cho vào 4 bình định mức 20 ml khác nhau, đánh số từ 1 đến 4. Thêm khoảng 15 ml ethanol 50 % vào mỗi bình, tiến hành siêu âm đồng thời các bình với nhiệt độ siêu âm được duy trì ở  $25 \pm 5$   $^{\circ}\text{C}$ . Sau 15 phút, 30 phút, 60 phút và 120 phút lần lượt lấy các bình số 1, 2, 3 và 4 ra khỏi máy siêu âm. Để nguội, bổ sung ethanol 50 % đến vạch, lắc đều, cuối cùng lọc dung dịch mẫu qua màng 0,45  $\mu\text{m}$ . Tiếp theo, tiến hành phân tích sắc ký các mẫu trên theo các điều kiện sắc ký đã tối ưu như ở trên, xác định giá trị tỷ lệ diện tích pic HL11 trên khối lượng mẫu thử (S/m).

Khi các mẫu được pha loãng ở cùng thể tích, tính trên một đơn vị khối lượng, giá trị diện tích pic chất phân tích càng lớn thì lượng chất được chiết xuất vào dung môi càng nhiều. Trong trường hợp này, giá trị S/m sẽ tỷ lệ thuận với lượng chất được chiết xuất ra. Theo kết quả khảo sát, sau thời gian siêu âm 30 phút, giá trị S/m hầu như không thay đổi. Như vậy, sau 30 phút, lượng hợp chất HL11 được giải phóng ra đã gần như hoàn toàn.

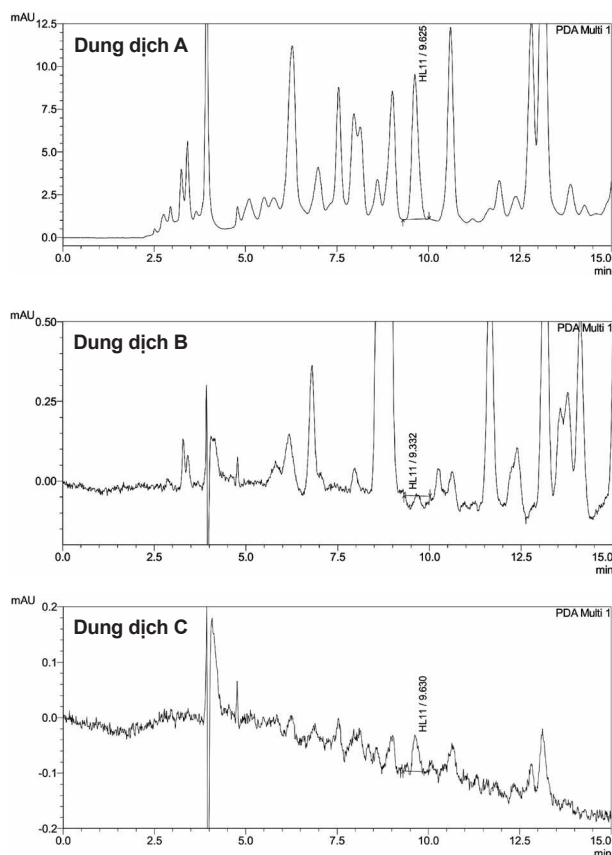
Để loại bớt sai số do lượng dược liệu chiếm chỗ trong quá trình chuẩn bị mẫu, 10 g mẫu dược liệu được cân vào bình nón 200 ml, lần lượt chiết siêu âm 3 lần với 100 ml ethanol 50 %. Gộp dịch chiết 3 lần, cô quay chân không đến khoảng 10 ml. Chuyển dịch sau cô quay vào bình chiết, tráng 2 lần với khoảng 10 ml nước. Tiếp tục chiết 3 lần với đồng thể tích ethyl acetat để loại bớt các tạp ít phân cực. Gộp dịch chiết ethyl acetat, cô quay chân không loại dung môi để thu được cặn ethyl acetat.

Dịch chiết nước được chuyển vào bình cô quay, tráng rửa bằng ethanol 50 % để thu được hết mẫu. Thực hiện cô quay chân không nhằm loại dung môi; sau đó thêm 5 ml ethanol 50 % và siêu âm 15 phút; chuyển dịch sau siêu âm vào bình định mức 25 ml. Lặp lại quá trình trên thêm 2 lần, gộp các dịch sau siêu âm vào bình định mức trên. Dịch tổng sau gộp được siêu âm thêm 15 phút, để nguội, thêm ethanol 50 % vừa đủ thể tích, lắc đều, sau đó lọc qua màng 0,45  $\mu\text{m}$  để thu được dung dịch A.

Cẩn ethyl acetat được tiến hành theo qui trình tương tự như cẩn nước sau khi cô quay loại dung môi, thu được dung dịch B.



Mẫu dược liệu khi chiết 3 lần bằng 100 ml ethanol 50 % được tiếp tục chiết thêm 3 lần nữa với cùng quy trình. Gộp dịch chiết, tiến hành như với dịch chiết ở 3 lần đầu tiên. Phần nước sau khi chiết với ethyl acetat cũng được xử lý như với phần chiết 3 lần đầu, thu được dung dịch C.



**Hình 3.** Sắc ký đồ của các dung dịch A, B và C được phân tích ở bước sóng 278 nm

Tiến hành phân tích sắc ký các dung dịch A, B và C theo điều kiện sắc ký đã được tối ưu. Kết quả như sau (Hình 3): Sắc ký đồ dung dịch A cho pic có thời gian lưu tương ứng với thời gian lưu của pic hợp chất HL11; trong khi đó sắc ký đồ dung dịch B không nhận được pic tại thời gian lưu của pic hợp chất HL11; còn sắc ký đồ của dung dịch C cho pic sắc ký có thời gian lưu tương ứng với thời gian lưu của pic chất pic chất HL11, tuy nhiên tỷ lệ pic này so với pic thu được ở dung dịch A chỉ là 0,7 %. Như vậy, sau 3 lần chiết với ethanol 50 % đã chiết hầu như kiệt HL11 trong mẫu dược liệu (sai số không quá 1 %). Chiết bằng ethyl acetat đã loại bớt tạp ít phân cực trong mẫu HL11 mà không làm ảnh hưởng đến kết quả phân tích của mẫu HL11.

Sau quá trình khảo sát, kết hợp điều kiện sắc ký đã tối ưu với các thông số ảnh hưởng đến quá trình chuẩn bị và làm giàu mẫu như trên, quy trình định tính và

định lượng hợp chất 3,5-dimethoxy-4-hydroxy-1- $\beta$ -D-glucopyranosid trong dược liệu Bàn tay ma đỏ đã được xây dựng và trình bày ở mục 3.2.

### 3.2. Quy trình định tính và định lượng hợp chất 3,5-dimethoxy-4-hydroxy-1- $\beta$ -D-glucopyranosid trong dược liệu Bàn tay ma

**\* Điều kiện sắc ký:** Sử dụng phương pháp sắc ký lỏng theo Phụ lục 5.3 Dược điển Việt Nam V, điều kiện sắc ký sử dụng để định tính và định lượng như sau: Pha tĩnh là cột C18 (250 x 4,6 mm; 5 $\mu$ m), rửa giải bằng chương trình pha động của hai dung môi acid phosphoric 0,1 % và acetonitril với tốc độ dòng 1,0 ml/phút. Trong đó, tỷ lệ acetonitril thay đổi như sau: 0 – 15 phút, tăng từ 5 % lên 15 %; 15 – 20 phút tăng từ 15 % lên 80 %; 20 – 30 phút, ổn định ở 80 %; 30 – 31 phút giảm từ 80 % xuống 5 % và 31 – 35 phút duy trì ở 5 %. Các chất phân tích được tiêm vào hệ sắc ký với thể tích 5  $\mu$ l, được phát hiện và phân tích ở bước sóng 278 nm.

