

ĐỊNH LƯỢNG ACID ACETIC TRONG THUỐC NHỎ TAI VỚI CÔNG THỨC BẢO CHẾ CÓ CHỨA ACID CITRIC BẰNG PHƯƠNG PHÁP SẮC KÝ LỎNG HIỆU NĂNG CAO

THÁI PHAN QUỲNH NHƯ
Công ty Cổ phần tập đoàn Merap

MAI THANH HÀ, NGUYỄN THỊ HẰNG, TRẦN THÚY HẠNH
Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương

Từ khóa: HPLC, acid acetic, thuốc nhỏ tai, Mepatyl-H

1. Đặt vấn đề

Acid acetic được sử dụng để điều trị nhiễm trùng tai ngoài (viêm tai ngoài) và nấm ống tai ngoài. Acid acetic hoạt động bằng cách ngăn chặn sự phát triển của vi khuẩn và nấm, điều trị nhiễm trùng làm giảm đau và sưng trong tai. Ngoài ra acid acetic còn có tác dụng chống ướt trong ống tai vì môi trường ẩm ướt có thể giúp vi khuẩn và nấm phát triển [6].

Hiện nay, trên thị trường đã xuất hiện khá nhiều thuốc nhỏ tai có chứa hoạt chất acid acetic. Trong các thuốc nhỏ tai này, corticoid thường được đưa vào cùng với acid acetic để tăng tác dụng chống viêm. Trong Dược điển Anh, Nhật, Ấn Độ, Việt Nam đều chưa có chuyên luận thuốc nhỏ tai chứa acid acetic. Dược điển Mỹ 40 [2] có chuyên luận "Acetic acid Otic solution", chỉ tiêu định lượng acid acetic tiến hành bằng phương pháp chuẩn độ acid-base với dung dịch chuẩn độ là natri hydroxyd 0,1 N. Mepatyl-H là sản phẩm thuốc nhỏ tai của Công ty Cổ phần tập đoàn Merap chứa dược chất là acid acetic 2% và hydrocortison 1%, tá dược của sản phẩm này còn có acid citric với vai trò chất điều chỉnh pH. Chính vì vậy việc định lượng acid acetic trong thuốc nhỏ tai Mepatyl-H bằng phương pháp chuẩn độ acid-base như Dược điển Mỹ 40 - chuyên luận "Acetic acid Otic solution" là không phù hợp.

Với mong muốn đưa ra một phương pháp định lượng acid acetic trong sản phẩm thuốc nhỏ tai khi có mặt acid citric trong công thức bào chế với cách tiến hành đơn giản, nhanh chóng và đảm bảo độ chính xác, tin cậy, chúng tôi giới thiệu phương pháp định lượng acid acetic trong thuốc nhỏ tai Mepatyl-H bằng HPLC pha đảo (sử dụng cột RP18). Phương pháp này đã được chúng tôi thẩm định và đạt yêu cầu theo đúng hướng dẫn của ICH đối với phép thử định lượng.

2. Thực nghiệm

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

2.1.1. Thiết bị, dụng cụ

Đã được hiệu chuẩn theo quy định của ISO/IEC 17025.

- Máy sắc ký lỏng hiệu năng cao Shimadzu LC- 20A với detector DAD;

- Cột phân tích sắc ký Phenomenex Gemini C18 (150 x 4,6 mm; 5 µm);
- Cân phân tích Mettler Toledo MS 105 độ chính xác 0,01 mg;
- Bộ lọc dùng cho sắc ký với màng lọc 0,45 µm;
- Các dụng cụ thủy tinh chính xác loại A.

2.1.2. Hóa chất, dung môi, chất chuẩn

- Acid acetic (VWR - Pháp), Số lô: 16J114017, Hàm lượng: 100,0% (nguyên trạng);
- Acid citric PA (Scharlau), Số lô: AC07251000, Hạn dùng: 2/2019;
- Acid phosphoric PA (Prolabo), Số lô: 17F274006, Hạn dùng: 5/2022;
- Methanol HPLC (Merck), Số lô: I0917307743, Hạn dùng: 31/10/2020;
- Natri hydroxyd PA (Scharlau), Số lô: SO04251000, Hạn dùng: 1/2022;
- Nước RO (Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương).

2.2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Đối tượng nghiên cứu

- Mẫu thử: Thuốc nhỏ tai Mepatyl H- NC010618 (chứa acid acetic 2%), do Công ty Cổ phần tập đoàn Merap nghiên cứu phát triển sản phẩm.
- Mẫu placebo: Dung dịch có thành phần giống công thức bào chế (có acid citric) nhưng không có acid acetic.

2.2.2. Nội dung

- Xây dựng và thẩm định quy trình định lượng acid acetic trong sản phẩm thuốc nhỏ tai với sự có mặt của acid citric trong công thức bào chế.
- Ứng dụng để định lượng acid acetic trong thuốc nhỏ tai Mepatyl H do Công ty Cổ phần tập đoàn Merap nghiên cứu phát triển sản phẩm.

2.2.3. Phương pháp nghiên cứu

- Dựa trên các tài liệu tham khảo [2],[4],[5], tiến hành khảo sát các điều kiện sắc ký để lựa chọn điều kiện sắc ký tối ưu.
- Sử dụng phần mềm Microsoft Excel để xử lý kết quả thẩm định.

3. Kết quả và bàn luận

3.1. Xây dựng quy trình phân tích định lượng acid acetic trong sản phẩm thuốc nhỏ tai với sự có mặt của acid citric trong công thức bào chế bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao

Sau khi tiến hành khảo sát về thành phần, tỷ lệ pha động, cột sắc ký, bước sóng phát hiện, tốc độ dòng, nồng độ mẫu thử, thể tích tiêm, chúng tôi xây dựng được quy trình phân tích như sau:

3.1.1. Điều kiện HPLC

- Pha động: Dung dịch đệm pH 3,0 (0,7 ml acid phosphoric/1 lít nước, điều chỉnh về pH 3,0 bằng dung dịch natri hydroxyd 40%) - Methanol (97 : 3), lắc đều và đuổi khí.

- Cột sắc ký: Phenomenex Gemini C18 (150 x 4,6 mm; 5 μ m);

- Detector: 210 nm;

- Tốc độ dòng: 1,0 ml/phút;

- Thể tích tiêm: 20 μ l.

3.1.2. Phương pháp chuẩn bị mẫu

- *Dung dịch chuẩn*: Lấy chính xác 1,0 ml acid acetic chuẩn pha loãng thành 100,0 ml bằng nước và trộn đều (*Dung dịch chuẩn gốc*). Pha loãng 5,0 ml dung dịch thu được thành 100,0 ml bằng nước (nồng độ 0,5 mg/ml).

- *Dung dịch thử*: Lấy chính xác 3,0 ml chế phẩm pha loãng thành 100 ml bằng nước và trộn đều. Lọc qua màng lọc 0,45 μ m.

- *Dung dịch phân giải*: Lấy chính xác 1,0 ml acid acetic loại PA pha loãng thành 100,0 ml bằng nước và trộn

đều. Hút chính xác 5,0 ml dung dịch thu được vào bình định mức 100 ml có chứa sẵn khoảng 15,0 mg acid citric. Thêm nước vừa đủ đến vạch, lắc đều.

- *Dung dịch mẫu placebo*: Lấy chính xác 3,0 ml mẫu placebo pha loãng thành 100,0 ml bằng nước, và trộn đều. Lọc qua màng lọc 0,45 μ m.

3.1.3. Cách tiến hành

- Kiểm tra khả năng thích hợp của hệ thống sắc ký:

Tiêm dung dịch phân giải để kiểm tra tính thích hợp của hệ thống sắc ký, độ phân giải giữa pic acid acetic và acid citric không được nhỏ hơn 2,0.

Tiêm lặp lại 6 lần dung dịch chuẩn, độ lệch chuẩn tương đối của diện tích pic acid acetic không lớn hơn 2,0% và độ lệch chuẩn tương đối của thời gian lưu pic acid acetic không lớn hơn 1,0%.

- Tiêm dung dịch thử.

3.1.4. Tính kết quả

Tính hàm lượng acid acetic ($C_2H_4O_2$) trong chế phẩm dựa vào lượng cân chất chuẩn, hàm lượng acid acetic của chuẩn, diện tích pic acid acetic của dung dịch chuẩn và dung dịch thử, hệ số pha loãng của dung dịch chuẩn và dung dịch thử.

3.2. Thẩm định phương pháp [3]

3.2.1. Tính thích hợp của hệ thống sắc ký

Tính thích hợp của hệ thống sắc ký được xác định bằng cách tiến hành tiêm lặp lại 6 lần dung dịch chuẩn và dung dịch phân giải theo quy trình phân tích. Ghi lại các giá trị về thời gian lưu, diện tích pic, hệ số kéo đuôi và độ phân giải. Kết quả được thể hiện ở Bảng 1.

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

STT	Thời gian lưu của acid acetic (phút)	Diện tích pic acid acetic (mAU.s)	Số đĩa lý thuyết	Hệ số kéo đuôi	Độ phân giải
1	2,984	356089	4120	1,20	2,3
2	2,989	357056	4121	1,20	
3	2,989	357729	4141	1,19	
4	2,987	356529	4153	1,19	
5	2,987	357876	4159	1,19	
6	2,990	357414	4148	1,19	
Trung bình	2,988	357116			
RSD	0,07% < 1,0%	0,20% < 2,0%			

Nhận xét: Các số liệu thu được cho thấy hệ thống sắc ký trên phù hợp cho việc phân tích định lượng acid acetic trong chế phẩm có chứa acid citric.

3.2.2. Tính đặc hiệu

Tiến hành sắc ký dung môi pha mẫu, dung dịch mẫu placebo, dung dịch phân giải, dung dịch chuẩn acid acetic và dung dịch thử theo quy trình phân tích. Kết quả cho thấy:

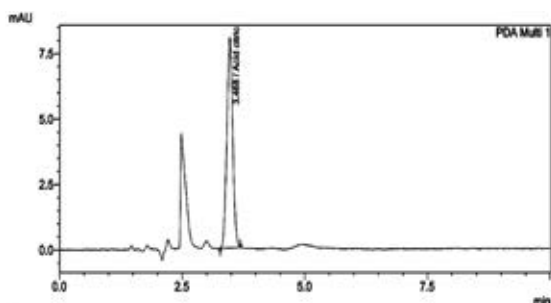
- Thời gian lưu của pic acid acetic trên sắc ký đồ của dung dịch chuẩn (Hình 2) và dung dịch thử (Hình 4) giống nhau: đều bằng ~ 3,0 phút.

- Độ tinh khiết của pic acid acetic trong sắc ký đồ của dung dịch chuẩn và thử đều bằng 0,9999 (khoảng 100%).

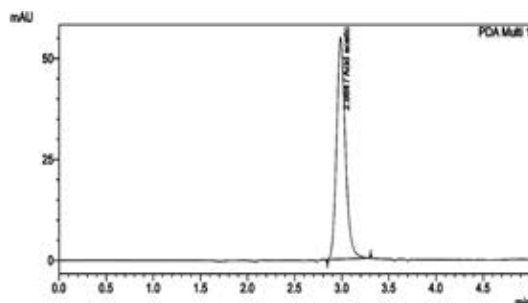
- Sắc ký đồ của dung dịch placebo (Hình 1) không xuất hiện pic nào tại thời gian lưu tương ứng với thời gian lưu của pic acid acetic. Pic acid citric có thời gian lưu khoảng 3,5 phút.

- Dung dịch phân giải và dung dịch thử, pic acid citric tách hoàn toàn ra khỏi pic acid acetic ($R_s = 2,3$).

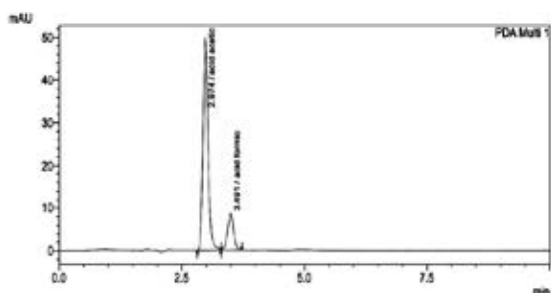
Kết quả được thể hiện trên các Hình 1, 2, 3 và Hình 4. Kết quả khảo sát cho thấy phương pháp có tính đặc hiệu phù hợp cho phép thử định lượng acid acetic bằng phương pháp HPLC.



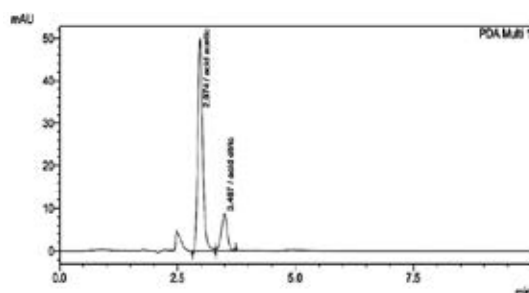
Hình 1. Sắc ký đồ của dung dịch mẫu placebo



Hình 2. Sắc ký đồ của dung dịch chuẩn acid acetic



Hình 3. Sắc ký đồ của dung dịch phân giải



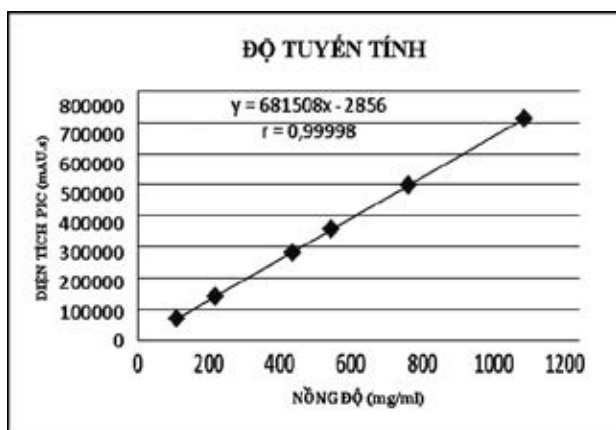
Hình 4. Sắc ký đồ của dung dịch thử

3.2.3. Độ tuyến tính

Khảo sát trên 06 dung dịch chuẩn với có nồng độ 20%, 40%, 80%, 100%, 140% và 200% so với nồng độ định lượng của acid acetic (0,5 mg/ml) (được pha loãng từ dung dịch chuẩn gốc với hệ số pha loãng khác nhau). Kết quả được ghi lại trong Bảng 2 và Hình 5.

Bảng 2. Kết quả khảo sát khoảng tuyến tính của acid acetic

STT	Nồng độ % so với định lượng	Nồng độ acid acetic (mg/ml)	Hệ số pha loãng	Diện tích pic acid acetic (mAU.s)
1	20	0,1049	10000	68391
2	40	0,2098	5000	140879
3	80	0,4196	2500	280476
4	100	0,5245	2000	356824
5	140	0,7343	100/7*100	497730
6	200	1,0490	1000	711682
Phương trình hồi qui $y = 681508 x - 2856$; Hệ số tương quan $r = 0,99998$; % Y = 0,80%				



Hình 5. Đồ thị biểu diễn mối tương quan tuyến tính giữa nồng độ và diện tích pic acid acetic

Với điều kiện sắc ký đã lựa chọn, trong khoảng nồng độ đã khảo sát từ 0,1 - 1,0 mg/ml có sự tương quan tuyến tính chặt chẽ giữa nồng độ với diện tích pic đáp ứng.