**\* Chuẩn bị mẫu chuẩn:** Dung dịch chuẩn là dung dịch chứa 3,5-dimethoxy-4-hydroxy-1- $\beta$ -D-glucopyranosid trong ethanol 50 % với nồng độ chính xác khoảng 0,075 mg/ml.

**\* Chuẩn bị mẫu phân giải:** Dung dịch đánh giá độ phân giải là dung dịch chứa tachioside và 3,5-dimethoxy-4-hydroxy-1- $\beta$ -D-glucopyranosid với nồng độ chính xác khoảng 0,5 mg/ml.

**\* Chuẩn bị mẫu thử:** Cân chính xác khoảng 10 g bột dược liệu Bàn tay ma đỏ vào bình nón 200 ml, thêm 100 ml ethanol 50 % và siêu âm 30 phút. Gạn dịch chiết, tiếp tục thêm 100 ml ethanol 50 %, lặp lại quá trình trên thêm 2 lần. Gộp dịch chiết 3 lần, cô quay chân không ở 60 °C đến khi còn khoảng 20 ml. Chuyển vào bình chiết, tráng và thêm nước vừa đủ khoảng 50 ml. Chiết 3 lần với ethyl acetat, loại phần ethyl acetat. Phần dịch pha nước được chuyển vào bình cô quay, tráng rửa bằng ethanol 50 %. Cô quay chân không đến cạn, để nguội. Thêm 5 ml ethanol 50 %, siêu âm 15 phút, chuyển dịch sau siêu âm vào bình định mức 25 ml. Lặp lại quá trình thêm 2 lần với cùng thể tích ethanol 50 %. Gộp dịch chiết vào bình định mức 25 ml, siêu âm 15 phút. Để nguội, thêm ethanol 50 % đến vạch, lọc qua màng 0,45  $\mu$ m thu được dung dịch thử.

**\* Đánh giá kết quả:** Độ phân giải của pic tachioside và pic 3,5-dimethoxy-4-hydroxy-1- $\beta$ -D-glucopyranosid không được ít hơn 1,5. Định tính 3,5-dimethoxy-4-hydroxy-1- $\beta$ -D-glucopyranosid thông qua so sánh thời gian lưu của pic hợp chất này trên sắc ký đồ của mẫu thử và mẫu chuẩn. Hàm lượng 3,5-dimethoxy-4-hydroxy-1- $\beta$ -D-glucopyranosid (%), kl/kl trong mẫu dược liệu được tính như sau:

$$HL (\%, \text{kl/kl}) = \frac{C_{\text{chuẩn}} \times 25 \times 100 \times 100}{m_{\text{thử}} \times (100 - L)}$$

Trong đó:  $L$  là độ ẩm của mẫu dược liệu,  $C_{\text{chuẩn}}$  là nồng độ mẫu chuẩn (mg/ml) và  $m_{\text{thử}}$  là khối lượng dược liệu (mg).

### 3.3. Thẩm định quy trình định tính và định lượng 3,5-dimethoxy-4-hydroxy-1- $\beta$ -D-glucopyranosid trong dược liệu Bàn tay ma

Phương pháp định lượng 3,5-dimethoxy-4-hydroxy-1- $\beta$ -D-glucopyranosid trong dược liệu Bàn tay ma đã sẽ được thẩm định theo hướng dẫn của AOAC international, gồm các chỉ tiêu sau: Độ đặc hiệu, độ thích hợp hệ thống, độ tuyến tính, độ đúng, độ lặp lại và giới hạn định lượng.

#### 3.3.1. Độ đặc hiệu

Tiêm vào hệ thống sắc ký mẫu trắng (dung môi pha mẫu, ethanol 50 %), mẫu chuẩn và dung dịch thử (sử dụng dung dịch chuẩn ở nồng độ 0,075 mg/ml ở đánh giá độ tuyến tính, dung dịch thử 1 ở phần đánh giá độ lặp lại). So sánh thời gian lưu của pic HL11 ở các mẫu.

Mẫu chuẩn và mẫu thử xuất hiện pic chính có thời gian lưu lần lượt ở 9,59 và 9,68 phút; mẫu trắng không xuất hiện pic ở thời gian lưu này. Như vậy phương pháp đáp ứng yêu cầu về độ đặc hiệu để định lượng HL11 trong dược liệu Bàn tay ma đồ.

#### 3.3.2. Độ thích hợp hệ thống

Pha dung dịch thích hợp hệ thống chứa các hợp chất HL10 và HL11 với nồng độ khoảng 0,5 mg/ml. Tiêm dung dịch đánh giá độ phân giải và tiêm lặp lại 6 lần dung dịch chuẩn ở phần thử độ lặp lại vào hệ thống sắc ký, xác định độ lặp lại của diện tích pic, thời gian lưu và độ phân giải giữa pic các hợp chất HL10 và HL11.

Kết quả như sau: Độ phân giải giữa các pic hợp chất HL10 và HL11 trên sắc ký đồ của dung dịch thử độ thích hợp hệ thống là 2,271 ( $> 1,5$ ). Độ lặp lại thời gian lưu và diện tích pic của pic hợp chất HL11 trên sắc ký đồ của mẫu chuẩn lần lượt là 0,36 % và 0,65 % ( $< 2,0$  %). Như vậy phương pháp đạt độ thích hợp hệ thống để định lượng HL11 trong mẫu dược liệu Bàn tay ma đồ.

#### 3.3.3. Độ tuyến tính

Hòa tan và pha loãng 10,26 mg chuẩn HL11 trong vừa đủ 20,0 ml bằng ethanol 50 %. Hút và pha loãng dung dịch này để thu được dãy dung dịch chuẩn có nồng độ từ khoảng 5  $\mu\text{g/ml}$  đến 500  $\mu\text{g/ml}$ . Tiến hành sắc ký các dung dịch chuẩn, ghi lại sắc ký đồ và diện tích pic. Thiết lập mối tương quan tuyến tính giữa diện tích pic ( $S$ ) và nồng độ chất phân tích ( $C$ ) trong mẫu.

Kết quả thu được phương trình hồi quy là  $S (\text{mAU.S}) = 1348x + 1280,8$ ; hệ số tương quan tuyến tính ( $R$ )

giữa diện tích pic và nồng độ chất phân tích là 0,99995 ( $> 0,998$ ). Đánh giá thống kê sự tuyến tính của phương pháp, kết quả cho hệ số chặn  $b$  (1280,8) khác 0 không có ý nghĩa thống kê. Do đó phương pháp đã xây dựng đạt yêu cầu về độ tuyến tính, công thức tính toán kết quả đã thiết kế là phù hợp.

#### 3.3.4. Độ lặp lại và độ chính xác trung gian của phương pháp

Chuẩn bị mẫu thử theo quy trình phân tích, tiến hành 2 ngày, mỗi ngày 6 thử, xác định hàm lượng hợp chất HL11 trong mẫu dược liệu (Dược liệu Bàn tay ma đồ có độ ẩm 8,4 %). Kết quả thu được hàm lượng HL11 trong mẫu dược liệu Bàn tay ma đồ xác định bởi kiểm nghiệm viên 1 là 0,0202 % (kl/kl) với độ lệch chuẩn tương đối RSD ( $n=6$ ) là 3,1 % ( $< 3,7$  %), đáp ứng yêu cầu về độ lặp lại của phương pháp [6].

Ở ngày nghiên cứu tiếp theo, hàm lượng hợp chất HL11 trong dược liệu Bàn tay ma đồ xác định bởi kiểm nghiệm viên 2 là 0,0198 % (kl/kl), RSD ( $n = 6$ ) là 3,3 %. Từ các kết quả phân tích của hai ngày và hai kiểm nghiệm viên, tính được giá trị hàm lượng hợp chất HL11 trung bình trên 12 mẫu thử là 0,0200 % (kl/kl), với độ lệch chuẩn tương đối RSD ( $n = 12$ ) là 3,2 % ( $< 6$  %), đáp ứng yêu cầu về độ chính xác trung gian của phương pháp [6].

#### 3.3.5. Độ đúng và khoảng làm việc

Độ đúng của phương pháp đánh giá thông qua độ thu hồi của phương pháp đối với các mẫu thử độ đúng được chuẩn bị bằng cách thêm chuẩn vào nền mẫu thử để thu được dung dịch thử độ đúng có nồng độ HL11 ở nồng độ 0,0375 mg/ml; 0,075 mg/ml và 0,150 mg/ml.

Các mẫu đánh giá độ đúng được chuẩn bị như sau: Cân 10,24 mg chuẩn HL11, hòa tan và pha loãng vừa đủ trong 20,0 ml ethanol 50 % để thu được dung dịch chuẩn gốc. Tiếp theo, lần lượt hút chính xác 1,0 ml, 2,0 ml và 4,0 ml dung dịch chuẩn gốc vào các bình nón có chứa sẵn tương ứng 2,5 g, 5,0 g và 10,0 g mẫu thử. Tiến hành chuẩn bị mẫu như với mẫu thử và phân tích sắc ký theo quy trình phân tích, ở mỗi mức nồng độ chuẩn bị song song 03 thử độ đúng.

Lấy hàm lượng HL11 trong mẫu thử là 0,0202 % tính theo chế phẩm khan, như kết quả ở phần thử độ lặp lại, áp dụng công thức tính kết quả định lượng theo quy trình phân tích đã xây dựng, thu được kết quả như sau: ở mức nồng độ 0,0375 mg/ml, độ thu hồi trung bình ( $n = 3$ ) là 97,1 % (RSD = 1,8 %); ở mức nồng độ 0,075 mg/ml, độ thu hồi là ( $n = 3$ ) 97,6 % (RSD = 1,2 %) và ở mức nồng độ 0,150 mg/ml, độ thu hồi là ( $n = 3$ ) 97,9 % (RSD = 2,7 %). Theo yêu cầu của AOAC international, với các mẫu có hàm lượng từ 0,01 % đến 0,1 % (khoảng chứa nồng

độ các mẫu dung dịch thử độ đúng), độ thu hồi mẫu trung bình phải đạt từ 95 % đến 105 %. Tại 3 hàm lượng thử, kết quả phân tích cho độ thu hồi từ đạt từ 97,1 % đến 97,9 %. Như vậy phương pháp định lượng đã xây dựng có độ đúng đạt yêu cầu.

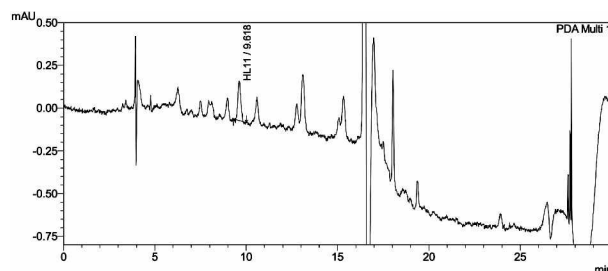
Phương pháp đã xây dựng có độ tuyến tính từ 0,005 mg/ml đến 0,5 mg/ml; độ đúng đáp ứng yêu cầu từ 0,0375 mg/ml đến 0,15 mg/ml. Như vậy khoảng làm việc của phương pháp đã xây dựng là từ 0,0375 mg/ml đến 0,15 mg/ml.

### 3.3.6. Xác định giới hạn định lượng của phương pháp

Pha loãng dẫn dung dịch chuẩn được chuẩn bị ở phần đánh giá độ tuyến tính của phương pháp và tiêm vào hệ thống sắc ký. Đến nồng độ 0,2  $\mu$ /ml thì thu được pic hợp chất HL11 có đáp ứng pic gấp khoảng 3 lần độ nhiễu đường nền. Pha loãng gấp đôi dung dịch trên, tiêm vào hệ thống sắc ký, hầu như không xuất hiện đáp ứng pic trên sắc ký đồ. Do đó, giới hạn phát hiện (LOD) của phương pháp đối với dung dịch chuẩn ở khoảng 0,2  $\mu$ /ml. Giới hạn định lượng (LOQ) của dung dịch chuẩn sẽ ở khoảng gấp 3,3 lần giới hạn phát hiện của dung dịch chuẩn, tương ứng với nồng độ 0,66  $\mu$ /ml.

Pha loãng dung dịch chuẩn ở phần đánh giá độ tuyến tính của phương pháp để thu được dung dịch có nồng độ HL11 khoảng 0,66  $\mu$ /ml, thu được dung dịch LOQ<sub>chuẩn</sub>. Hút đồng lượng dung dịch chuẩn và thử, pha loãng đến nồng độ HL11 khoảng 0,66  $\mu$ /ml, thu được dung dịch LOQ<sub>spike</sub>. Tiến hành tiêm các dung dịch trên vào hệ thống sắc ký, tiêm lặp lại 06 lần dung dịch LOQ<sub>spike</sub>.

Kết quả thu được như sau: Pic HL11 xuất hiện rõ ràng trên sắc ký đồ; RSD (n = 6) diện tích pic HL11 trên sắc ký đồ dung dịch LOQ<sub>spike</sub> là 3,8 (nhỏ hơn 7,3 % theo yêu cầu của AOAC). Như vậy, phương pháp đã xây dựng có giới hạn định lượng là khoảng 0,66  $\mu$ /ml đối với hợp chất HL11 trong dược liệu Bàn tay ma đỏ.



**Hình 4.** Kết quả xác định giới hạn định lượng của phương pháp

## 4. KẾT LUẬN

Nghiên cứu đã xây dựng được phương pháp định tính và định lượng hợp chất 3,5-dimethoxy-4-hydroxy-1- $\beta$ -D-glucopyranosid trong dược liệu Bàn tay ma đỏ bằng phương pháp HPLC detector DAD đáp ứng các yêu cầu hiện hành. Phương pháp định lượng có khoảng làm việc từ 0,0375 mg/ml đến 0,150 mg/ml; giới hạn định lượng của phương pháp là 0,66  $\mu$ /ml. Phương pháp định tính đã xây dựng đáp ứng được yêu cầu về độ đặc hiệu; phương pháp định lượng đáp ứng được các yêu cầu về độ đặc hiệu, độ thích hợp hệ thống, độ tuyến tính, độ lặp lại, độ chính xác trung gian và độ đúng theo các yêu cầu của ICH và AOAC international.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Viện Dược liệu (2016), *Địa chun, Danh lục cây thuốc Việt Nam*, Hà Nội, Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật, tr. 360.
2. Đỗ Huy Bích và cộng sự (2011), *Đừng, Cây thuốc và động vật làm thuốc ở Việt Nam*, Hà Nội, Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật, tập 3, tr. 125-126.
3. Bui Van Trung, Nguyen Thu Hang, Duong Hong Anh, Pham Hung Viet (2022), Evaluation of the Hepatoprotective Activity of the Wood of *Heliciopsis lobata* (Merr.) Sleumer, *VNU Journal of Science: Medical and Pharmaceutical Sciences*, 38(4), tr. 86-95,
4. B. V. Trung, và cộng sự (2020), Antioxidant and Hepatoprotective Activity of Phenyl Glycosides Isolated From *Heliciopsis lobata*, *Natural Product Communications*, 15(8), 10.1177/1934578X20946255.
5. European Medicines Agency (1996), *Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2(R1)*.
6. AOAC International (2016), *Guidelines for Standard Method Performance Requirements*. Appendix F.