3.2.4. Độ đúng

- Chuẩn bị các dung dịch khảo sát: Chuẩn bị các mẫu tự tạo bằng cách thêm chính xác một lượng acid acetic chuẩn vào mẫu placebo tương ứng với mẫu tự tạo chứa 40, 100 và 160% lượng acid acetic so với nồng độ định lượng. Mỗi mức nồng độ làm 03 mẫu.

- Tiến hành sắc ký các dung dịch khảo sát. Sử dụng dung dịch chuẩn ở phần 3.2.2 Tính thích hợp của hệ thống để tính lượng acid acetic tìm thấy so với lượng thêm vào.

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

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

STT	% so với nồng độ định lượng	Lượng acid acetic thực tế thêm vào (mg)	Diện tích pic acid acetic (mAU.s)	Lượng acid acetic tìm lại (mg)	% Thu hồi	
1	40%	20,98	143153	21,02	100,21	TB = 100,28% RSD = 0,06%
2	40%	20,98	143305	21,05	100,32	
3	40%	20,98	143281	21,04	100,30	
4	100%	52,45	356787	52,40	99,91	TB = 99,80% RSD = 0,09%
5	100%	52,45	356205	52,31	99,75	
6	100%	52,45	356238	52,32	99,75	
7	160%	83,92	572644	84,10	100,22	TB = 100,37% RSD = 0,33%
8	160%	83,92	572159	84,03	100,14	
9	160%	83,92	575691	84,55	100,75	

Từ kết quả thu được trong Bảng 3 cho thấy tỉ lệ thu hồi từ 99,75% đến 100,75%, nằm trong khoảng từ 98,0% - 102,0% và RSD < 2,0%, qui trình thử đạt yêu cầu về độ đúng.

3.2.5. Khoảng xác định

Từ kết quả độ đúng suy ra khoảng xác định của acid acetic nằm trong khoảng từ 0,21 mg/ml đến 0,85 mg/ml.

3.2.6. Độ chính xác

3.2.6.1. Độ lặp lại

Tiến hành định lượng trên 06 mẫu thử độc lập theo quy trình phân tích. Xác định hàm lượng acid acetic trong thuốc nhô tai Mepatyl-H. Kết quả được trình bày trong Bảng 4.

3.2.6.2. Độ chính xác trung gian

Cách tiến hành tương tự như phần độ lặp lại với kiểm nghiệm viên khác, ngày khác và thiết bị khác. Kết quả được trình bày trong Bảng 4.

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

STT	Kiểm nghiệm viên 1 Diện tích pic trung bình của chuẩn (n = 6) = 357116 mAU.s		Kiểm nghiệm viên 2 Diện tích pic trung bình của chuẩn (n = 6) = 357257 mAU.s	
	Diện tích pic (mAU.s)	HL (%) so với lượng ghi trên nhãn	Diện tích pic (mAU.s)	HL (%) so với lượng ghi trên nhãn
1	404651	99,05	405597	99,24
2	405022	99,14	403429	98,71
3	403895	98,86	403864	98,82
4	403453	98,75	403516	98,73
5	405662	99,30	404671	99,01
6	404274	98,96	404466	98,96
Hàm lượng TB = 99,01 %; n = 6; RSD = 0,20%			Hàm lượng TB = 98,91%; n = 6; RSD = 0,20%	
Hàm lượng trung bình = 98,96%; n = 12; RSD = 0,20%				

Từ kết quả thu được trong Bảng 4 cho thấy độ lặp lại và độ chính xác trung gian đạt yêu cầu với RSD = 0,20%.

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

LOD được xác định từ kết quả thẩm định độ tuyến tính, phân tích thống kê đường tuyến tính trên phần mềm Excel:

	<i>Coefficients</i>	<i>Standard Error</i>	<i>t Stat</i>	<i>P-value</i>	<i>Lower 95%</i>	<i>Upper 95%</i>
Intercept	-2856	1370	-2,085	0,105449	-6659	947
X Variable 1	681508	2291	298	7,66E-10	675148	687867

Theo kết quả thống kê, độ lệch chuẩn của số dư (*Standard Error*) = 1370

Xác định LOQ của acid acetic theo công thức:

$$\text{LOD} = (3,3 \times 1370) / 681508 = 6,6 \text{ (}\mu\text{g/ml)}; \quad \text{LOQ} = 3 \times \text{LOD} = 19,8 \text{ (}\mu\text{g/ml)}$$

4. Kết luận

Quy trình định lượng acid acetic trong thuốc nhỏ tai với công thức bào chế có chứa acid citric bằng phương pháp sắc ký lỏng pha đảo đã được xây dựng. Phương pháp phân tích sử dụng cột Phenomenex Gemini C18 (150 x 4,6 mm; 5 μ m) với pha động là hỗn hợp của dung dịch đệm pH 3,0 và methanol (97 : 3), tốc độ dòng 1,0 ml/phút, thể tích tiêm 20 μ l; detector UV ở bước sóng 210 nm. Quy trình phân tích được thẩm định về tính đặc hiệu, độ thích hợp của hệ thống, độ tuyến tính, khoảng xác định, độ đúng, độ lặp lại và độ chính xác trung gian. Kết quả thẩm định cho thấy quy trình được xây dựng hoàn toàn phù hợp cho việc định lượng acid acetic trong thuốc nhỏ tai có chứa acid citric trong công thức bào chế và có thể áp dụng quy trình định lượng cho các chế phẩm thuốc nhỏ tai khác có chứa đồng thời acid acetic và acid citric.

Tài liệu tham khảo

1. Bộ Y tế (2017), *Dược điển Việt Nam*, Lần xuất bản thứ năm, NXB Y học, Hà Nội.
2. *The United State Pharmacopeia* 40 (2017), p.2581.
3. *Validation of analytical procedure text and Methodology* - ICH Q2(R1).
4. https://www.perkinelmer.com/lab-solutions/resources/docs/APP_The-Analysis-of-a-Broad-Range-of-Organic-Acids-by-HPLC-with-UV-Detection-012379_01.pdf.
5. <https://www.shimadzu.com/an/hplc/support/lib/lctalk/54/54intro.html>: Analytical methods for organic acids.
6. <https://www.webmd.com/drugs/2/drug-13965/acetic-acid-otic-ear/details>.

SUMMARY

A reversed-phase liquid chromatography method was developed assay for Acetic acid in Mepatyl-H otic solution in which contained Citric acid. The method was carried by using a Phenomenex Gemini C18 (150 x 4.6 mm; 5 μ m) column and Buffer pH 3.0 and Methanol (97:3) as mobile phase. The flow rate of mobile phase is maintained at 1.0 ml per minute, injection volume 20 μ l, analyte was detected by a DAD detector set at 210 nm. The method was validated in specificity, linearity, range; accuracy and precision. Validation results proved that the developed method was suitable for assay for Acetic acid in Mepatyl-H otic solution.

(Ngày nhận bài: 13/11/2018 ; Ngày phản biện: 12/03/2019 ; Ngày duyệt đăng: 27/09/2019)

NGHIÊN CỨU XÂY DỰNG PHƯƠNG PHÁP PHÁT HIỆN VÀ ĐỊNH LƯỢNG THỦY NGÂN TRONG MỘT SỐ MỸ PHẨM BẰNG MÁY ĐO THỦY NGÂN TRỰC TIẾP

ĐOÀI HẢI LINH, NGUYỄN VĂN HÀ, ĐOÀN CAO SƠN
Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương

Từ khóa: Thủy ngân, định lượng, máy đo thủy ngân trực tiếp, mỹ phẩm

1. Đặt vấn đề

Do các hợp chất của thủy ngân có thể giúp ức chế sự hình thành sắc tố melanin, dẫn đến việc da trở nên trắng hơn [5],[6], vì vậy các nhà sản xuất mỹ phẩm có thể trộn trái phép các hợp chất thủy ngân vào các sản phẩm mỹ phẩm như kem bôi da, phấn,... để làm trắng da [5],[6]. Tuy nhiên thủy ngân có thể được hấp thụ qua da, đi vào máu và gây tổn thương gan, thận cũng như làm giảm sức đề kháng của da. Thủy ngân cũng dễ dàng ngấm qua hàng rào mạch máu não và qua nhau thai, gây ảnh hưởng lâu dài đến não bộ và thai nhi [5],[6]. Vì vậy việc kiểm soát hàm lượng thủy ngân trong mỹ phẩm là rất cần thiết.

Hiệp định hệ thống hòa hợp ASEAN đã ban hành danh mục các chất không được sử dụng trong mỹ phẩm trong đó có thủy ngân trừ một vài dạng thủy ngân được sử dụng với mục đích làm chất bảo quản nhưng không được vượt quá 0,007% như thiomersal, muối phenylmercuric,... [2],[3]. Việc định tính và định lượng thủy ngân trong mỹ phẩm bằng phương pháp quang phổ hấp thụ nguyên tử (AAS) có một số hạn chế như phải qua giai đoạn vô cơ hóa mẫu và hydrid hóa trước khi phân tích, sử dụng lượng acid đặc nhiều. Phương pháp đo thủy ngân bằng thiết bị đo trực tiếp có ưu điểm là không phải vô cơ hóa mẫu nên thời gian phân tích ngắn hơn, không phải sử dụng acid đặc, giới hạn phát hiện cỡ 10^{-9} thấp hơn phương pháp AAS là 10^{-6} . Vì vậy, chúng tôi đã thực hiện nghiên cứu xây dựng phương pháp phát hiện và định lượng thủy ngân trong một số mỹ phẩm bằng máy đo thủy ngân trực tiếp; xin được giới thiệu kết quả nghiên cứu này.

2. Thực nghiệm

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

2.1.1. Thiết bị, dụng cụ

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

- Máy đo thủy ngân trực tiếp Hydra II_C Teledyne.
- Cân phân tích Sartorius chính xác tới 0,1 mg.
- Các bình định mức, cốc có mô, pipet, micropipet, thuyền đựng mẫu và các dụng cụ thủy tinh có độ chính xác phù hợp.

2.1.2. Hóa chất, chất chuẩn

2.1.2.1. Chất đối chiếu

- Dung dịch thủy ngân 1000 ppm (nguồn gốc: Merck, lô: HC 72675526, hạn dùng: 30/04/2020).

2.1.2.2. Dung môi, hóa chất

- Nước RO siêu sạch;
- Acid nitric (nguồn gốc: Merck, lô: K49148856, hạn dùng: 30/11/2020).

2.2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Đối tượng nghiên cứu

- Kem dưỡng trắng da Dabo Speech whitening up sản xuất tại Hàn Quốc.
- Phấn trang điểm Eveline Celebrity do Công ty Eveline Cosmetics sản xuất tại Ba Lan.

Cả 2 mẫu nên qua khảo sát sơ bộ bằng máy quang phổ hấp thụ nguyên tử (AAS) đều không có thủy ngân.

2.2.2. Phương pháp nghiên cứu

- Sử dụng 2 mẫu đại diện cho các nhóm sản phẩm hay bị trộn trái phép thủy ngân là kem và phấn để xây dựng và thẩm định phương pháp. Tiến hành thực nghiệm để tìm ra điều kiện phân tích phù hợp. Phương pháp xây dựng được thẩm định trên các chỉ tiêu: độ đặc hiệu, độ lặp lại, độ chính xác trung gian, độ tuyến tính và khoảng xác định, độ đúng, giới hạn phát hiện (LOD) và giới hạn định lượng (LOQ) [1],[4].

- Sử dụng máy đo thủy ngân trực tiếp, tiến hành đo độ hấp thụ của thủy ngân. Đo độ hấp thụ của mẫu trắng, đo độ hấp thụ của mẫu chuẩn và mẫu thử. Từ độ hấp thụ của các mẫu chuẩn, lập đường chuẩn thực nghiệm biểu diễn sự phụ thuộc của độ hấp thụ vào lượng thủy ngân và tính lượng thủy ngân trong mẫu thử dựa vào đường chuẩn.

- Các kết quả thực nghiệm được tính toán và xử lý thống kê trên Microsoft Excel.

2.2.2.1. Chuẩn bị mẫu thử

- Mẫu thử kem (phấn): Lấy 3 hộp kem (phấn), trộn đều. Cân chính xác khoảng 0,1 g kem vào thuyền đo.
- Mẫu kem (phấn) tự tạo: Cân chính xác khoảng 0,1 g kem (phấn) không chứa thủy ngân vào thuyền đo, thêm chính xác 100 μ l dung dịch chuẩn Hg 1ppm (được pha loãng từ dung dịch thủy ngân chuẩn 1000 ppm).

2.2.2.2. Chuẩn bị mẫu chuẩn

- Dung dịch chuẩn Hg 10 ppm: Hút chính xác 1,0 ml dung dịch Hg 1000 ppm vào bình định mức 100 ml, thêm dung dịch acid nitric 10% vừa đủ đến vạch, lắc đều.

- Dung dịch chuẩn Hg 1 ppm: Hút chính xác 10,0 ml dung dịch Hg 10 ppm (đã chuẩn bị ở trên) vào bình định mức 100 ml, thêm dung dịch acid nitric 10% vừa đủ đến vạch, lắc đều.

3. Kết quả và bàn luận

3.1. Xây dựng qui trình phân tích

- Bật máy, để tín hiệu và nhiệt độ ổn định khoảng 30 phút;

- Điều chỉnh các tỷ lệ khí đáp ứng yêu cầu sau:

Input: 13 -17 psi Orifice: 1,0 -1,2 psi

Output: 0,4 - 2,0 psi

- Sau khi tham khảo tài liệu của nhà sản xuất thiết bị [7], tiến hành khảo sát thực tế, chúng tôi lựa chọn được chương trình nhiệt độ - thời gian tối ưu để phân tích thủy ngân trong mẫu kem, phần như trong Bảng 1.

Bảng 1. Chương trình nhiệt độ - thời gian

Giai đoạn	Nhiệt độ	Thời gian
Nhiệt độ sấy khô	300°C	120 s
Nhiệt độ phân hủy	800°C	200 s
Nhiệt độ xúc tác	725°C	140 s
Nhiệt độ bẫy thủy ngân	750°C	60 s

3.2. Điều kiện phân tích

- Tiến hành đo độ hấp thụ của thuyền rồng: Yêu cầu: Độ hấp thụ của thuyền rồng $\leq 100 \mu\text{Abs}$ [7].

- Tiến hành đo mẫu thử, mẫu chuẩn trên hệ thống máy đo thủy ngân trực tiếp, sử dụng chương trình nhiệt độ - thời gian như Bảng 1, ghi lại phổ đồ.

3.3. Đánh giá phương pháp

3.3.1. Đánh giá độ đặc hiệu

Tiến hành phân tích theo các điều kiện ở Bảng 1 cho các mẫu:

- Mẫu trắng: 100 μl dung dịch acid nitric 10%.

- Mẫu nền: Cân chính xác 0,1 g mẫu kem (phần) không chứa thủy ngân.

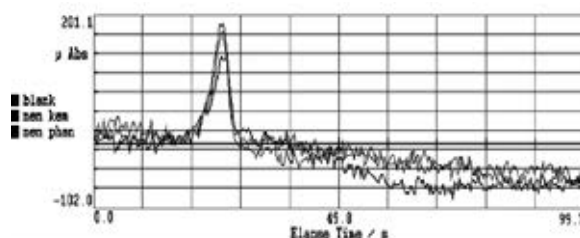
- Mẫu kem (phần) tự tạo: xem phần 2.2.2.1.

- Mẫu chuẩn: 100 μl dung dịch chuẩn Hg 1 ppm (Hg 100 ng).