## SUMMARY

The compound 3,5-dimethoxy-4-hydroxy-1- $\beta$ -D-glucopyranoside was a biological active compound being representative for the hepatoprotective activity of *Heliciopsis lobata* plant. In this study, an analytical method was successfully developed and validated for qualitative and quantitative determination of 3,5-dimethoxy-4-hydroxy-1- $\beta$ -D-glucopyranoside in the wood of *Heliciopsis lobata* based on RP-HPLC couple with DAD detector using a separation column C18 (250 x 4.6 mm, 5  $\mu$ m) and a mobile phase as mixture of phosphoric acid 0.1 % and acetonitril at different ratios; the flow rate was maintained at 1.0 ml/min., and the chosen wavelength of DAD detector was at 272 nm. The performance of the developed HPLC analysis

was controlled by evaluating the resolution between tachioside compound and the main analyte. This procedure could be applied suitable for quantitation of 3,5-dimethoxy-4-hydroxy-1- $\beta$ -D-glucopyranoside with LOQ value of 0.66  $\mu\text{g/ml}$  and fully met all the requirements (specificity, linearity, precision, repeatability, and accuracy) according to ICH and AOAC guidelines.

(Ngày nhận bài: 05/5/2023; Ngày phản biện: 31/5/2023; Ngày duyệt đăng: 05/6/2023)

## XÂY DỰNG PHƯƠNG PHÁP XÁC ĐỊNH ĐỒNG THỜI 4 CHẤT 14,15 $\beta$ -DIHYDROXYKLAINEANONE, SCOPOLETIN, EURYCOMALACTON VÀ 9-METHOXYCANTHIN-6-ONE TRONG CÂY BÁ BỆNH (*RADIX EURYCOMAE LONGGIFOLIAE*) BẰNG PHƯƠNG PHÁP SẮC KÝ LỎNG HIỆU NĂNG CAO

Đỗ Thị Ngọc Lan<sup>1,2</sup>, Nguyễn Thị Hằng<sup>1</sup>, Nguyễn Tiến Đạt<sup>3</sup>, Lê Quang Thảo<sup>1,4</sup>✉

<sup>1</sup>Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương; <sup>2</sup>Cục Quản lý Dược - Bộ Y tế  
<sup>3</sup>Trung tâm Nghiên cứu và Chuyển giao công nghệ - VAST; <sup>4</sup>Trường Đại học Y Dược - ĐHQGHN.

**Từ khóa:** Bá Bệnh, *Eurycoma longifolia*, 9-methoxycanthin-6-one, 14,15 $\beta$ -Dihydroxyklaineaneone, Scopoletin, Eurycomalacton

### 1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Cây Bá bệnh (mật nhân, bách bệnh) có tên khoa học là *Eurycoma longifolia* Jack, họ Thanh thất (Simaroubaceae) là một loại thảo dược truyền thống được sử dụng phổ biến và cũng là một trong những loại thảo dược được sử dụng trong các bài thuốc Y học cổ truyền nổi tiếng được dùng để cải thiện sức khỏe nam khoa cũng như bệnh sốt rét ở châu Á [1]. Theo tìm hiểu của nhóm nghiên cứu, đã có tới gần 100 hợp chất được phân lập từ cây Bá bệnh, trong đó nhiều hợp chất đã được chứng minh là có hoạt tính sinh học tốt như kháng khuẩn, kháng nấm, chống ký sinh trùng, kháng một số dòng tế bào ung thư, kháng viêm, chống oxy hóa, giảm tiểu đường, tăng cường khả năng sinh dục...[2-6].

Gần đây nhất, nhóm nghiên cứu của tác giả Jiranam Chaingam, đại học Khon Kaen Thái Lan đã xây dựng phương pháp định lượng đồng thời 4 hợp chất thuộc nhóm quassinoid, scopoletin và 3 hợp chất alkaloid khung canthin-6-one [6]. Tuy nhiên, hợp chất 14,15 $\beta$ -dihydroxyklaineaneone có hoạt tính tốt nhưng không nằm trong nhóm 8 hợp chất được các tác giả này đưa vào phương pháp định lượng.

Để góp phần phục vụ cho việc kiểm soát chất lượng dược liệu Bá bệnh và các sản phẩm chứa dược liệu Bá bệnh, nghiên cứu này trình bày quy trình định tính, định lượng đồng thời 4 hợp chất có hoạt tính của dược liệu Bá bệnh trồng tại Việt Nam, gồm 14,15 $\beta$ -dihydroxyklaineaneone

(EL1), scopoletin (EL2), eurycomalacton (EL3) và 9-methoxycanthin-6-one (EL4).

### 2. THỰC NGHIỆM

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

Thiết bị sắc ký lỏng hiệu năng cao Waters, cân phân tích Mettler Toledo MS105 chính xác tới 0,01 mg được hiệu chuẩn theo qui định ISO/IEC 17025 và GLP; máy lắc siêu âm; máy cô quay; các bình định mức, pipet, và các dụng cụ thủy tinh có độ chính xác phù hợp.

Chất chuẩn phòng thí nghiệm được thiết lập bởi Khoa Nghiên cứu Phát triển, Viện Kiểm nghiệm Thuốc Trung ương, bao gồm: 9-methoxycanthin-6-one, 14,15 $\beta$ -dihydroxyklaineaneone, scopoletin và eurycomalacton với hàm lượng lần lượt là 99,2 %, 98,7 %, 98,6 % và 98,5 % tính theo chế phẩm nguyên trạng.

Các dung môi methanol, acetonitril (loại tinh khiết dùng cho sắc ký), acid phosphoric, diclomethan, ethanol (loại tinh khiết phân tích), và nước deion RO.

#### 2.2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

##### 2.2.1. Đối tượng nghiên cứu

Dược liệu Bá bệnh (*Radix eurycomae longifoliae*) được thu hái tại hai thời điểm tháng 05/2022 và tháng 06/2022 tại các địa điểm Đắk R'Măng, Đắk G'Lang, Đắk Lắk; Khu BTTB-VH Đồng Nai, Phú Lý, Vĩnh Cửu, Đồng Nai; VQGTD, Hợp Châu, Tam Đảo, Vĩnh Phúc; Lục Sơn, Lục



Nam, Bắc Giang; Bắc Lãng, Đình Lập, Lạng Sơn; Khu bảo tồn thiên nhiên Tây Yên Tử, Sơn Động, Bắc Giang được ký hiệu lần lượt là M1, M2, M3, M4, M5 và M6. Dược liệu sau thu hái được định danh, cắt mỏng, phơi khô, nghiền thành bột. Mẫu M6 dùng cho khảo sát và thẩm định phương pháp.

2.2.2. Phương pháp nghiên cứu

Quy trình định tính, định lượng được xây dựng bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao pha đảo (RP-HPLC). Phương pháp được thẩm định theo các hướng dẫn của AOAC international [7] gồm các chỉ tiêu: Độ đặc hiệu, độ thích hợp hệ thống, độ tuyến tính, độ đúng, độ lặp lại và giới hạn định lượng. Các mẫu dược liệu được xác định hàm ẩm, sau đó xác định hàm lượng các chất nghiên cứu dưới dạng chế phẩm đã khô kiệt.

3. KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN

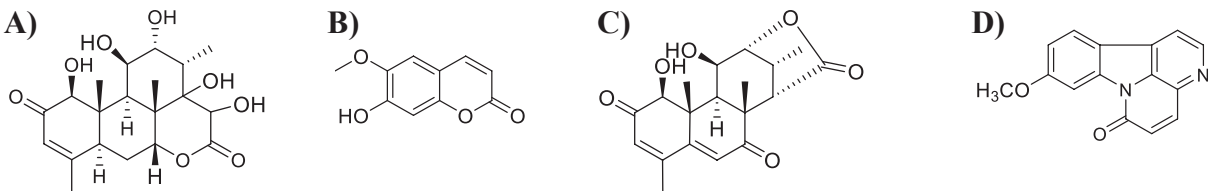
3.1. Xây dựng quy trình định tính và định lượng đồng thời 4 chất EL1, EL2, EL3 và EL4.

Quá trình xây dựng phương pháp định tính và định lượng 4 chất nghiên cứu được thực hiện qua các bước: i) Khảo sát lựa chọn điều kiện sắc ký phù hợp; ii) Khảo sát quy trình chuẩn bị mẫu.

3.1.1. Khảo sát điều kiện sắc ký

Các hợp chất EL1, EL2, EL3, EL4 không quá phân cực, vì vậy nghiên cứu lựa chọn hệ sắc ký pha đảo để xây dựng phương pháp xác định đồng thời. Cột phân tích được lựa chọn để khảo sát ban đầu là cột C18 (250 x 4,6 mm; 5 μm). Cả 4 hợp chất trên đều có nối đôi liên hợp trong cấu trúc nên có khả năng hấp thụ cao các bức xạ trong vùng ánh sáng tử ngoại và/hoặc khả kiến. Do đó, nghiên cứu dự kiến sẽ sử dụng detector DAD để phát hiện và phân tích các hợp chất trên.

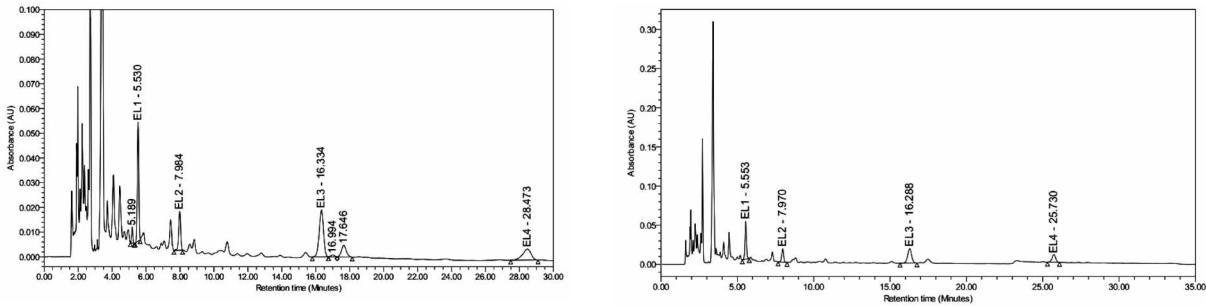
Qua nghiên cứu tài liệu, sơ bộ nhóm nghiên cứu dự kiến sử dụng pha động là hỗn hợp acid phosphoric 0,1 % với dung môi hữu cơ là acetonitril hoặc methanol. Khảo sát trên thực tế trên một số cột C18; tốc độ dòng 1,0 ml/phút; thể tích tiêm 10 μl; trên các mẫu: mẫu chuẩn hỗn hợp 4 chất, dịch chiết dược liệu với ethanol 50 %; điều kiện pha động khảo sát như sau: đẳng dòng ở tỷ lệ dung môi khác nhau (30 %, 25 % và 20 %) và gradient dung môi ở các điều kiện khác nhau. Quá trình khảo sát đã lựa chọn được chương trình gradient pha động phù hợp cho 4 chất cần phân tích.



Hình 1. Cấu trúc hóa học các chất EL1 (A), EL2 (B), EL3 (C) và EL4 (D)

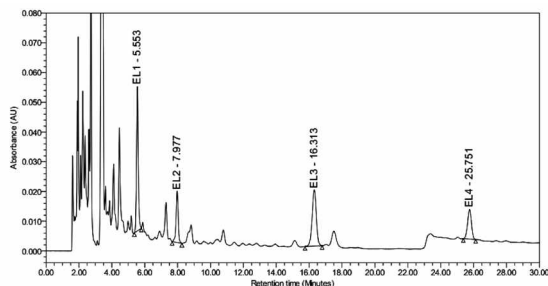
Bảng 1. Kết quả phân tích mẫu chiết dược liệu ở chương trình gradient

| STT | Tên | Thời gian lưu (Phút) | Số đĩa lý thuyết | Hệ số đối xứng | Độ phân giải |
|-----|-----|----------------------|------------------|----------------|--------------|
| 1   | EL1 | 5,556                | 14964            | 0,97           |              |
| 2   | EL2 | 7,977                | 20694            | 0,91           | 12,3         |
| 3   | EL3 | 16,298               | 19535            | 0,95           | 24,6         |
| 4   | EL4 | 25,731               | 55914            | 0,97           | 21,3         |



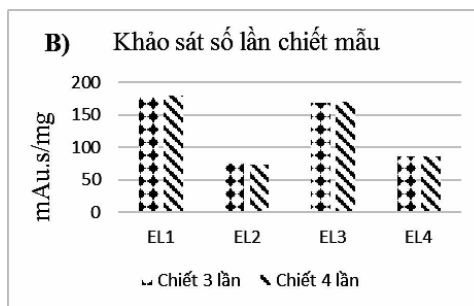
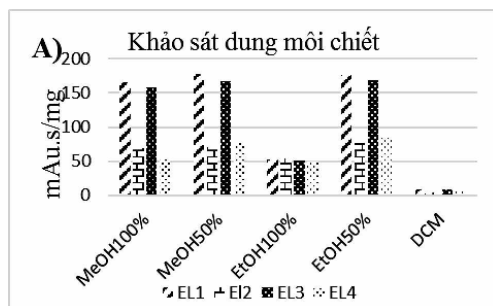
Hình 2. Sắc ký đồ mẫu chiết dược liệu ở chương trình 25 % ACN (trái) và chương trình gradient (phải)

Quét phổ UV-Vis của cả 4 hợp chất trên trong khoảng bước sóng từ 190 – 400 nm để xác định các bước sóng cực đại. Sau khảo sát chọn bước sóng định lượng tại 260 nm (là bước sóng trung gian giữa cực đại của 4 chất) do đáp ứng của cả 4 chất trong mẫu chiết từ dược liệu tương đối tốt, các pic có chiều cao đồng đều và ít bị ảnh hưởng bởi nhiễu nền mẫu.



**Hình 3.** Sắc ký đồ mẫu thử ở bước sóng 260 nm.

Như vậy, sau quá trình khảo sát, điều kiện sắc ký được lựa chọn để định lượng đồng thời 4 hợp chất trên như sau: 10 µl mẫu phân tích được tiêm vào hệ sắc ký pha đảo với cột C18 (250 x 4,6 mm; 5µm) rửa giải bằng hệ dung môi acid H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 0,1 % và acetonitril với chương trình dung môi từ 0 đến 19 phút đẳng dòng 25 % acetonitril, sau đó chạy gradient để tăng tỷ lệ acetonitril lên 30 % trong 11 phút tiếp theo và cuối cùng đưa hệ về trạng thái ban đầu ở 25 % acetonitril để phân tích mẫu tiếp theo. Trong suốt quá trình, tốc độ dòng được duy trì ở 1,0 ml/phút, pic các chất được phát hiện ở 260 nm.