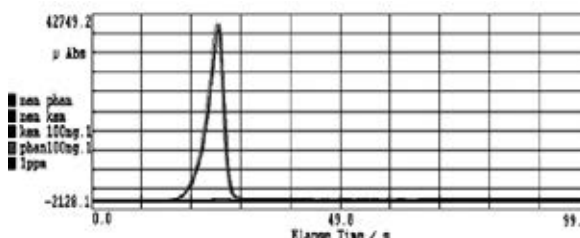
Đo lần lượt các mẫu trên hệ thống máy đo thủy ngân trực tiếp, kết quả phân tích được thể hiện ở Bảng 2, Hình 1 và Hình 2.

Bảng 2. Độ đặc hiệu của phương pháp

STT	Độ hấp thụ (μAbs)	Ảnh hưởng (%)
Mẫu trắng	100	0,5%
Mẫu nền kem	91	0,5%
Mẫu nền phần	81	0,4%
Mẫu kem tự tạo	20065	101,2%
Mẫu phần tự tạo	20384	102,8%
Mẫu chuẩn	19823	



Hình 1. Độ hấp thụ của nền mẫu



Hình 2. Độ hấp thụ của mẫu chuẩn, mẫu tự tạo

- Đánh giá ảnh hưởng của nền mẫu dựa vào độ hấp thụ của các mẫu nền, mẫu tự tạo so với độ hấp thụ của mẫu chuẩn Hg 100 ng.

- Kết quả thu được cho thấy: Mẫu trắng và mẫu nền không có thủy ngân có ảnh hưởng không đáng kể ($\leq 0,5\%$). Mẫu tự tạo kem và tự tạo phần khi cho thêm thủy ngân 100 ng cho độ hấp thụ tương ứng với nồng độ dung dịch chuẩn Hg 100 ng.

3.3.2. Khảo sát khoảng tuyến tính

Chuẩn bị các dung dịch chuẩn:

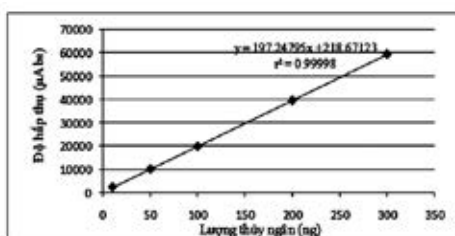
- Từ dung dịch chuẩn Hg 1 ppm, dùng micropipet hút chính xác lần lượt 10 μl , 50 μl , 100 μl , 200 μl vào thuyền đo, ta thu được dãy các mẫu chuẩn tương ứng có lượng thủy ngân là 10 ng, 50 ng, 100 ng và 200 ng.

- Từ dung dịch chuẩn Hg 10 ppm, dùng micropipet hút chính xác 30 μl vào thuyền đo, ta thu được mẫu chuẩn tương ứng có lượng thủy ngân là 300 ng.

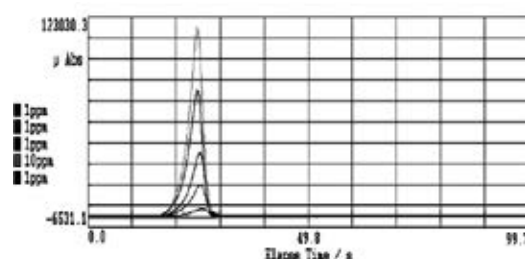
Đo lần lượt các dung dịch chuẩn trên hệ thống máy đo thủy ngân trực tiếp, kết quả phân tích được thể hiện ở Bảng 3, Hình 3 và Hình 4.

Bảng 3. Khoảng nồng độ tuyến tính của thủy ngân

STT	Thủy ngân	
	Lượng thủy ngân (ng)	Độ hấp thụ (μAbs)
1	10	2333
2	50	10041
3	100	19823
4	200	39598
5	300	59482
Phương trình hồi qui		$y = 197,25 x + 218,67$
Hệ số tương quan		$r = 0,99999$



Hình 3. Đồ thị biểu diễn sự tương quan tuyến tính giữa độ hấp thụ và lượng Hg



Hình 4. Độ hấp thụ của các dung dịch chuẩn thủy ngân

3.3.3. Độ lặp lại

Độ lặp lại được tiến hành thử nghiệm trên 6 mẫu thử kem và phần tự tạo (mẫu được chuẩn bị như phần độ đặc hiệu). Kết quả được thể hiện ở Bảng 4 và Bảng 5.

Bảng 4. Độ lặp lại của phương pháp trên nền mẫu thử kem

STT	Khối lượng mẫu thử (g)	Độ hấp thụ (μAbs)	Lượng Hg tìm được (ng)	Số liệu thống kê
1	0,1020	20065	100,67	TB = 100,63 ng n = 6 RSD = 0,77%
2	0,1029	20037	100,53	
3	0,1043	19865	99,65	
4	0,1045	19939	100,03	
5	0,1063	20139	101,04	
6	0,1002	20298	101,85	

Bảng 5. Độ lặp lại của phương pháp trên nền mẫu thử phần

STT	Khối lượng mẫu thử (g)	Độ hấp thụ (μAbs)	Lượng Hg tìm được (ng)	Số liệu thống kê
1	0,1042	20384	102,28	TB = 98,46 ng n = 6 RSD = 4,18%
2	0,1039	19302	96,80	
3	0,1053	19010	95,32	
4	0,1024	20314	101,93	
5	0,1031	18473	92,60	
6	0,1022	20288	101,80	

3.3.4. Độ chính xác trung gian

Độ chính xác trung gian được tiến hành thử nghiệm vào ngày khác trên 6 mẫu thử kem và phần tự tạo (mẫu được chuẩn bị như phần độ đặc hiệu). Kết quả được thể hiện ở Bảng 6 và Bảng 7.

Bảng 6. Độ chính xác trung gian của phương pháp trên nền mẫu thử kem

Ngày	STT	Khối lượng mẫu thử (g)	Độ hấp thụ (μAbs)	Lượng Hg tìm được (ng)	Số liệu thống kê
01/08/2018	1	0,1020	20065	100,67	TB = 100,63 ng n = 6 RSD = 0,77%
	2	0,1029	20037	100,53	
	3	0,1043	19865	99,65	
	4	0,1045	19939	100,03	
	5	0,1063	20139	101,04	
	6	0,1002	20298	101,85	
08/08/2018	7	0,1011	20704	109,06	TB = 108,01 ng n = 6 RSD = 1,56%
	8	0,1064	20111	105,96	
	9	0,1013	20647	108,77	
	10	0,1110	20377	107,35	
	11	0,1010	20215	106,51	
	12	0,1000	20959	110,40	
Lương thủy ngân trung bình = 104,32% ; n = 12; RSD = 3,88%					

Bảng 7. Độ chính xác trung gian của phương pháp trên nền mẫu thử phân

Ngày	STT	Khối lượng mẫu thử (g)	Độ hấp thụ (μAbs)	Lượng Hg tìm được (ng)	Số liệu thống kê
01/08/2018	1	0,1042	20384	102,28	$TB = 98,46 \text{ ng}$ $n = 6$ $RSD = 4,18\%$
	2	0,1039	19302	96,80	
	3	0,1053	19010	95,32	
	4	0,1024	20314	101,93	
	5	0,1031	18473	92,60	
	6	0,1022	20288	101,80	
08/08/2018	7	0,1027	20152	106,18	$TB = 102,60 \text{ ng}$ $n = 6$ $RSD = 6,37\%$
	8	0,1028	19569	103,13	
	9	0,1023	20506	108,03	
	10	0,1039	17571	92,68	
	11	0,1043	18355	96,78	
	12	0,1015	20661	108,84	
Lượng thủy ngân tìm lại trung bình = 100,53% ; $n = 12$; $RSD = 5,61\%$					

Kết quả ở Bảng 4, 5, 6 và 7 cho thấy phương pháp định lượng Hg bằng máy đo thủy ngân trực tiếp trên cả hai nền mẫu là kem và phân có độ chính xác cao (Đạt yêu cầu với $RSD < 15\%$ [1]).

3.3.5. Đánh giá độ đúng

Thêm chính xác một lượng dung dịch chuẩn thủy ngân vào nền mẫu kem hoặc phân không có thủy ngân. Tiến hành ở 3 mức nồng độ khác nhau: mức 10 ng Hg, mức 100 ng Hg và mức 200 ng Hg; mỗi nồng độ thực hiện 3 lần. Dựa vào độ hấp thụ của thủy ngân tương ứng trong mẫu để tính ra lượng Hg tìm thấy. Kết quả được thể hiện ở Bảng 8 và Bảng 9.

Bảng 8. Độ đúng của phương pháp trên nền mẫu thử kem

STT	Khối lượng mẫu thử (g)	Lượng Hg (ng) thêm vào	Độ hấp thụ (μAbs)	Lượng Hg (ng) tìm lại	% Thu hồi	% Thu hồi trung bình
1	0,1004	10	1988	9,06	90,6	$TB = 90,9\%$ $RSD = 1,08\%$
2	0,1001	10	1978	9,01	90,1	
3	0,1045	10	2015	9,20	92,0	
4	0,1020	100	20065	100,67	100,7	$TB = 100,3\%$ $RSD = 0,6\%$
5	0,1029	100	20037	100,53	100,5	
6	0,1043	100	19865	99,65	99,7	
7	0,1012	200	42617	214,95	107,5	$TB = 107,4\%$ $RSD = 0,5\%$
8	0,1008	200	42377	213,73	106,9	
9	0,1047	200	42795	215,85	107,9	

Bảng 9. Độ đúng của phương pháp trên nền mẫu thử phân

STT	Khối lượng mẫu thử (g)	Lượng Hg (ng) thêm vào	Độ hấp thụ (μAbs)	Lượng Hg (ng) tìm lại	% Thu hồi	% Thu hồi trung bình
1	0,1071	10	1784	8,03	80,3	$TB = 76,2\%$ $RSD = 4,8\%$
2	0,1065	10	1675	7,48	74,8	
3	0,1018	10	1648	7,34	73,4	
4	0,1042	100	20384	102,28	102,3	$TB = 98,1\%$ $RSD = 3,8\%$
5	0,1039	100	19302	96,80	96,8	
6	0,1053	100	19010	95,32	95,3	
7	0,1053	200	41646	210,03	105,0	$TB = 100,4\%$ $RSD = 6,1\%$
8	0,1039	200	37077	205,37	102,7	
9	0,1089	200	40726	186,87	93,4	

Kết quả thu được ở Bảng 8 và 9 cho thấy phương pháp có độ đúng khá cao với khả năng thu hồi trên cả hai nền mẫu kem và phân nằm trong giới hạn cho phép.

3.3.6. Giới hạn phát hiện và giới hạn định lượng

- Từ kết quả khảo sát khoảng tuyến tính ở mục 3.3.2, ta có phương trình hồi quy thể hiện mối tương quan giữa lượng thủy ngân và độ hấp thụ: $y = 197,25x + 218,67$ ($a = 197,25$; $b = 218,67$).

- Giới hạn phát hiện và giới hạn định lượng của phương pháp được tính toán dựa vào số dư độ lệch chuẩn của đường hồi quy và độ dốc của đường chuẩn.

$$+ \text{Giới hạn phát hiện: LOD} = \frac{3.3 \times S(r)}{a}$$

$$+ \text{Giới hạn định lượng: LOQ} = \frac{10 \times S(r)}{a}$$

Trong đó: a : Là độ dốc của đường hồi quy tuyến tính;

$S(r)$ là số dư độ lệch chuẩn của đường hồi quy;

$$s(r) = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2}{n-2}}$$

- Số dư độ lệch chuẩn của đường hồi quy được đưa ra như trong Bảng 10.

Bảng 10. Số dư độ lệch chuẩn của đường hồi quy

Nồng độ Hg [x] (ng)	Độ hấp thụ thực tế [y _i] (μAbs)	Độ hấp thụ lý thuyết [ŷ _i] (μAbs)	Chênh lệch độ hấp thụ [y _i - ŷ _i]	Bình phương chênh lệch độ hấp thụ [y _i - ŷ _i] ²
10	2333	2191,15	141,85	20121,23
50	10041	10081,07	-40,07	1605,48
100	19823	19943,47	-120,47	14512,00
200	39598	39668,26	-70,26	4936,51
300	59482	59393,05	88,95	7911,25
Tổng				49086,47
S(r)				127,91

- Từ công thức ở trên tính ra giá trị LOD và LOQ của phương pháp: LOD = 2,14 ng ; LOQ = 6,48 ng

4. Kết luận

Xây dựng được phương pháp xác định thủy ngân bằng máy đo thủy ngân trực tiếp, phương pháp có ưu điểm so với phương pháp quang phổ hấp thụ nguyên tử là không phải sử dụng các acid đặc để phá mẫu và không cần giai đoạn phá mẫu ở bên ngoài, mà đưa mẫu vào máy vừa phá mẫu và vừa đo. Phương pháp đã được thẩm định chặt chẽ về tính đặc hiệu, độ tuyến tính, độ chính xác, độ đúng, LOD, LOQ. Kết quả thẩm định cho thấy phương pháp đã xây dựng là phù hợp để định tính, định lượng thủy ngân trong kem và phấn lưu hành trên thị trường.

Tài liệu tham khảo

1. AOAC (1998), *Peer-Verified Methods Program, Manual on policies and procedures*, Arlington, Va., USA
2. ASEAN (2017), *The 27th Meeting of the ASEAN Cosmetic Committee (ACC), Annex II, VI*.
3. Bộ Y tế, (Cục Quản lý dược Việt Nam) (2015), *Công văn số 6577/QLD-MP về việc cập nhật qui định về các chất dùng trong mỹ phẩm*, ngày 13/4/2015.
4. Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương (2010), *Đảm bảo chất lượng thuốc và một số phương pháp kiểm nghiệm thuốc* (Tài liệu đào tạo nâng cao về kiểm nghiệm thuốc).
5. Peregrino, C. P.; Moreno, M. V.; Miranda, S. V.; Rubio, A. D.; Leal, L. O. (2011), *Mercury Levels in Locally Manufactured Mexican Skin-Lightening Creams*, Int. J. Environ. Res. Public Health.
6. WHO (2011), *Mercury in skin lightening products*.
7. Teledyne: Hydra II_c Extended Range Automated Direct Hg Analyzer (Operations Manual).

SUMMARY

A mercury measurement method by direct mercury machine was developed for identification and determination mercury in cosmetics.

Analysis conditions are as follows: Drying: 300°C/120s; Decomposition: 800°C/200s; Catalyst: 725°C/140s; Amalgamator: 750°C/60s.

The method was validated about the specificity, linear range (10 ng - 300 ng), precision (%RSD for cream: maximum 1.08%; for powder: maximum 6.1%), accuracy (% RSD for cream: 3.88% ; for powder: 5.61%), LOD (2.14 ng), LOQ (6.48 ng), and validation results proved that this method was suitable for determination of mercury in cosmetics.

(Ngày nhận bài: 19/11/2018; Ngày phản biện: 25/03/2019 ; Ngày duyệt đăng: 27/09/2019)

THẨM ĐỊNH QUY TRÌNH XÁC ĐỊNH HOẠT TÍNH ENZYM NATTOKINASE BẰNG PHƯƠNG PHÁP ĐO QUANG

NGUYỄN THỊ HẰNG, NGUYỄN THỊ LIÊN, TẠ MẠNH HÙNG
Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương

Từ khóa: Enzym, Nattokinase, xác định hoạt tính sinh học, phương pháp đo quang

1. Đặt vấn đề

Nattokinase là enzym có khả năng làm tan huyết khối, lần đầu tiên được chiết xuất và tinh chế từ Natto là một món ăn truyền thống của Nhật Bản làm từ những hạt đậu tương đã luộc chín lên men với vi khuẩn *Bacillus subtilis* var. *Natto*. Hiện nay Nattokinase đang được nghiên cứu chiết xuất từ nhiều cơ chất với các vi khuẩn lên men đa dạng hơn trong họ *Bacillus subtilis*. Nattokinase có hoạt tính tiêu fibrin mạnh mà không làm suy giảm cơ chế đông máu bình thường của cơ thể nên đã trở thành nguyên liệu để sản xuất nhiều chế phẩm phòng ngừa và điều trị bệnh lý về huyết khối. Hoạt tính ly giải fibrin làm tan huyết khối của nattokinase được xác định bằng nhiều phương pháp khác nhau dựa trên cơ chế: nattokinase trực tiếp giáng hóa fibrin làm biến đổi fibrin từ dạng polymer không tan thành các sản phẩm có trọng lượng phân tử thấp, hòa tan. Dựa vào trang thiết bị hiện có và tham khảo một số phương pháp định lượng hoạt tính nattokinase đã được công bố [1],[2],[4],[5] chúng tôi đã tiến hành thẩm định quy trình xác định hoạt tính enzym nattokinase trong nguyên liệu nattokinase bằng phương pháp đo quang.

2. Thực nghiệm

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

2.1.1. Thiết bị, dụng cụ

Các thiết bị được quản lý và hiệu chuẩn theo quy định của ISO/IEC 17025 và GLP bao gồm:

- Máy quang phổ UV-VIS (Shimadzu 2600, Nhật);
- Cân phân tích Sartorius CP224S (Thụy Sĩ, độ chính xác $d = 0,1$ mg);
- Máy ly tâm tốc độ cao (Sigma 2-16K, Đức);
- Bể ổn nhiệt Labec (Australia, độ chính xác $\pm 0,1^{\circ}\text{C}$);
- Dụng cụ: Bình định mức, bộ pipet tự động eppendorf, dụng cụ thủy tinh chính xác các loại, ống ly tâm,....

2.1.2. Hóa chất, dung môi, chất chuẩn

- Fibrinogen from bovine plasma, loại PA (Sigma);
- Thrombin from bovine plasma, loại PA (Sigma);
- Dinatri tetraborat, loại PA (Scharlau);
- Natri clorid, loại PA (VWR Chemicals Prolabo);
- Acid trichloroacetic, loại PA (Scharlau);

- Acid acetic băng, loại PA (Scharlau);
- Natri acetat, loại PA (Merck);
- Calci sulfat, loại PA (Sigma);
- Triton X-100, loại PA (Sigma);
- Acid hydrocloric, loại PA (Merck);
- Natri hydroxyd, loại PA (Scharlau);
- Chất chuẩn làm việc Nattokinase, ngày sản xuất: 01/03/2018, hàm lượng: 25.888 FU/g (nguyên trạng), nguồn gốc: Contek Life Science Co., Ltd.

2.2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Đối tượng nghiên cứu

- Mẫu thử: nguyên liệu nattokinase 12000 FU/g, lô sản xuất: NK-12K-17122601, nơi sản xuất: Công ty Cổ phần Sao Thái Dương.

2.2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.2.1. Chuẩn bị thuốc thử

- *Đệm borat 0,05 M pH 8,5*: Hòa tan 19,07 g dinatri tetraborat và 9,0 g natri clorid trong khoảng 900 ml nước RO. Điều chỉnh pH 8,5 bằng dung dịch HCl 0,1 N hoặc NaOH 0,1 N; sau đó thêm nước RO vừa đủ 1000 ml.

- *Dung dịch acid trichloroacetic (TCA) 0,2 M*: Hòa tan 32,68 g TCA trong vừa đủ 1000 ml nước RO.

- *Dung dịch Fibrinogen 0,72%*: Hòa tan fibrinogen trong đệm borat 0,05 M pH 8,5 đạt nồng độ 0,72% (kl/tt) (tính theo hàm lượng protein). *Chuẩn bị ngay trước khi dùng.*

- *Dung dịch Thrombin*: Hòa tan thrombin trong đệm borat 0,05 M pH 8,5 để đạt nồng độ 1000 đơn vị/ml, thu được dung dịch Thrombin gốc. Chia dung dịch này vào các ống nhỏ, bảo quản trong tủ đá. Trước khi sử dụng, lấy dung dịch này ra, để nguội về nhiệt độ phòng, sau đó pha loãng 50 lần bằng đệm borat 0,05 M pH 8,5.

- *Dung dịch acid acetic 1 M*: Hòa tan 60,1 g acid acetic băng trong nước RO vừa đủ 1000 ml.

- *Đệm acetat 1 M pH 6,0*: Hòa tan 129,6 g natri acetat trong nước RO, thêm 47,6 ml dung dịch acid acetic 1 M và thêm nước RO vừa đủ 1000 ml.

- *Dung dịch Triton X-100 10%*: Hòa tan 10 g Triton X-100 trong nước RO đã được làm ấm, để nguội về nhiệt độ phòng, thêm nước RO vừa đủ 100 ml.

- *Dung môi pha mẫu (dùng để pha loãng enzym)*: Hòa tan 0,344 g calci sulfat và 0,585 g natri clorid trong 800 ml nước cất. Thêm 2,0 ml dung dịch đệm acetat pH 6,0 và 0,5 ml dung dịch Triton X-100 10%; thêm nước RO vừa đủ 1000 ml (dung dịch này được sử dụng trong vòng 15 ngày khi bảo quản ở nhiệt độ phòng).

2.2.2.2. Phương pháp chuẩn bị mẫu

Chuẩn bị dung dịch thử: Hòa tan mẫu thử trong dung môi pha mẫu để thu được dung dịch thử có nồng độ nattokinase từ 0,8 - 1,2 đơn vị FU/ml.

2.2.2.3. Quy trình phân tích

<i>Ống dung dịch thử</i>	<i>Ống dung dịch đối chứng</i>
Hút 1,4 ml dung dịch đệm borat pH 8,5; thêm 0,4 ml dung dịch Fibrinogen 0,72%	
Đề ổn nhiệt ở $37 \pm 0,5^\circ\text{C}$ trong 5 phút	
Thêm 0,1 ml dung dịch thrombin và trộn đều. Đề ổn nhiệt ở $37 \pm 0,5^\circ\text{C}$ trong chính xác 10 phút	
- Thời điểm $t = 0$: thêm 0,1 ml dung dịch thử, trộn đều trong 5 giây và ủ ở $37 \pm 0,5^\circ\text{C}$. - Thời điểm $t = 20$ phút, 40 phút: trộn đều hỗn hợp phản ứng trong 5 giây. - Thời điểm chính xác $t = 60$ phút: thêm 2 ml dung dịch trichloroacetic 0,2 M để dừng phản ứng, trộn đều và ủ ở $37 \pm 0,5^\circ\text{C}$ trong 20 phút.	- Thời điểm $t = 0$: thêm 2 ml dung dịch trichloroacetic 0,2 M, trộn đều trong 5 giây. - Thêm 0,1 ml dung dịch thử, trộn trong 5 giây, ủ ở $37 \pm 0,5^\circ\text{C}$ trong 20 phút.
Chuyển hỗn hợp vào ống nghiệm nhỏ và đem ly tâm với tốc độ 12000 vòng/phút trong 10 phút, lấy phần dịch trong. Đo quang ở bước sóng 275 nm được lần lượt $A_{\text{thử}}$, $A_{\text{đối chứng}}$.	

2.2.2.4. Tính kết quả

Định nghĩa đơn vị hoạt lực nattokinase: Một đơn vị hoạt lực nattokinase (FU) được định nghĩa là lượng enzym có khả năng ly giải fibrin làm tăng độ hấp thụ ở 275 nm của sản phẩm thêm 0,01 đơn vị độ hấp thụ trong mỗi phút ở điều kiện quy định của phép thử định lượng.

Hàm lượng Nattokinase (số đơn vị FU/g) trong mẫu thử tính theo công thức:

$$X \text{ (đơn vị FU/g)} = \frac{(A_{\text{thử}} - A_{\text{đối chứng}})}{0,01 \times 0,1 \times 60} \times \frac{D_t}{m_t} \times 1000$$

Trong đó: $A_{\text{thử}}$: Độ hấp thụ của ống dung dịch thử
 $A_{\text{đối chứng}}$: Độ hấp thụ của ống dung dịch đối chứng
 D_t : Độ pha loãng của mẫu
 m_t : Lượng cân mẫu thử (mg)

2.2.2.5. Thẩm định phương pháp

Theo thủ tục Thẩm định/Đánh giá phương pháp phân tích trong dược điển và tiêu chuẩn cơ sở của Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương, lần lượt đánh giá các chỉ tiêu: khoảng nồng độ tuyến tính, tính thích hợp của hệ thống, tính đặc hiệu, độ đúng, độ chính xác [2].

3. Kết quả và bàn luận

3.1. Độ đặc hiệu

Dung dịch placebo: dung môi pha mẫu.

Dung dịch chuẩn: Hòa tan 113,5 mg chuẩn làm việc nattokinase trong vừa đủ 100 ml dung môi pha mẫu. Hút chính xác 1,0 ml dung dịch trên pha loãng đến vừa đủ 25 ml bằng dung môi pha mẫu, lắc đều.

Dung dịch thử: Cân chính xác khoảng 70 mg nguyên liệu nattokinase hòa tan trong dung môi pha mẫu, thêm đến vừa đủ 100 ml với cùng dung môi. Hút chính xác 1,0 ml dung dịch trên pha loãng đến vừa đủ 10 ml bằng dung môi pha mẫu, lắc đều.

Tiến hành xác định hoạt lực của nattokinase có trong dung dịch placebo, dung dịch chuẩn, dung dịch thử theo quy trình phân tích ở mục 2.2.2.3, kết quả được trình bày ở Bảng 1.

Bảng 1. Chênh lệch độ hấp thụ giữa dung dịch placebo/chuẩn/thử và dung dịch đối chứng tương ứng

STT	Dung dịch placebo				Dung dịch chuẩn (kết quả từ phần độ thích hợp của hệ thống)			Dung dịch thử (kết quả từ phần độ lặp lại)		
	Độ hấp thụ của dung dịch placebo	Độ hấp thụ của dung dịch đối chứng	Chênh lệch độ hấp thụ	% Ảnh hưởng	Độ hấp thụ của dung dịch chuẩn	Độ hấp thụ của dung dịch đối chứng	Chênh lệch độ hấp thụ	Độ hấp thụ của dung dịch thử	Độ hấp thụ của dung dịch đối chứng	Chênh lệch độ hấp thụ
1	0,0752	0,0756	-0,0004	0,026	0,1453	0,0745	0,0708	0,1317	0,0758	0,0559
2	0,0758	0,0762	-0,0004	0,026	0,1464	0,0739	0,0725	0,1320	0,0762	0,0558
3	0,0759	0,0758	0,0001	0,014	0,1459	0,0739	0,0720	0,1333	0,0759	0,0574
4	0,0790	0,0784	0,0006	0,038	0,1440	0,0740	0,0700	0,1349	0,0765	0,0584
5	0,0779	0,0779	0,0000	0,000	0,1442	0,0736	0,0706	0,1372	0,0764	0,0608
6	0,0749	0,0755	-0,0006	0,038	0,1441	0,0738	0,0703	0,1388	0,0740	0,0648
% Ảnh hưởng trung bình				0,02						

Kết quả thể hiện ở Bảng 1 cho thấy:

- Dung dịch placebo: Sự chênh lệch độ hấp thụ giữa dung dịch placebo và dung dịch đối chứng của placebo không đáng kể.

- Dung dịch thử/chuẩn: Sự chênh lệch độ hấp thụ giữa dung dịch thử/chuẩn và dung dịch đối chứng của mẫu thử/chuẩn khác biệt rõ rệt.

- Ảnh hưởng của mẫu placebo là 0,02% (đạt yêu cầu < 2%)

Như vậy phương pháp có tính đặc hiệu cao để định lượng nattokinase.

3.2. Tính thích hợp của hệ thống

Tiến hành xác định hoạt lực của dung dịch chuẩn nattokinase được chuẩn bị ở phần độ đặc hiệu theo quy trình phân tích ở mục 2.2.2.3. Ghi lại độ hấp thụ của 6 lần đo, kết quả thể hiện ở Bảng 2.

Bảng 2. Kết quả khảo sát tính thích hợp của hệ thống

Stt	Độ hấp thụ của dung dịch chuẩn	Độ hấp thụ của dung dịch đối chứng	Chênh lệch độ hấp thụ
1	0,1453	0,0745	0,0708
2	0,1464	0,0739	0,0725
3	0,1459	0,0739	0,0720
4	0,1440	0,0740	0,0700
5	0,1442	0,0736	0,0706
6	0,1441	0,0738	0,0703
Chênh lệch độ hấp thụ trung bình = 0,071; n = 6; RSD = 1,40%			

Kết quả cho thấy hệ thống quang phổ có độ lặp lại tốt với RSD của chênh lệch độ hấp thụ là 1,40% (< 2,0%). Như vậy hệ thống sử dụng phù hợp cho việc xác định hoạt lực nattokinase trong các chế phẩm có chứa enzym này

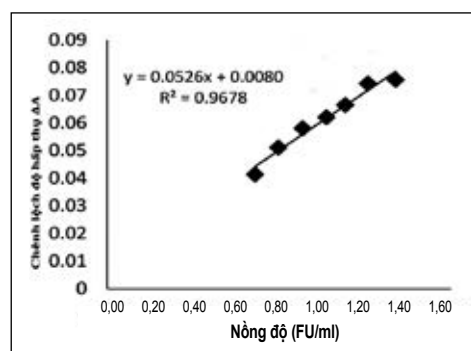
3.3. Khảo sát khoảng tuyến tính

Dung dịch nattokinase chuẩn gốc: Hòa tan 98,6 mg chất chuẩn nattokinase (25888 FU/g nguyên trạng) trong 100 ml dung môi pha mẫu. Hút chính xác 1,0 ml dung dịch trên pha loãng bằng dung môi pha mẫu đến vừa đủ 10 ml.

Từ dung dịch chuẩn gốc tiến hành pha loãng với dung môi pha mẫu để thu được dãy dung dịch chuẩn có nồng độ: 0,69; 0,80; 0,91; 1,02; 1,11; 1,22 và 1,34 FU/ml. Tiến hành các bước theo quy trình phân tích ở mục 2.2.2.3. Kết quả thể hiện ở Bảng 3 và Hình 1.

Bảng 3. Khảo sát độ tuyến tính của phương pháp

STT	Nồng độ (đơn vị FU/ml)	Chênh lệch độ hấp thụ
1	0,69	0,0413
2	0,80	0,0511
3	0,91	0,0580
4	1,02	0,0620
5	1,11	0,0665
6	1,22	0,0743
7	1,34	0,0756
Phương trình hồi quy: $y = 0,0526x + 0,0080$; $r = 0,9838$		



Hình 1. Đồ thị biểu diễn sự phụ thuộc giữa nồng độ nattokinase và chênh lệch độ hấp thụ

Khảo sát sự tương quan giữa y (chênh lệch độ hấp thụ) và x (nồng độ) bằng phương pháp bình phương cực tiểu, kết quả cho thấy hệ số $r^2 = 0,9678$ ($\rightarrow r = 0,9838 > 0,98$) chứng tỏ có sự tương quan tuyến tính chặt chẽ giữa nồng độ nattokinase và chênh lệch độ hấp thụ.