**Hình 4.** Giá trị S/m của các chất trong khảo sát dung môi chiết (A) và số lần chiết (B)

\* **Chuẩn bị mẫu thử:** Cân chính xác khoảng 2 g bột dược liệu Bá bệnh vào bình nón 100 ml, thêm 50 ml ethanol 50 % và siêu âm 30 phút. Gạn dịch chiết, tiếp tục thêm 50 ml ethanol 50 %, lặp lại quá trình trên thêm 2 lần. Gộp dịch chiết 3 lần, cô quay chân không đến cạn. Chuyển vào bình định mức 25 ml bằng ethanol 50 %, lọc qua màng 0,45 µm thu được dung dịch thử.

\* **Chuẩn bị dung dịch chuẩn:** Chuẩn bị các dung dịch chuẩn gốc EL1, EL2, EL3, EL4 trong methanol có nồng độ lần lượt khoảng 500 µg/ml, 375 µg/ml, 500 µg/ml và 125 µg/ml. Hút lần lượt 1,5 ml dung dịch chuẩn gốc EL1; 1,0 ml EL2; 2,0 ml EL3 và 1,2 ml EL4 vào bình định mức

### 3.1.2. Khảo sát qui trình chuẩn bị mẫu

Để khảo sát dung môi chiết, nhóm nghiên cứu tiến hành như sau: Cân chính xác khoảng mỗi 2,0 g mẫu bột dược liệu Bá bệnh, cho vào 5 bình nón 100 ml khác nhau, đánh số từ 1 đến 5. Thêm vào mỗi bình lần lượt khoảng 50 ml của mỗi dung môi chiết là methanol, methanol 50 %, ethanol, ethanol 50 % và dicloromethan, tiến hành chiết các mẫu với hỗ trợ siêu âm duy trì ở 25 ± 5 °C trong thời gian 30 phút. Lọc thu dịch chiết, tiến hành chiết thêm 2 lần với điều kiện tương tự. Gộp các dịch chiết thu được, cô đến cạn, hòa tan cạn trong 25 ml methanol. Tiến hành phân tích các mẫu trên theo các điều kiện sắc ký ở trên, xác định giá trị tỷ lệ diện tích pic EL1, EL2, EL3 và EL4 trên khối lượng mẫu thử (S/m) (mAu.s/mg). Dựa trên kết quả thu được, lựa chọn dung môi chiết là ethanol 50 % do hiệu suất chiết tốt hơn, ít độc hại và rẻ tiền hơn.

Sử dụng dung môi ethanol 50 % chiết theo qui trình giống như trên, thực hiện trên 4 mẫu, 2 mẫu chiết 3 lần lặp lại và 2 mẫu chiết 4 lần lặp lại. Gộp các dịch chiết thu được, cô đến cạn, hòa tan cạn trong 25 ml ethanol 50 %, đem phân tích sắc ký. Kết quả chiết 4 lần so với chiết 3 lần (tính trên trung bình của 2 mẫu) không có sự khác biệt. Như vậy chiết 3 lần đã đảm bảo các chất cần phân tích được lấy ra hoàn toàn.

25 ml, thêm ethanol 50% vừa đủ đến vạch thu được dung dịch kiểm tra độ thích hợp hệ thống.

Tiêm đầy dung dịch chuẩn hỗn hợp có nồng độ 4 chất EL1, EL2, EL3, EL4 tương ứng 10 %, 50 %, 100 %, 200 %, 300 % so với nồng độ 4 chất EL1, EL2, EL3, EL4 trong dung dịch kiểm tra độ thích hợp hệ thống vào hệ thống sắc ký, ghi lại sắc ký đồ và các thông số sắc ký. Thiết lập phương trình hồi quy tuyến tính giữa nồng độ các dung dịch chuẩn và diện tích pic sắc ký tương ứng thu được. Xác định nồng độ các hợp chất phân tích trong mẫu thử bằng phương trình hồi quy và tính toán tỷ lệ các hợp chất trong mẫu dược liệu.

3.2. Thẩm định quy trình định tính và định lượng đồng thời 4 chất EL1, EL2, EL3 và EL4

3.2.1. Độ đặc hiệu

Tiêm lần lượt mẫu trắng (ethanol 50 %), mẫu chuẩn (dung dịch chuẩn ở đánh giá độ thích hợp hệ thống) và mẫu thử (dung dịch thử 1 ở phần đánh giá độ lặp lại). Thời gian lưu và phổ UV của pic EL1, EL2, EL3 và EL4 ở mẫu thử phù hợp với ở mẫu chuẩn. Mẫu trắng không xuất hiện pic ở thời gian các thời gian lưu trên. Như vậy phương pháp đáp ứng yêu cầu về độ đặc hiệu.

3.2.2. Độ thích hợp hệ thống

Tiêm lặp lại 6 lần dung dịch hỗn hợp chuẩn chứa đồng thời 4 chất EL1 (0,006 mg/ml), EL2 (0,03 mg/ml), EL3 (0,015 mg/ml) và EL4 (0,04 mg/ml) trong ethanol 50 %. Kết quả phân tích cho RSD thời gian lưu và diện tích pic trên sắc ký đồ của pic EL1 lần lượt là 0,04 % và 0,12 %; pic EL2 lần lượt là 0,03 % và 0,24 %; pic EL3 lần lượt là 0,02 % và 0,29 % và pic EL4 lần lượt là 0,02 % và 0,40 %. Các giá trị này đều không quá 2,0 %, do đó phương pháp đạt yêu cầu về độ thích hợp hệ thống.

3.2.3. Độ tuyến tính

Chuẩn bị dãy các dung dịch chuẩn có nồng độ từ 10 – 300 % so với nồng độ dung dịch chuẩn làm việc. Tiến

hành sắc ký, ghi lại sắc ký đồ và diện tích pic. Kết quả cho thấy phương pháp cho hệ số tương quan R của cả 4 hợp chất phân tích đều trên 0,99998 (>0,998). Như vậy phương pháp đã xây dựng đáp ứng yêu cầu về độ tuyến tính.

3.2.4. Độ lặp lại và độ chính xác trung gian

Chuẩn bị mẫu thử theo quy trình phân tích, tiến hành 2 ngày khác nhau, mỗi ngày 6 thử, xác định hàm lượng 4 chất EL1, EL2, EL3 và EL4 trong mẫu được liệu (Dược liệu Bá bệnh có độ ẩm 7,94 %). Kết quả thẩm định trình bày ở Bảng 2 cho thấy phương pháp đáp ứng yêu cầu hiện hành về độ lặp lại và độ chính xác trung gian của AOAC.

3.2.5. Độ đúng và khoảng định lượng

Độ đúng của phương pháp được thực hiện bằng cách thêm chuẩn vào nền mẫu thử để đạt được nồng độ các chất trong mẫu thử khoảng 10 %, 60 %, 100 % và 250 % của nồng độ chuẩn làm việc. Cụ thể như sau: thêm lần lượt các dung dịch chuẩn gốc tương ứng lần lượt có nồng độ khoảng 5% dung dịch chuẩn thích hợp hệ thống vào bình nón 100 ml có chứa sẵn chính xác khoảng 0,1 g mẫu thử; 10 %, 50 % vào bình nón 100 ml có chứa sẵn chính xác khoảng 1 g mẫu thử và 150% vào bình nón 100 ml có chứa sẵn chính xác khoảng 2 g mẫu thử. Tiến hành chuẩn bị mẫu thử theo quy trình phân tích. Tại mỗi nồng độ mẫu thử chuẩn bị 3 mẫu.