3.4. Độ đúng

Xác định độ đúng của phương pháp bằng cách xác định hoạt lực của các dung dịch nattokinase chuẩn ở các mức nồng độ 0,8 đơn vị FU/ml; 1,0 đơn vị FU/ml và 1,2 đơn vị FU/ml theo quy trình phân tích ở mục 2.2.2.3. Tại mỗi mức nồng độ, thực hiện ít nhất 03 mẫu độc lập. Độ đúng của phương pháp là tỷ lệ % giữa nồng độ xác định được so với nồng độ lý thuyết. Kết quả thể hiện ở Bảng 4.

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

Stt	Lượng cân chuẩn (mg)	Nồng độ lý thuyết (FU/ml)	Độ hấp thụ của dung dịch chuẩn	Độ hấp thụ của dung dịch đối chứng	Chênh lệch độ hấp thụ	Nồng độ thực tế (FU/ml)	% Thu hồi	% Thu hồi trung bình
1	75,2	0,7777	0,1250	0,0797	0,0453	0,7550	97,1	TB = 98,5% RSD = 1,69%
2	76,2	0,7891	0,1226	0,0762	0,0464	0,7733	98,0	
3	79,1	0,8191	0,1228	0,0735	0,0493	0,8217	100,3	
4	100,3	1,0386	0,1355	0,0727	0,0628	1,0467	100,8	TB = 96,4% RSD = 3,94%
5	98,1	1,0158	0,1357	0,0783	0,0574	0,9567	94,2	
6	99,2	1,0272	0,1300	0,0720	0,0580	0,9667	94,1	
7	119,4	1,2364	0,1476	0,0772	0,0704	1,1733	94,9	TB = 95,3% RSD = 1,10%
8	120,1	1,2437	0,1480	0,0775	0,0705	1,1750	94,5	
9	121,8	1,2613	0,1464	0,0734	0,0730	1,2167	96,5	
% Thu hồi trung bình = 96,7%; n = 9; RSD = 2,66%								

Kết quả thu được trong Bảng 4 cho thấy phương pháp có độ đúng cao với khả năng thu hồi từ 94,1% đến 100,8% và RSD = 2,66% (nằm trong giới hạn cho phép về thẩm định phương pháp phân tích các hoạt chất sinh học).

3.5. Khoảng xác định

Từ kết quả độ đúng, độ tuyến tính suy ra khoảng xác định của phương pháp là trong giới hạn từ 0,7777 FU/ml đến 1,2613 FU/ml.

3.6. Độ chính xác

3.6.1. Độ lặp lại

Dung dịch thử: Cân chính xác khoảng 70 mg mẫu thử nattokinase hòa tan trong dung môi pha mẫu đến vừa đủ 100 ml. Hút chính xác 1,0 ml dung dịch trên pha loãng với dung môi pha mẫu đến vừa đủ 10 ml (chuẩn bị 06 dung dịch thử). Tiến hành xác định hoạt lực của nattokinase theo quy trình phân tích ở mục 2.2.2.3. Kết quả được thể hiện ở Bảng 5.

Kết quả cho thấy phương pháp xác định hoạt lực nattokinase có độ lặp lại tốt với RSD = 3,92% (< 10%); có thể áp dụng để xác định hoạt lực nattokinase trong các chế phẩm có chứa enzym này.

3.6.2. Độ chính xác trung gian

Tiến hành xác định hoạt lực mẫu thử vào một ngày khác, bởi một kiểm nghiệm viên khác (KNV2). Cách tiến hành như phần độ lặp lại. Kết quả thể hiện trong Bảng 5.

Bảng 5. Kết quả khảo sát độ lặp lại và độ chính xác trung gian

TT	Ngày 1, KNV1					Ngày 2, KNV2				
	Lượng cân mẫu thử (mg)	Độ hấp thụ của dung dịch thử	Độ hấp thụ của dung dịch đối chứng	Chênh lệch độ hấp thụ	Kết quả xác định hoạt lực nattokinase (đơn vị FU/g)	Lượng cân mẫu thử (mg)	Độ hấp thụ của dung dịch thử	Độ hấp thụ của dung dịch đối chứng	Chênh lệch độ hấp thụ	Kết quả xác định hoạt lực nattokinase (đơn vị FU/g)
1	65,8	0,1317	0,0758	0,0559	14159,1	67,1	0,1358	0,0771	0,0587	14580,2
2	68,0	0,1320	0,0762	0,0558	13676,5	67,8	0,1365	0,0786	0,0579	14233,0
3	73,0	0,1333	0,0759	0,0574	13105,0	70,2	0,1368	0,0771	0,0597	14173,8
4	74,5	0,1349	0,0765	0,0584	13064,9	72,5	0,1378	0,0803	0,0575	13218,4
5	74,5	0,1372	0,0764	0,0608	13601,8	73,5	0,1377	0,0757	0,0620	14059,0
6	75,1	0,1388	0,074	0,0648	14380,8	74,5	0,1340	0,0753	0,0587	13132,0
Hoạt lực trung bình = 13664,7 FU/g; n = 6; RSD = 3,92%						Hoạt lực trung bình = 13899,4 FU/g; n = 6; RSD = 4,23%				
Hoạt lực trung bình = 13782,0 FU/g; n = 12; RSD = 3,99%										

Kết quả cho thấy phương pháp xác định hoạt lực của nattokinase có độ chính xác cao với độ lặp lại trong ngày là 3,92% và 4,23% (n = 6), độ lặp lại khác ngày là 3,99% (n = 12).

4. Kết luận

Các kết quả thực nghiệm cho thấy quy trình xác định hoạt lực enzym nattokinase bằng phương pháp đo quang có độ đặc hiệu, độ chính xác và độ đúng nằm trong giới hạn cho phép về thẩm định phương pháp phân tích các hoạt chất sinh học, có sự tương quan tuyến tính chặt chẽ giữa nồng độ enzym đem phản ứng và chênh lệch độ hấp thụ của hỗn hợp enzym cơ chất sau phản ứng trong khoảng nồng độ khảo sát. Mặc dù quy trình xác định hoạt lực enzym nattokinase bằng phương pháp đo quang được phát triển ở Nhật, nhưng yêu cầu về điều kiện trang thiết bị và hóa chất phù hợp với điều kiện phòng thí nghiệm tại Việt Nam. Với các kết quả thu được chúng tôi nhận thấy có thể áp dụng phương pháp đã nêu ở trên để xác định hoạt lực của nattokinase trong các chế phẩm có chứa enzym này.

Tài liệu tham khảo

1. Nguyễn Thị Bình (2010), *Nghiên cứu hoạt tính tiêu fibrin của Nattokinase từ đậu tương lên men*, khóa luận tốt nghiệp Dược sĩ khóa 2001-2006, Trường Đại học Dược Hà Nội.
2. Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương (2016), *Thủ tục thẩm định/Đánh giá phương pháp phân tích trong Dược điển và tiêu chuẩn cơ sở* (Phương pháp chuyển giao).
3. Masada M. (2004), "Determination of the Thrombolytic Activity of Natto Extract", *Food Style*. 8(1),92-95.
4. Takano A., Hirata A., Ogasawara K., Sagara N., Inomata Y., Kawaji T., and Tanihara H. (2006), "Posterior Vitreous Detachment Induced by Nattokinase (Subtilisin NAT): A Novel Enzyme for Pharmacologic Vitreolysis", *IOVS*, 47(5), 2075-2079.
5. Zu x., Zang Z., Yang y., Che H., Zang G. & Li J.(2010), "Thrombolytic Activities of Nattokinase Extracted from Bacillus Subtilis Fermented Soybean Curd Residues", *International Journal of Biology*, 2(2), 120-125.

SUMMARY

In this study, nattokinase is a fibrinolytic enzyme, was determined by using fibrin digestion method. The degradation product is measured by its ultraviolet absorbance at 275 nm. The method was validated for the linearity, system suitability, specificity, precision and intermediate accuracy. Validation results proved that the method is suitable for determination of the bioactivity of nattokinase.

(Ngày nhận bài: 15/11/2018 ; Ngày phản biện: 08/07/2019 ; Ngày duyệt đăng: 27/09/2019)

PHÂN BIỆT DƯỢC LIỆU BẠCH HOA XÀ THIẾT THẢO VÀ DƯỢC LIỆU ĐỂ NHẦM LẤN CỎ LƯỠI RẮN

VŨ TRỌNG KHOA, TRẦN THỊ THU TRANG, BẠCH THỊ THẨM, NGUYỄN TUẤN ANH
Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương

Từ khóa: Bạch hoa xà thiết thảo, Cỏ lười rắn, rutin, dấu vân tay sắc ký

1. Đặt vấn đề

Dược liệu Bạch hoa xà thiết thảo (*Herba hedyotis diffusae*) là toàn cây phơi hay sấy khô của cây Bạch hoa xà thiết thảo [*Hedyotis diffusa* (Willd.), họ Cà phê (Rubiaceae)], được sử dụng rộng rãi từ thời Danh y Tuệ Tĩnh có tác dụng thanh nhiệt giải độc, lợi niệu thông lâm, tiêu ung tán kết. Chủ trị: Ho, hen suyễn do phế thực nhiệt, lâm lậu do bàng quang thấp nhiệt, viêm amidan, viêm họng cấp,... [2]. Dược liệu Bạch hoa xà thiết thảo (BHXTT) có nhiều đặc điểm giống với một loài khác cùng chi là Cỏ lười rắn (*Hedyotis corymbosa* (L.) Lam.) về mô tả bên ngoài: Cây thảo dài 20-30 cm, nhiều cành, lá hình mác mọc đối, hoa trắng,... cũng như một số thành phần hóa học chính như các osid, acid oleanolic, acid asperulosidic,...[5],[6],[7]. Và hiện nay trên thị trường đang có hiện tượng nhầm lẫn khi mua bán, sử dụng hai

loài này. Vì vậy, chúng tôi tiến hành nghiên cứu phân biệt hai dược liệu này nhằm tăng cường công tác kiểm tra và quản lý chất lượng dược liệu Bạch hoa xà thiết thảo.

2. Thực nghiệm

2.1. Thiết bị, hóa chất, chất chuẩn

2.1.1. Thiết bị, dụng cụ

Các thiết bị, dụng cụ của Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương (Đã được hiệu chuẩn theo yêu cầu của GLP và ISO/IEC 170125) gồm:

- Máy sắc ký lỏng hiệu năng cao Hitachi với detector DAD.
- Cân phân tích Melter Toledo AB-2S, độ chính xác 0,1 mg.
- Cột RP18 Inertsil ODS-3 (250 x 4,6 mm; 5 µm).

- Các dụng cụ thủy tinh cần thiết cho quá trình thực nghiệm.

2.1.2. Hóa chất, dung môi, chất chuẩn

- Chất chuẩn Rutin, SKS: QT152 050417, hàm lượng: 88,2% (nguyên trạng), nguồn gốc: Viện Kiểm nghiệm thuốc Thành phố Hồ Chí Minh;

- Acid acetic (PA; Prolabo);
- Acid formic (PA; Scharlau);
- Ethyl acetat (PA; Prolabo);
- Methanol (HPLC; Merck);
- Acetonitril (HPLC; Merck);
- Acid phosphoric (PA; Scharlau);
- Nước RO (Viện KNTTW).

2.2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Đối tượng nghiên cứu

Mẫu Cỏ lười rần (2017DT01.B1) và mẫu Bạch hoa xà thiệt thảo (2017DT01.B2) do Bộ môn Thực vật - Trường Đại học Dược Hà Nội định danh và cung cấp.

2.2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.2.1. Phương pháp phân tích các đặc điểm vi phẫu, bột

Phương pháp phân tích vi phẫu, soi bột: Tiến hành theo ĐDVN V - Phụ lục 12.18.

2.2.2.2. Phương pháp sắc ký lớp mỏng

- **Bản mỏng:** Silica gel 60 F₂₅₄ (Merck), hoạt hóa ở 100°C trong 30 phút.

- **Dung môi khai triển:** Ethyl acetat - acid acetic - acid formic - nước (100 : 11 : 11 : 26; tt/tt).

- **Thuốc thử hiện vết:**

+ Thuốc thử (1): Dung dịch 2-aminoethyl diphenylborinat trong methanol nồng độ 10 mg/ml.

+ Thuốc thử (2): Dung dịch PEG 400 trong methanol nồng độ 50 mg/ml.

- **Dung dịch thử:** Lấy 1 g bột dược liệu, thêm 20 ml methanol, đun sôi hồi lưu trên cách thủy 1 giờ, lọc. Cô dịch lọc trên cách thủy đến cạn. Hòa tan cặn trong 1 ml methanol thu được dung dịch chấm sắc ký.

- **Dung dịch đối chiếu:** Hòa tan chất chuẩn rutin trong methanol để thu được dung dịch có nồng độ khoảng 1 mg/ml.

- **Tiến hành:** Chấm riêng biệt lên bản mỏng 6 µl mỗi dung dịch thử và dung dịch đối chiếu. Triển khai sắc ký cho đến khi dung môi đi được khoảng 10 - 12 cm, lấy bản mỏng ra, để khô bản mỏng ở nhiệt độ phòng, sấy bản mỏng ở 110 °C trong 5 phút, phun thuốc thử (1), sau đó phun ngay thuốc thử (2). Để khô bản mỏng, quan sát

bản mỏng dưới đèn tử ngoại ở bước sóng 366 nm.

2.2.2.3. Phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao

- Cột RP18 Inertsil ODS-3 (250 x 4,6 mm; 5 µm).

- Pha động:

+ **Dung môi A:** Acetonitril.

+ **Dung môi B:** Dung dịch acid phosphoric 0,1%.

Chương trình dung môi:

Thời gian (phút)	% A (tt/tt)	% B (tt/tt)
0 → 50	18	82
50 → 51	18 → 40	82 → 60
51 → 60	40	60
60 → 61	40 → 18	60 → 82
61 → 70	18	82

- Tốc độ dòng: 1,0 ml/phút.

- Detector DAD ở bước sóng 360 nm.

- Thể tích tiêm: 20 µl.

Chuẩn bị các dung dịch:

- **Dung dịch thử:** Cân chính xác khoảng 1,000 g bột dược liệu, thêm chính xác 20 ml methanol, đun sôi hồi lưu trong cách thủy 1 giờ, để nguội, lọc, cô trên cách thủy đến cạn. Hòa tan cặn bằng 3 ml methanol, lọc qua màng 0,45 µm thu được dung dịch tiêm sắc ký.

- **Dung dịch chuẩn:** Hòa tan rutin chuẩn trong methanol để được dung dịch chuẩn có nồng độ chính xác khoảng 50 µg/ml.

Tiêm riêng biệt 20 µl mỗi dung dịch chuẩn và dung dịch thử vào hệ thống sắc ký. Tiến hành sắc ký theo điều kiện đã nêu, ghi lại sắc ký đồ của dung dịch chuẩn và dung dịch thử.