Bảng 2. Kết quả đánh giá độ lặp lại và độ chính xác trung gian của phương pháp

| Tên | Độ lặp lại (n=6)    |                | Độ chính xác trung gian (n=12) |                |
|-----|---------------------|----------------|--------------------------------|----------------|
|     | Hàm lượng % (kl/kl) | RSD %          | Hàm lượng % (kl/kl)            | RSD %          |
| EL1 | 0,0474              | 1,38 (< 3,7 %) | 0,0471                         | 1,10 (< 3,7 %) |
| EL2 | 0,0235              | 2,63 (< 3,7 %) | 0,0237                         | 3,36 (< 3,7 %) |
| EL3 | 0,0503              | 2,09 (< 3,7 %) | 0,0507                         | 2,10 (< 3,7 %) |
| EL4 | 0,00915             | 2,08 (< 5,3 %) | 0,00922                        | 2,16 (< 5,3 %) |

Bảng 3. Kết quả đánh giá độ đúng của phương pháp

| Mẫu thử (n = 3) | EL1       |         | EL2       |         | EL3       |         | EL4       |         |
|-----------------|-----------|---------|-----------|---------|-----------|---------|-----------|---------|
|                 | % thu hồi | RSD (%) | % thu hồi | RSD (%) | % thu hồi | RSD (%) | % thu hồi | RSD (%) |
| 10 %            | 98,1      | 2,0     | 97,6      | 1,4     | 98,6      | 1,7     | 98,7      | 1,9     |
| 60 %            | 100,1     | 1,4     | 97,9      | 1,2     | 97,6      | 2,7     | 98,5      | 1,9     |
| 100 %           | 98,9      | 0,4     | 98,2      | 0,9     | 98,6      | 2,4     | 98,2      | 2,0     |
| 250 %           | 99,4      | 1,3     | 99,0      | 1,4     | 97,8      | 2,5     | 98,8      | 1,5     |

Theo yêu cầu của AOAC, đối với mẫu có hàm lượng từ 0,01 % đến 0,1 % (EL1, EL2, EL3) độ thu hồi mẫu trung bình phải đạt từ 95 % đến 105 %, đối với mẫu có hàm lượng từ 0,0001 % đến 0,01 % (EL4), độ thu hồi mẫu trung bình phải đạt từ 90 % đến 107 %. Như vậy phương pháp định lượng đã xây dựng có độ đúng đạt yêu cầu.

Khoảng định lượng của phương pháp được xác định lần lượt từ 3,3 µg/ml đến 79,5 µg/ml đối với EL1; 1,6 µg/ml đến

39,7 µg/ml đối với EL2; 4,0 µg/ml đến 100,0 µg/ml đối với EL3; 0,6 µg/ml đến 15,7 µg/ml đối với EL4.

3.2.6. Giới hạn định lượng

Pha loãng gấp đôi liên tiếp dung dịch thử được chuẩn bị ở phần đánh giá độ lặp lại và tiêm vào hệ thống sắc ký. Xác định nồng độ của 4 hợp chất mà tại nồng độ đó thu được pic có đáp ứng pic gấp khoảng 3 lần độ nhiễu đường

nền (giới hạn phát hiện – LOD). Giới hạn định lượng (LOQ) của các chất sẽ là 3,3 lần giới hạn phát hiện. Kết quả LOQ của 4 chất EL1, EL2, EL3 và EL4 lần lượt là 0,54 µg/ml; 0,72 µg/ml; 1,52 µg/ml và 0,47 µg/ml.

3.3. Xác định 4 chất EL1, EL2, EL3 và EL4 trong các mẫu được liệu Bá bệnh.

Bảng 4. Kết quả hàm lượng 4 chất EL1, EL2, EL3 và EL4 trong 6 mẫu được liệu Bá bệnh

| Tên mẫu | Độ ẩm (%) | Hàm lượng chất nghiên cứu (% , kl/kl) |        |        |        |
|---------|-----------|---------------------------------------|--------|--------|--------|
|         |           | EL1                                   | EL2    | EL3    | EL4    |
| M1      | 8,15      | 0,0533                                | 0,0352 | 0,0417 | 0,0289 |
| M2      | 8,07      | 0,0999                                | 0,0339 | 0,0414 | 0,0344 |
| M3      | 7,45      | 0,0359                                | 0,0114 | 0,0339 | 0,0047 |
| M4      | 7,69      | 0,0155                                | 0,0192 | 0,0237 | 0,0042 |
| M5      | 7,83      | 0,0257                                | 0,0253 | 0,0383 | 0,0055 |
| M6      | 7,94      | 0,0471                                | 0,0237 | 0,0507 | 0,0092 |

Áp dụng quy trình định tính, định lượng đã xây dựng để xác định đồng thời 4 chất EL1, EL2, EL3 và EL4 trong các mẫu được liệu Bá bệnh thu hái ở các địa phương khác nhau, kết quả thu được theo Bảng 4.

Kết quả trên cho thấy hàm lượng và tỷ lệ các hợp chất nghiên cứu trong các mẫu được liệu Bá bệnh thay đổi

khá nhiều theo địa điểm thu hái. Trong tất cả 6 mẫu, hàm lượng hai hợp chất EL1 và EL3 luôn chiếm tỷ lệ cao nhất, mẫu lấy ở Vĩnh Cửu - Đồng Nai (M2) cho hàm lượng cả 4 hợp chất cao hơn so với các mẫu còn lại.

4. KẾT LUẬN

Nghiên cứu đã xây dựng được phương pháp xác định đồng thời 4 hợp chất EL1, EL2, EL3 và EL4 trong được liệu Bá bệnh bằng phương pháp HPLC detector DAD đáp ứng các yêu cầu hiện hành. Phương pháp định lượng có khoảng làm việc là từ 17,8 µg/ml đến 44,5 µg/ml đối với EL1; 9,0 µg/ml đến 22,5 µg/ml đối với EL2; 24,7 µg/ml đến 61,7 µg/ml đối với EL3, 3,6 µg/ml đến 9,0 µg/ml đối với EL4; giới hạn định lượng của phương pháp là khoảng 0,54 µg/ml đối với hợp chất EL1; 0,72 µg/ml đối với hợp chất EL2; 1,52 µg/ml đối với hợp chất EL3, 0,47 µg/ml đối với hợp chất EL4. Phương pháp định tính đã xây dựng đáp ứng được yêu cầu về độ đặc hiệu; phương pháp định lượng đáp ứng được các yêu cầu về độ đặc hiệu, độ thích hợp hệ thống, độ tuyến tính, độ lặp lại, độ chính xác trung gian và độ đúng theo các yêu cầu của ICH và AOAC. Phương pháp đã được ứng dụng để kiểm tra 06 mẫu được liệu Bá bệnh thu hái tại 06 vùng trồng được liệu ở Việt Nam.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Đỗ Tất Lợi (2000), *Những cây thuốc và vị thuốc Việt Nam*, NXB Y học Hà Nội, tr. 412-413.

2. E. H. Thu, et al. (2018), Recent Advances in Antibacterial, Antiprotozoal and Antifungal Trends of *Eurycoma longifolia*: A Review of Therapeutic Implications and Future Prospects, *Current Drug Targets*, **19**(14): p. 1657-1671.

3. Tran Thi Van Anh (2014), et al., NF-κB Inhibitors from *Eurycoma longifolia*, *Journal of Natural Products*, **77**(3): pp. 483-488.

Pham Bich Ngoc, et al. (2016), A new anti-inflammatory β-carboline alkaloid from the hairy-root cultures of *Eurycoma longifolia*, *Natural Product Research*, **30**(12): pp. 1360-1365.

4. H. Itokawa, et al. (1992), Cytotoxic Quassinoids and Tirucallane-Type Triterpenes from the Woods of *Eurycoma longifolia*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, (**40**), pp. 1053-1055.

5. J. Ruan, et al. (2019), Bioactive Constituents from the Roots of *Eurycoma longifolia*, *Molecules*, **24**(17).

6. J. Chaingam, et al. (2021), HPLC-UV-based simultaneous determination of canthin-6-one alkaloids, quassinoids, and scopoletin: the active ingredients in *Eurycoma longifolia* Jack and *Eurycoma harmandiana* Pierre, and their anti-inflammatory activities, *Journal of AOAC International*, **104**(3), 802-810.

7. AOAC International (2016), *Guidelines for Standard Method Performance Requirements*. Appendix F.

SUMMARY

The compound 14,15β-dihydroxyklaineanone, scopoletin, eurycomalactone and 9-methoxycanthin-6-one were biological active compound of *Radix Eurycomae longifoliae*. In this study, an analytical method was successfully developed and validated for determination simultaneously of 14,15β-dihydroxyklaineanone, scopoletin, eurycomalactone and 9-methoxycanthin-6-one in the root of *Eurycomae longifoliae* Jack based on RP-HPLC with DAD detector using a column C18 (250 x 4.6 mm, 5 µm) and a mobile phase as mixture of phosphoric acid 0.1 % and acetonitril according to the gradient program; the flow rate was maintained at 1.0 ml/min, and the choosen wavelength of DAD detector was at 260 nm. This procedure could be applied suitable for quantitation of 14,15β-dihydroxyklaineanone with LOQ value of 0.54 µg/ml; scopoletin with LOQ value of 0.72 µg/ml; eurycomalactone with LOQ value of 1.52 µg/ml; 9-methoxycanthin-6-one with LOQ value of 0.47 µg/ml and fully met all the requirements (specificity, linearity, pricision, repeatability, and accuracy) according to ICH and AOAC guidelines.

(Ngày nhận bài: 16/5/2023; Ngày phản biện: 06/6/2023; Ngày duyệt đăng: 14/6/2023)



# MỤC LỤC

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   | Trang |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| <ul style="list-style-type: none"> <li><b>Nghiên cứu khoa học</b></li> </ul>                                                                                                                                                                                                                                                      |       |
| - Xây dựng phương pháp định lượng azithromycin trong nền viên nén có thành phần xác định bằng phương pháp quang phổ hồng ngoại phản xạ (FTIR-ATR).<br><i>BÙI VĂN TRUNG, BÙI TRỌNG HUY, TRẦN THỊ BÍCH VÂN, ĐOÀN CAO SƠN, LÊ ĐÌNH CHI</i>                                                                                           | 1     |
| - Xây dựng và thẩm định phương pháp xác định dư lượng một số chất gây nghiện trong bùn thải bằng LC-MS/MS.<br><i>TRẦN THỊ THANH HUẾ, NGUYỄN THỊ LAN ANH, HOÀNG VĂN ĐỨC, NGUYỄN THỊ DUNG, THÁI KHÁNH PHONG, NGUYỄN THỊ KIỀU ANH</i>                                                                                                | 6     |
| - Nghiên cứu xây dựng quy trình phân lập và tinh chế tenuifolin từ dược liệu Viễn chí ( <i>Radix polygalae</i> ) làm nguyên liệu thiết lập chất chuẩn.<br><i>NGUYỄN THỊ THU HẰNG, BẠCH THỊ THẨM, TRẦN THỊ THU TRANG, NGUYỄN TUẤN ANH, ĐOÀN CAO SƠN, NGUYỄN LÂM HỒNG</i>                                                           | 12    |
| - Xây dựng phương pháp định lượng đồng thời 2 tạp chất định danh trong nguyên liệu tạp chất B của tetrazosin dùng thiết lập tạp chuẩn bằng sắc ký lỏng hiệu năng cao.<br><i>ĐỖ THỊ THANH THỦY, PHẠM VĂN QUANG</i>                                                                                                                 | 16    |
| - Xây dựng phương pháp định tính và định lượng 3,5-dimethoxy-4-hydroxy-1- $\beta$ -D-glucopyranosid trong phần gỗ cây Bàn tay ma đỏ ( <i>Heliciopsis lobata</i> ) bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao.<br><i>BÙI VĂN TRUNG, HÀ THỊ THU THỦY, DƯƠNG HỒNG ANH, PHẠM HÙNG VIỆT</i>                                            | 21    |
| - Xây dựng phương pháp xác định đồng thời 4 hợp chất 14,15 $\beta$ -dihydroxyklaineanone, scopoletin, eurycomalacton và 9-methoxycanthin-6-one trong rễ cây Bá bệnh ( <i>Radix Eurycomae longifoliae</i> ) bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao.<br><i>ĐỖ THỊ NGỌC LAN, NGUYỄN THỊ HẰNG, NGUYỄN TIẾN ĐẠT, LÊ QUANG THẢO</i> | 27    |

# CONTENTS

|                                                                                                                                                                                                                                                                                              | Page |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| <ul style="list-style-type: none"> <li><b>Scientific researches</b></li> </ul>                                                                                                                                                                                                               |      |
| - Development of a quantitative method for determining azithromycin in the tablet powder with known composition.<br><i>BUI VAN TRUNG, BUI TRONG HUY, TRAN THI BICH VAN, DOAN CAO SON, LE DINH CHI</i>                                                                                        | 1    |
| - Development and validation of LC-MS/MS method for determination of some illicit drugs residues in sewage sludge.<br><i>TRAN THI THANH HUE, NGUYEN THI LAN ANH, HOANG VAN DUC, NGUYEN THI DUNG, THAI KHANH PHONG, NGUYEN THI KIEU ANH</i>                                                   | 6    |
| - Isolation and purification of tenuifolin from the <i>Radix polygalae</i> for reference standard establishment.<br><i>NGUYEN THI THU HANG, BACH THI THAM, TRAN THI THU TRANG, NGUYEN TUAN ANH, DOAN CAO SON, NGUYEN LAM HONG</i>                                                            | 12   |
| - Developing an HPLC method to assay two specific related substances in impurity B of terazosine which is used as a material for establishing reference standard.<br><i>DO THI THANH THUY, PHAM VAN QUANG</i>                                                                                | 16   |
| - Identification and determination of 3,5-dimethoxy-4-hydroxy-1- $\beta$ -D-glucopyranoside in wood of <i>Heliciopsis lobata</i> by using high performance liquid chromatography.<br><i>BUI VAN TRUNG, HA THI THU THUY, DUONG HONG ANH, PHAM HUNG VIET</i>                                   | 21   |
| - Simultaneous determination of 14,15 $\beta$ -dihydroxyklaineanone, scopoletin, eurycomalactone và 9-methoxycanthin-6-one in <i>Radix Eurycomae longifoliae</i> by using high performance liquid chromatography.<br><i>DO THI NGOC LAN, NGUYEN THI HANG, NGUYEN TIEN DAT, LE QUANG THAO</i> | 27   |

\* Thông tin về thuốc giả, thuốc không đạt chất lượng bị thu hồi và thuốc đã được Bộ Y tế rút số đăng ký từ 01/12/2022 đến 31/5/2023 đã được Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương đăng tải trên website <https://nidqc.gov.vn>.