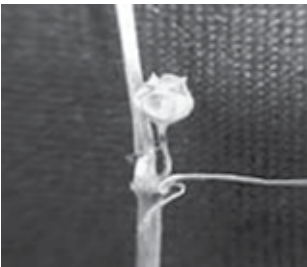
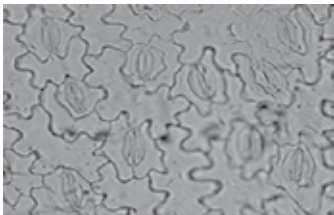
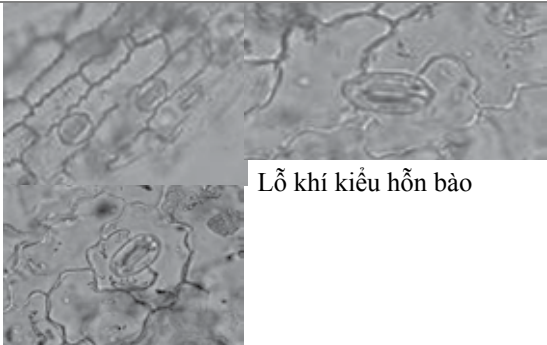
3. Kết quả và bàn luận

Phân biệt dược liệu Bạch hoa xà thiệt thảo và Cỏ lười rần: Từ dữ liệu thu được khi tiến hành phân tích các đặc điểm về hình thái, soi bột, và thành phần hóa học của mẫu Bạch hoa xà thiệt thảo và Cỏ lười rần, chúng tôi tổng hợp được các điểm khác biệt của 2 loài như sau:

3.1. Đặc điểm hình thái, soi bột

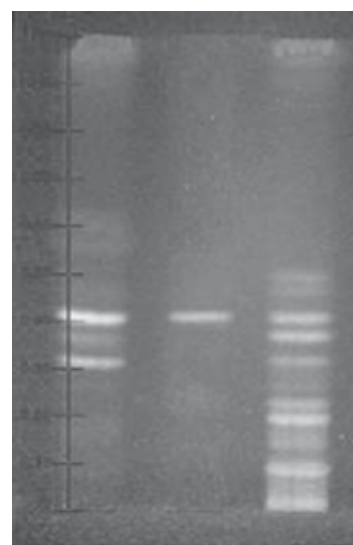
Quan sát hình thái dược liệu tươi và dược liệu khô của hai mẫu nghiên cứu BHXTT và Cỏ lười rần cho thấy, BHXTT có hoa mọc đơn độc hoặc đôi ở nách lá trong khi Cỏ lười rần có cụm hoa (2-5 hoa) mọc kẽ lá. Các đặc điểm soi bột BHXTT có tế bào lỗ khí kiểu song bào trong khi Cỏ lười rần tế bào lỗ khí kiểu trực bào và hỗn bào. Kết quả thể hiện ở Bảng 1.

Bảng 1. Bảng tập hợp các đặc điểm khác biệt về hình thái và soi bột của BHXTT và Cỏ lười rắn

Đặc điểm	Mẫu BHXTT	Mẫu Cỏ lười rắn
Cây tươi		
Dược liệu	 Hoa mọc đơn hoặc đôi ở nách lá	 Cụm hoa mọc kẽ lá 2-5 hoa
Soi bột	 Lỗ khí kiểu song bào	 Lỗ khí kiểu hỗn bào Lỗ khí kiểu trực bào

3.2. Sắc ký lớp mỏng

Kết quả định tính sắc ký lớp mỏng ở Bảng 2 và Hình 1 cho thấy BHXTT và Cỏ lười rắn cho một số vết có cùng vị trí, màu sắc và đều có một vết màu vàng có R_f (0,41) tương ứng với vết Rutin. Ngoài ra, BHXTT có các vết màu xanh với R_f (0,32 - 0,55 - 0,59) khác biệt so với Cỏ lười rắn, trong khi Cỏ lười rắn có các vết màu vàng với R_f (0,09 - 0,14 - 0,26 - 0,49) khác biệt so với BHXTT.



BHXTT Rutin Cỏ lười rắn

Hình 1. Sắc ký lớp mỏng BHXTT và Cỏ lười rắn.

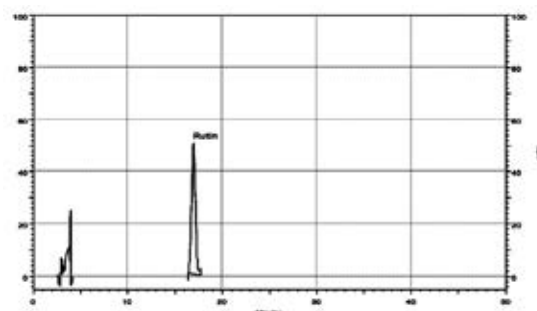
Bảng 2. Bảng tổng hợp kết quả sắc ký lớp mỏng của BHXTT và Cỏ lười rắn.

STT	Vị trí vết (R_f)	Màu sắc	BHXTT	Rutin	Cỏ lười rắn
1	0,09	Vàng			+++
2	0,14	Vàng			++
3	0,20	Vàng	+		+++
4	0,22	Vàng	+		+++
5	0,26	Vàng			+
6	0,31	Vàng	+++		+++
7	0,32	Xanh dương	+		
8	0,36	Vàng	+++		+++
9	0,41	Vàng	+++	+++	+++
10	0,46	Vàng	+		++
11	0,49	Vàng			++
12	0,50	Xanh dương	+		++
13	0,55	Xanh dương	++		
14	0,59	Xanh dương	++		
15	0,89	Xanh dương	++		++

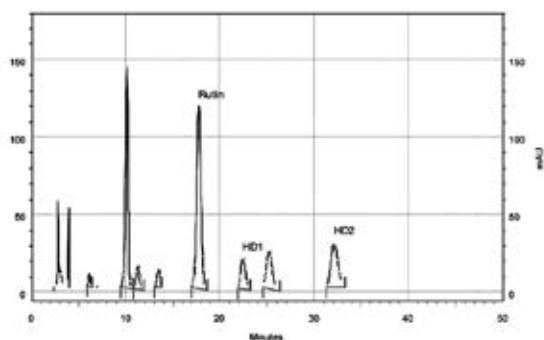
3.3. Sắc ký lỏng hiệu năng cao

Kết quả phân tích đặc điểm hóa học bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) được thể hiện ở Hình 2, Hình 3 và Hình 4.

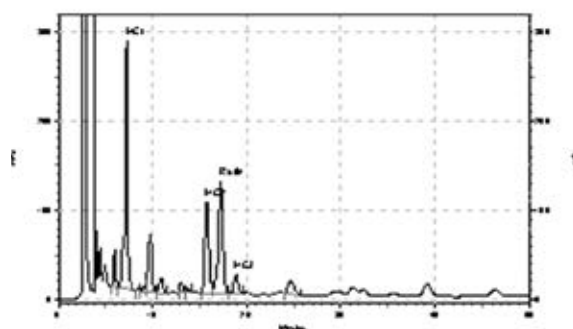
Sắc ký đồ HPLC của hai mẫu Bạch hoa xà thiệt thảo và Cỏ lười rắn cho các pic tách rõ ràng, và đều có pic Rutin (có t_R khoảng 17,2 phút). Ngoài các pic trùng nhau, thì trên sắc ký đồ của cả 2 mẫu BHXTT và Cỏ lười rắn đều cho các pic khác nhau thể hiện trong Bảng 3.



Hình 2. Sắc ký đồ mẫu chuẩn Rutin



Hình 3. Sắc ký đồ mẫu Bạch hoa xà thiệt thảo



Hình 4. Sắc ký đồ mẫu Cỏ lười rắn

Bảng 3. Bảng so sánh các pic trên sắc ký đồ HPLC mẫu BHXTT và Cỏ lười rắn

STT	Thời gian lưu tương đối (RRT)	Tên pic đánh dấu		
		Rutin	BHXTT	Cỏ lười rắn
1	0,4			HC1
2	0,9			HC2
3	1,0	Rutin	Rutin	Rutin
4	1,1			HC3
5	1,3		HD1	
6	1,9		HD2	

Ghi chú: Pic HD, HC là các pic khác biệt của 2 mẫu BHXTT và Cỏ lười rắn.

Kết quả phân tích bằng phương pháp HPLC cho thấy, trên sắc ký đồ hai mẫu BHXTT và Cỏ lười rắn mỗi mẫu đều cho các pic đặc trưng khác biệt nhau. Mẫu BHXTT có hai pic HD1 (Thời gian lưu tương đối RRT = 1,3) và HD2 (RRT = 1,9). Mẫu Cỏ lười rắn có ba pic HC1 (RRT = 0,4), HC2 (RRT = 0,9) và pic HC3 (RRT = 1,1). Từ đó có thể làm cơ sở để phân biệt được liệu BHXTT và Cỏ lười rắn bằng phương pháp HPLC.

4. Kết luận

Nghiên cứu đã chỉ ra được các điểm khác biệt về hình thái, bột, thành phần hóa học để phân biệt được liệu Bạch hoa xà thiệt thảo và Cỏ lười rắn. Kết quả có ý nghĩa trong việc xác định chính xác được liệu Bạch hoa xà thiệt thảo đang được lưu hành và sử dụng hiện nay, đồng thời góp phần xây dựng tiêu chuẩn và bộ dữ liệu chuẩn cho hai dược liệu Bạch hoa xà thiệt thảo và Cỏ lười rắn.

Tài liệu tham khảo

1. Bộ môn dược liệu, Trường Đại học Dược Hà Nội (2007), *Bài giảng dược liệu*, tập 1, Nhà xuất bản Y học.
2. Bộ Y tế (2017), *Dược điển Việt Nam V*, Nhà xuất bản Y học.
3. Bộ Y tế (2009), *Nghiên cứu phát triển bộ dữ liệu chuẩn của một số dược liệu thường dùng phục vụ công tác kiểm tra giám sát chất lượng dược liệu và thuốc đông dược*, Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương, Hà Nội.
4. Bộ Y tế (2006), *Nghiên cứu tiêu chuẩn hóa dược liệu bằng sắc ký lỏng cao áp với kỹ thuật điểm chỉ vân tay*, Viện Dược liệu, Hà Nội.
5. Đỗ Tất Lợi (1999), *Những cây thuốc và vị thuốc Việt Nam*, Nhà xuất bản Y học.
6. Trần Công Khánh (2005), Xác định hai loài Cỏ lười rắn (*Hedyotis corymbosa* (L.) Lam.) và Lười rắn hoa trắng (*Hedyotis diffusa* Willd.) ở Việt Nam, *Tạp chí dược học* 10/2005.
7. Viện Dược liệu (2006), *Cây thuốc và động vật làm thuốc ở Việt Nam*, Nhà xuất bản Khoa học và kỹ thuật Hà Nội.
8. Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương (2016), *Nhận biết và xác định dấu vân tay sắc ký của một số dược liệu thường dùng*, Nhà xuất bản Giáo dục Việt Nam.
9. Chinese Pharmacopoeia Commission, *Pharmacopoeia of the People's Republic of China* (2015).
10. Hildebert Wagner, Rudolf Bauer, Dieter Melchart, Pei-Gen Xiao, Anton Staudinger, *Chromatographic Fingerprint Analysis of Herbal Medicines: Thin-layer and High Performance Liquid Chromatography of Chinese Drugs* vol 3, Springer - 2015.
11. Hong Kong Chinese Materia Standards, Department of Health, *The Government of Hong Kong Special Administrative Region*.

SUMMARY

A data, include: Description, powder, thin-layer chromatography and high-performance liquid chromatography was established to distinguish and compare *Herba Hedyotis diffusa* and *Herba Hedyotis corymbosa*. The results are useful to determine *Herba Hedyotis diffusa* and establish specifications as well as complete data of *Herba Hedyotis diffusa* and *Herba Hedyotis corymbosa*.

(Ngày nhận bài: 20/11/2018 ; Ngày phản biện: 15/12/2018 ; Ngày duyệt đăng: 05/07/2019)

BỘ DỮ LIỆU HÌNH ẢNH SOI BỘT VÀ SẮC KÝ LỚP MỎNG CỦA 5 DƯỢC LIỆU CHUẨN ĐỂ THAM KHẢO ĐỐI CHIẾU TRONG KIỂM NGHIỆM DƯỢC LIỆU

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

Từ khóa: Soi bột, sắc ký lớp mỏng, Mộc hương, Bạch truật, Cam thảo, Mạch môn, Ba kích

1. Đặt vấn đề

Để kiểm tra chất lượng dược liệu cũng như các chế phẩm có nguồn gốc từ dược liệu, vấn đề dược liệu chuẩn có ý nghĩa rất quan trọng. Vì vậy, chúng tôi xây dựng bộ hình ảnh soi bột và sắc ký lớp mỏng của một số dược liệu chuẩn theo Dược điển Việt Nam V [1],[2], nhằm cung cấp bộ dữ liệu chuẩn có ý nghĩa thiết thực trong công tác kiểm tra chất lượng dược liệu.

2. Thực nghiệm

2.1. Thiết bị, hóa chất

- Kính hiển vi MBL 2000 - T - PL - 30W;
- Máy ảnh kỹ thuật số Sony 16.1;
- Các hóa chất đạt tinh khiết phân tích;
- Các dụng cụ thủy tinh cần thiết.

2.2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Đối tượng nghiên cứu

Dược liệu chuẩn: Mộc hương, Bạch truật, Cam thảo, Mạch môn, Ba kích của Viện Kiểm nghiệm thuốc

Trung ương và Viện Kiểm nghiệm thuốc thành phố Hồ Chí Minh.

2.2.2. Phương pháp nghiên cứu

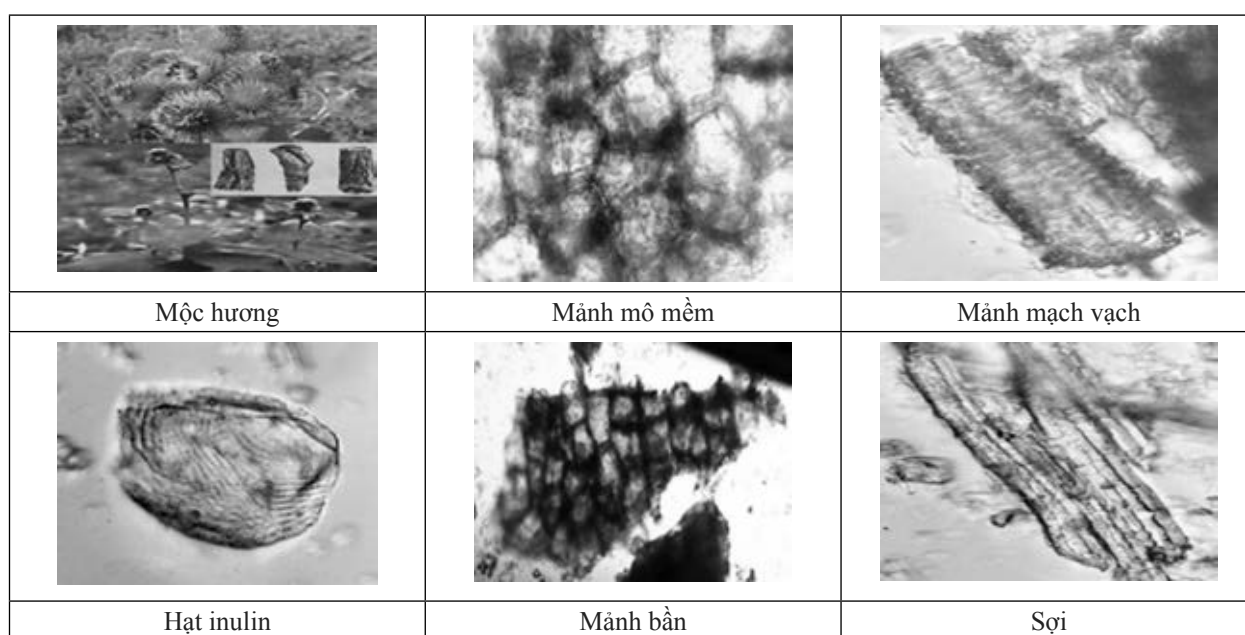
Soi bột: Tiến hành theo Dược điển Việt Nam V, bột dược liệu chuẩn được nghiền và rây qua rây có kích thước lỗ rây 25 μ m. Quan sát bằng kính hiển vi MBL 2000 - T - PL - 30W.

Sắc ký lớp mỏng: Tiến hành theo Dược điển Việt Nam V.

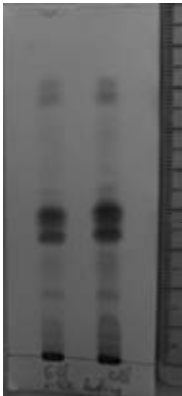
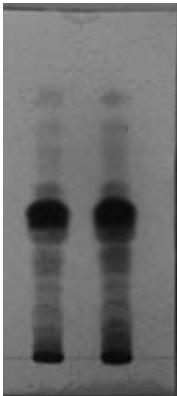
3. Kết quả và bàn luận

3.1. Dược liệu Mộc hương

Bột màu vàng nâu, soi kính hiển vi thấy: Mảnh bản màu nâu vàng. Mảnh mô mềm chứa những hạt inulin màu hơi vàng, mảnh mạch vạch, mạch xoắn và mạch mạng. Sợi hợp thành từng bó hoặc đứng riêng lẻ, túi tiết tinh dầu hình tròn, chứa chất tiết màu vàng. Ngoài ra có nhiều hạt inulin hình khối, hình chuông, màu hơi vàng, có vân mờ, có kích thước khác nhau, Hình 1.



Hình 1. Hình ảnh soi bột dược liệu Mộc hương

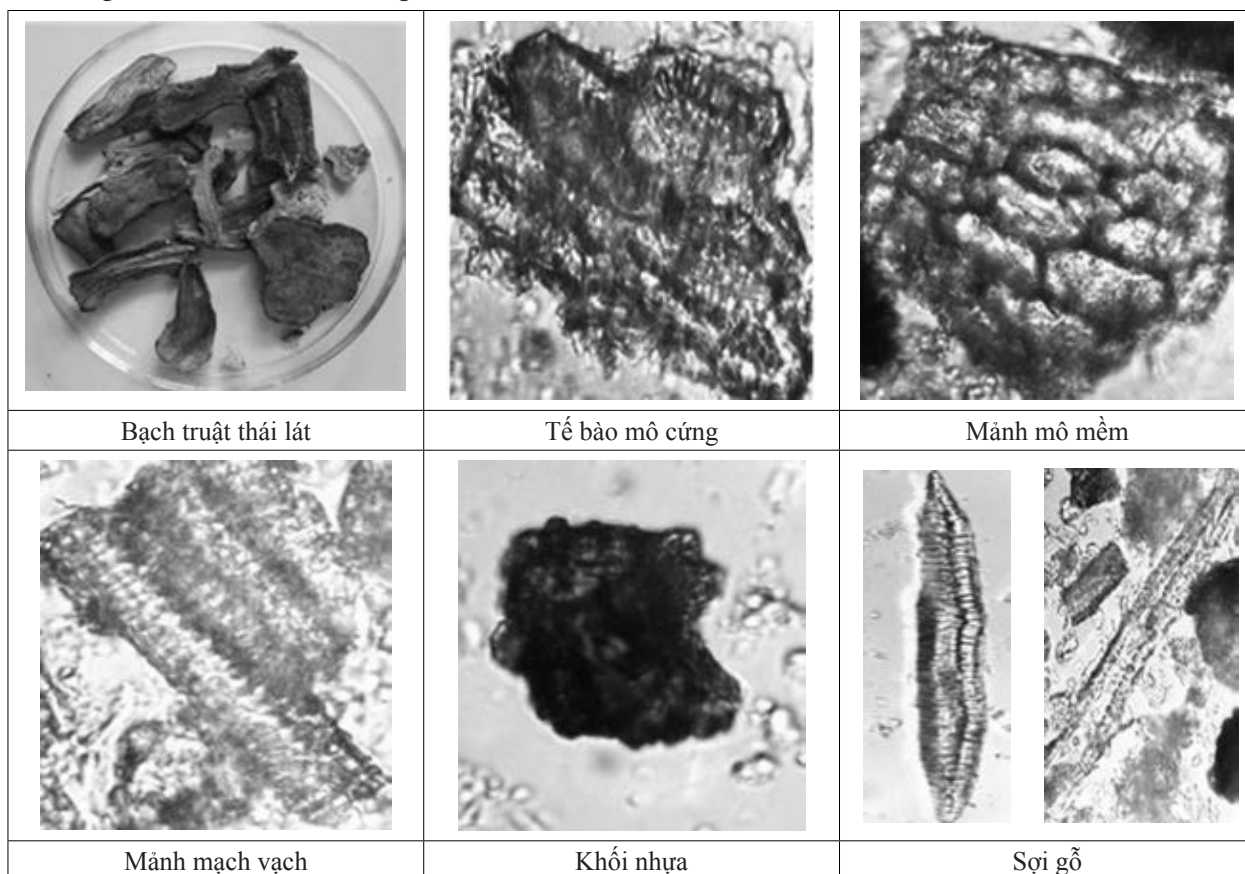
Dung môi khai triển	Soi UV 254	Soi UV 366	Phun Anisaldehyd+acid acetic+methanol+ acid sulfuric	Phun Vanilin 1%/ acid sulfuric
Toluen - ethyl acetat (95:5)			 $R_f=0,4$	

Hình 2. Hình ảnh sắc ký đồ dược liệu Mộc hương (phương pháp SKLM)

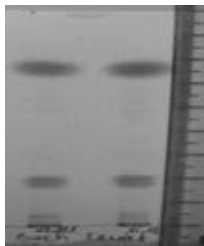
3.2. Dược liệu Bạch truật

Bột có màu vàng nâu, mùi thơm đặc trưng.

Soi kính hiển vi thấy: Mảnh bản gồm những tế bào hình nhiều cạnh, thành dày. Tế bào mô cứng hình nhiều cạnh, thành dày, có lỗ trao đổi. Mảnh mô mềm chứa tinh thể calci oxalat hình cầu gai và có các khoang chứa tinh dầu có màu nâu đến nâu vàng. Tinh thể calci oxalat hình kim có đầu nhọn nằm riêng rẽ hay thành đám. Mảnh mạch vạch, mạch mạng. Khối nhựa màu nâu vàng.



Hình 3. Hình ảnh soi bột dược liệu Bạch truật

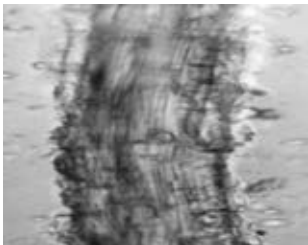
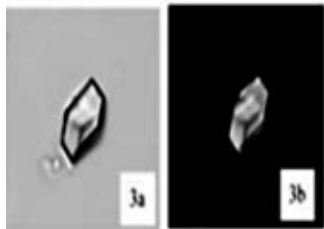
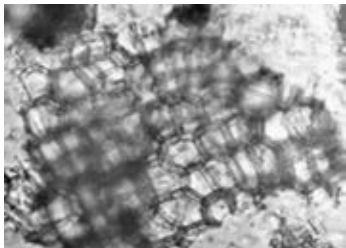
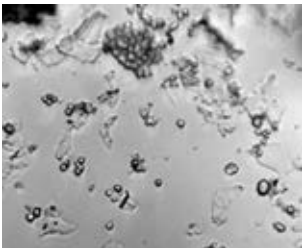
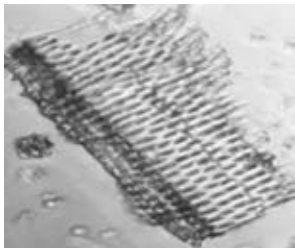
Dung môi khai triển	Phun Vanilin 1% trong acid sulfuric
Ether dầu hỏa (30°C-60°C) - ethyl acetat (50:1)	

Hình 4. Hình ảnh sắc ký đồ dược liệu Bạch truật (phương pháp SKLM)

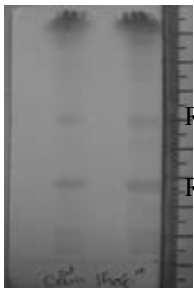
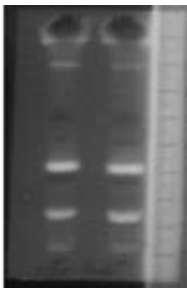
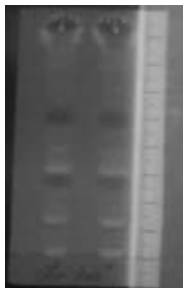
3.3. Dược liệu Cam thảo

Bột màu vàng nhạt.

Soi kính hiển vi thấy: Các mảnh mô mềm với tế bào có thành mỏng chứa nhiều hạt tinh bột. Hạt tinh bột đứng riêng rẽ, hình trứng hay hình cầu. Sợi gỗ màu vàng, có thành dày, thường kèm theo tế bào có tinh thể calci oxalat hình lăng trụ. Mảnh mạch điểm màu vàng. Mảnh bản.

		
Mảnh bản	Sợi gỗ	Tinh thể calci oxalat
		
Mảnh mô mềm	Hạt tinh bột	Mạch điểm

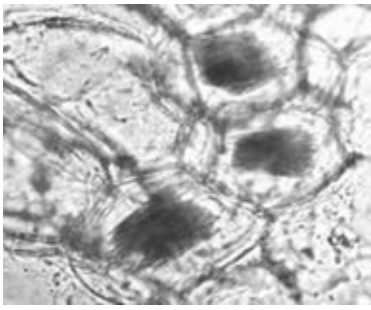
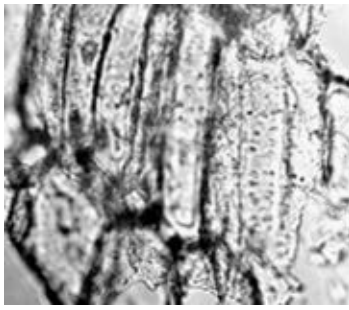
Hình 5. Hình ảnh soi bột dược liệu Cam thảo

Dung môi khai triển	Phun acid sulfuric	Phun acid sulfuric; Soi UV 366 nm	Soi UV 366 nm
Ethyl acetat - acid formic - acid acetic - nước (15:1:1:2)	 $R_f=0,5$ $R_f=0,3$		

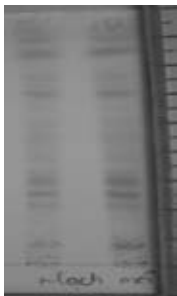
Hình 6. Hình ảnh sắc ký đồ dược liệu Cam thảo (phương pháp SKLM)

3.4. Dược liệu Mạch môn

Mảnh bản gồm những tế bào nhiều cạnh có thành dày. Mảnh mô mềm gồm tế bào có thành mỏng, hình tròn hoặc nhiều cạnh, có chứa tinh thể calci oxalat hình kim, đứng riêng rẽ hay xếp thành từng bó. Tế bào mô cứng hình chữ nhật có thành dày, khoang rộng, có ống trao đổi rõ, thường xếp thành từng đám, có nhiều tinh bột.

		
Dược liệu Mạch môn	Mảnh mô mềm chứa tinh thể calci oxalat hình kim	Tế bào mô cứng

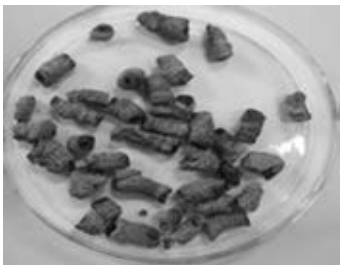
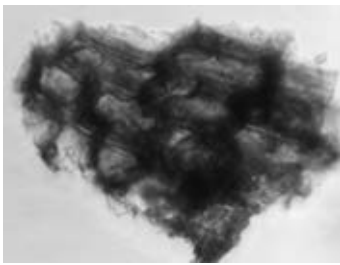
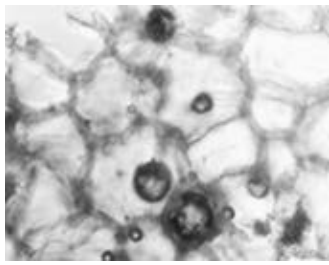
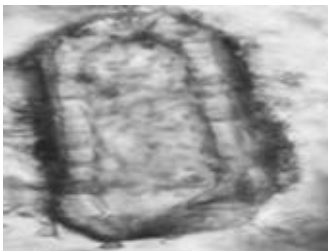
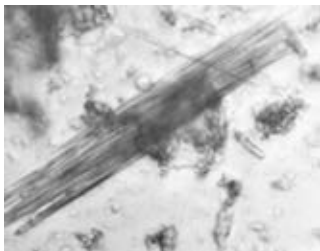
Hình 7. Hình ảnh soi bột dược liệu Mạch môn

Dung môi khai triển	Phun H_2SO_4 10% trong ethanol	Dung môi khai triển	Soi UV 254 nm	Soi UV 366 nm
Dicloromethan - methanol - Nước (8:2:0,3)		Toluen - methanol - acid acetic (80:5:0,1)		

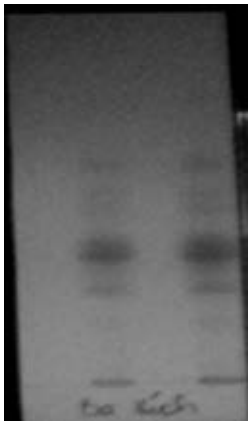
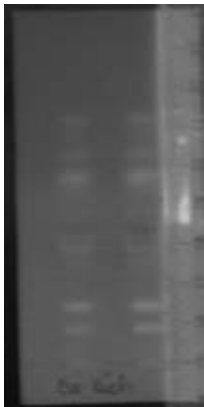
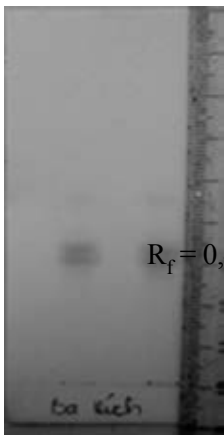
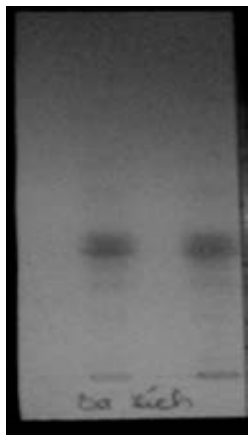
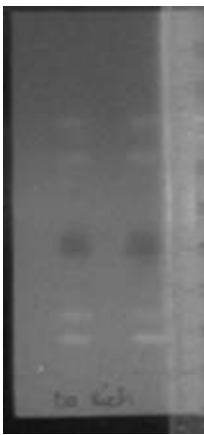
Hình 8. Hình ảnh sắc ký đồ dược liệu Mạch môn (phương pháp SKLM)

3.5. Dược liệu Ba kích

Bột có màu nâu nhạt, vị hơi chát, mùi thơm dịu. Soi kính hiển vi thấy: Mảnh bần gồm các tế bào hình chữ nhật, mảnh mô mềm cấu tạo bởi các tế bào hình nhiều cạnh thành mỏng, một số tế bào chứa bó tinh thể calci oxalat hình kim. Soi gỗ. Có nhiều tế bào mô cứng thành dày hóa gỗ, các lỗ trao đổi rõ. Nhiều tinh thể calci oxalat hình kim và các đoạn gãy của chúng. Rải rác có các hạt tinh bột và nhiều mạch điểm.

		
Dược liệu Ba kích	Mảnh bần	Mảnh mô mềm
		
Sợi gỗ	Tế bào mô cứng	Tinh thể calci oxalat hình kim

Hình 9. Hình ảnh soi bột dược liệu Ba kích

Dung môi khai triển	Ánh sáng thường	Soi UV 254	Soi UV 366
Ether dầu hỏa (30°C đến 40°C) - ethyl acetat - acid acetic (7,5:2,5:0,25) Chưa phun thuốc thử			
Phun thuốc thử kali hydroxyd 10%/ethanol	 $R_f = 0,4$		

Hình 10. Hình ảnh sắc ký đồ dược liệu Ba kích (phương pháp SKLM)

4. Kết luận

Kết quả nghiên cứu đã xây dựng được bộ dữ liệu chuẩn bằng phương pháp soi bột và sắc ký lớp mỏng theo Dược điển Việt Nam V của 5 dược liệu chuẩn: Mộc hương, Bạch truật, Cam thảo, Mạch môn, Ba kích góp một phần nhỏ trong việc xây dựng tiêu chuẩn chất lượng cho 5 vị dược liệu trên, giúp cho quá trình kiểm tra chất lượng dược liệu và các chế phẩm từ dược liệu, phục vụ cho công tác kiểm nghiệm dược liệu.

Tài liệu tham khảo

1. Bộ Y tế (2017), *Dược điển Việt Nam V*, Nhà xuất bản Y học, tập 2, trang 1252, 1077, 1095, 1241, 1064.
2. Bộ Y tế (2017), *Dược điển Việt Nam V*, PL12.18. Định tính dược liệu và các chế phẩm bằng kính hiển vi PL-283.
3. *Dược điển Trung Quốc* (2015).
4. Hong Kong Chinese Materia Medica Standards (HKCMMS) Office.

SUMMARY

Examining quality of five herbs including Radix Morindae officinalis, Rhizoma Atractylodis macrocephalae, Radix et Rhizoma Glycyrrhizae, Radix Ophiopogonis japonici, Radix Saussureae lappae was carried out the method for thin layer chromatography and microscopical followed by pharmacopoeia V of Viet Nam

(Ngày nhận bài: 10/04/2019 ; Ngày phản biện: 02/07/2019 ; Ngày duyệt đăng: 07/09/2019)

XÂY DỰNG PHƯƠNG PHÁP UPLC - MS/MS XÁC ĐỊNH VẾT HOẠT CHẤT ANASTROZOL TRONG THẨM ĐỊNH QUY TRÌNH VỆ SINH THIẾT BỊ SẢN XUẤT

NGUYỄN PHI HẢI, TRẦN ĐÌNH KHẢI, NGUYỄN ANH TUẤN
Công ty Cổ phần Dược – Trang Thiết bị Y tế Bình Định

Từ khóa: Anastrozol, xác định vết hoạt chất, UPLC- MS/MS, thẩm định phương pháp phân tích

1. Đặt vấn đề

Anastrozol là dẫn chất benzyltriazol, không phải steroid, có tác dụng ức chế mạnh và chọn lọc enzym estrogen synthetase, là enzym chuyển các androgen của tuyến thượng thận thành estrol và estradiol ở mô ngoại vi [1]. Anastrozol ngăn chặn hiệu quả sự tổng hợp estrogen ở phụ nữ mãn kinh và được sử dụng như một liệu pháp hóa trị liệu điều trị ung thư vú dương tính [1]. Tuy vậy do anastrozol có dược tính cao nên theo quy định của cơ quan quản lý, toàn bộ dây chuyền sản xuất viên anastrozol 1 mg dùng cho bệnh nhân ung thư vú phải được vệ sinh sạch sẽ để đảm bảo hạn chế tối đa sự nhiễm chéo được chất anastrozol sang các thuốc sản xuất sau khi sản xuất thuốc này trên cùng dây chuyền. Theo quy định chung, lượng dược chất còn tồn dư sau khi vệ sinh thiết bị (có thể nhiễm sang sản phẩm sản xuất sau được chất này trên cùng thiết bị) phải nhỏ hơn 10 ppm hoặc không vượt quá 0,1% mức liều điều trị khi dùng liều tối đa trong một ngày của sản phẩm sản xuất sau. Đối với những dược chất có tác dụng dược lý mạnh như anastrozol, lượng dược chất nhiễm sang sản phẩm sản xuất sau nó (nếu có) phải càng nhỏ hơn 10 ppm càng tốt [2],[3],[4],[10]. Do vậy, chúng tôi tiến hành xây dựng và thẩm định phương pháp UPLC - MS/MS, một phương pháp phân tích có độ đặc hiệu tốt và độ nhạy rất cao (giới hạn phát hiện có thể < 1 ppb) để xác định vết anastrozol tồn dư sau khi vệ sinh thiết bị, từ đó lựa chọn được quy trình vệ sinh thiết bị sản xuất tốt nhất, đảm bảo hạn chế tối đa sự nhiễm chéo được chất anastrozol sang các thuốc sản xuất sau nó trên cùng dây chuyền.

2. Thực nghiệm

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

2.1.1. Thiết bị, dụng cụ

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

- Cân vi phân 6 số Cubis MSA3.6P có độ chính xác $d = 0,001$ mg;

- Máy sắc ký lỏng khối phổ UPLC – MS/MS -8040 - Shimadzu - Japan;

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

2.1.2. Hóa chất, chất chuẩn

- Hóa chất: Methanol, acetonitril, acid formic loại tinh khiết phân tích của Merck.

- Chất chuẩn Anastrozol của Mỹ, lô R079X0; Hàm lượng = 99,8% tính theo nguyên trạng.

2.2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Đối tượng nghiên cứu

Mẫu thử chứa vết hoạt chất Anastrozol thu thập khi thẩm định quy trình vệ sinh thiết bị sau khi sản xuất viên anastrozol 1 mg.

2.2.2. Phương pháp nghiên cứu

- Khảo sát các điều kiện sắc ký với các loại cột khác nhau, thành phần và tỷ lệ pha động thích hợp để cho khả năng tách, phát hiện và ổn định tốt nhất.

- Thẩm định phương pháp phân tích: Tiến hành trên các chỉ tiêu qui định theo các hướng dẫn thẩm định phương pháp phân tích của ASEAN và FDA gồm: độ đặc hiệu/chọn lọc, giới hạn định lượng, giới hạn phát hiện, tính thích hợp của hệ thống sắc ký, khoảng tuyến tính, độ đúng, độ chính xác của phương pháp [4],[5],[6],[8],[9],[10].

- Áp dụng phương pháp phân tích đã thẩm định, xác định lượng hoạt chất anastrozol tồn dư trên thiết bị sản xuất sau quy trình vệ sinh. Phương pháp thu thập mẫu vết hoạt chất anastrozol tồn dư trên thiết bị sản xuất: Dựa vào hoạt lực, độ tan của hoạt chất trong nước, khả năng vệ sinh, từ đó lựa chọn dung môi và phương pháp lấy mẫu thích hợp: Dùng tăm bông nhúng methanol phết trên bề mặt tấm vật liệu (10 x 10 cm), thu hồi lượng hoạt chất trong tăm bông bằng cách chiết nhiều lần trong methanol, tập trung dịch chiết và thêm methanol vừa đủ 200 ml [4],[5],[6],[9],[10].

3. Kết quả và bàn luận

3.1. Xây dựng phương pháp phân tích

Sau khi khảo sát, xây dựng được phương pháp xác định vết hoạt chất Anastrozol trong quá trình thẩm định vệ sinh bằng phương pháp UPLC - MS/MS như sau:

3.1.1. Điều kiện sắc ký

- Cột: Chromegabond C6 5μ 60Å (150 x 4,6 mm) Serial 095-17-88632

- Pha động: Acetonitril - acid formic 0,1% trong nước (70:30 V/V), điều chỉnh tỷ lệ nếu cần.

- Dung môi pha loãng: Methanol

- Tốc độ dòng: 1 ml/phút

- Detector: LC - MS/MS-8040

- Thể tích tiêm: 1 μl

- Nhiệt độ buồng tiêm mẫu: 5°C

- Nhiệt độ cột: 30°C

3.1.2. Điều kiện khối phổ

Kiểu khối phổ hai lần, nguồn ion hóa ESI(+).

Các thông số của detector khối phổ:

Nebulizing Gas	3,0 l/min
Drying Gas Flow	15,0 l/min
Interface	ESI (+)
Interface Volta	4,5kV
DL Temperature	300°C
Heat Block Temperature	400°C
IG Vacuum	1900 Pa
PG Vacuum	95 Pa
CID Gas	230 kPa
MRM (M/2)	294,10 → 225,15

3. 2. Kết quả thẩm định phương pháp

3.2.1. Độ đặc hiệu – chọn lọc của phương pháp

- Mẫu trắng (dung môi pha loãng mẫu): Methanol

- Mẫu placebo: Cân 515,8 mg các tá dược theo công thức sản xuất thuốc viên anastrozol 1 mg (tương ứng 5 viên tá dược), cho vào bình định mức 500 ml, thêm methanol lắc cho tan, thêm methanol đến vừa đủ thể tích, lắc đều. Hút chính xác 1,0 ml dung dịch này pha loãng với methanol tới vừa đủ 100 ml, lắc đều. Hút chính xác 1,0 ml dung dịch thu được pha loãng với methanol tới vừa đủ 100 ml, lắc đều. Lọc qua màng lọc 0,45 μm.

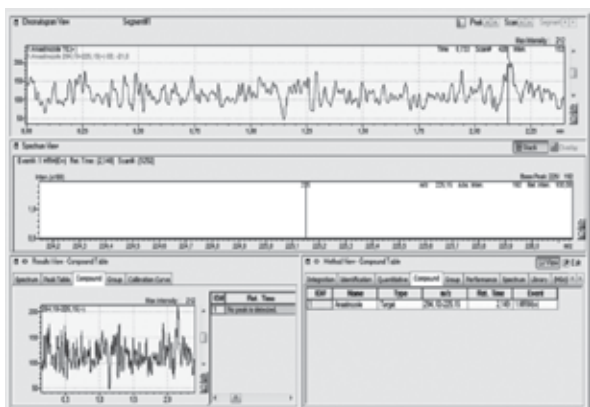
- Dung dịch chuẩn gốc: Cân chính xác 20,4 mg anastrozol chuẩn cho vào bình định mức 200 ml, thêm methanol lắc cho tan, thêm methanol đến vừa đủ thể tích, lắc đều. Hút chính xác 0,1 ml dung dịch này pha loãng với methanol tới 100 ml, lắc đều.

- Dung dịch chuẩn 1 ppb: Hút chính xác 1,0 ml dung dịch chuẩn gốc pha loãng với methanol vừa đủ 100 ml, lắc đều. Lọc qua màng lọc 0,45 μm.

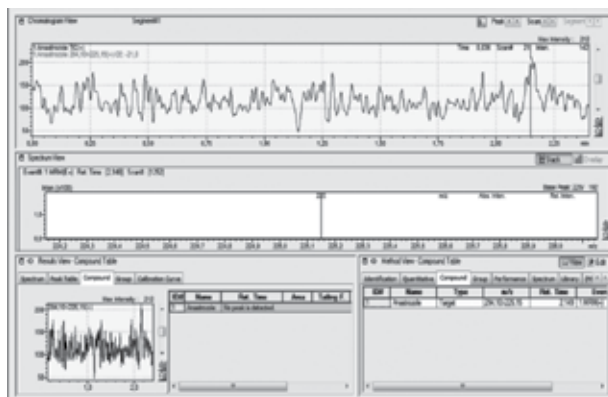
- Dung dịch thử tự tạo: Cân chính xác 20,2 mg anastrozol chuẩn và 2,055 g mẫu placebo cho vào bình định mức 200 ml, thêm methanol lắc cho tan, thêm methanol đến vừa đủ thể tích, lắc đều. Hút chính xác 0,1 ml dung dịch này pha loãng với methanol vừa đủ 100 ml, lắc đều. Hút chính xác 1,0 ml dung dịch thu được cho vào bình định mức 100 ml, pha loãng với methanol vừa đủ 100 ml. Lọc qua màng lọc 0,45 μm.

Tiêm riêng rẽ 1 μl dung dịch mẫu trắng, dung dịch placebo, dung dịch chuẩn và dung dịch thử tự tạo vào hệ thống sắc ký lỏng khối phổ. Ghi lại các sắc ký đồ (SKĐ) và đáp ứng của pic chính.

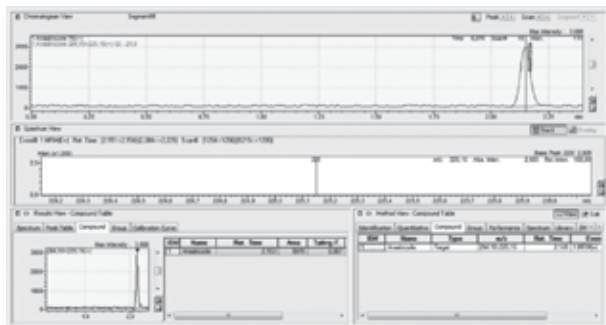
Sắc ký đồ các dung dịch mẫu trắng, dung dịch mẫu placebo, dung dịch chuẩn và dung dịch thử tự tạo thể hiện ở các Hình 1, 2, 3, và 4.



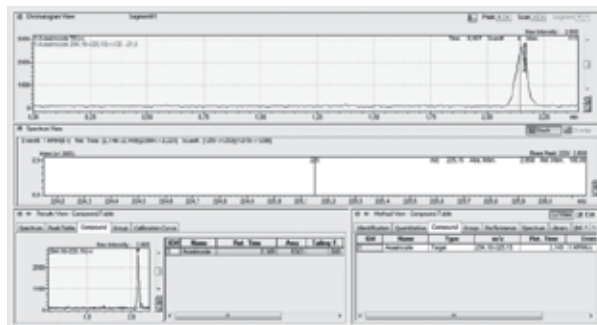
Hình 1. SKĐ dung dịch mẫu trắng



Hình 2. SKĐ dung dịch mẫu placebo



Hình 3. SKĐ dung dịch chuẩn 1 ppb



Hình 4. SKĐ dung dịch mẫu thử tự tạo

Kết quả thu được cho thấy: Thời gian lưu của pic anastrozol có mảnh phổ $m/z = 294,10 \rightarrow 225,15$ trên sắc ký đồ của dung dịch chuẩn là 2,148 phút; dung dịch thử tự tạo là 2,150 phút. Dung dịch mẫu trắng và placebo không xuất hiện pic anastrozol có mảnh phổ $m/z = 294,10 \rightarrow 225,15$ ở thời gian lưu tương ứng với thời gian lưu của pic thu được từ dung dịch chuẩn anastrozol. Dung dịch mẫu thử tự tạo xuất hiện pic anastrozol có mảnh phổ $m/z = 294,10 \rightarrow 225,15$ có thời gian lưu tương ứng với thời gian lưu của pic thu được từ dung dịch chuẩn anastrozol. Như vậy, phương pháp phân tích có tính đặc hiệu/chọn lọc đối với anastrozol.

3.2.2. Xác định giới hạn định lượng

Từ dung dịch mẫu thử tự tạo tiến hành pha loãng tới ngưỡng nồng độ mà tại đó pic anastrozol có giá trị $S/N \geq 10$, tiến hành tiêm lặp lại 6 lần dung dịch này.

Kết quả xác định giới hạn định lượng được trình bày ở Bảng 1.

Bảng 1. Kết quả xác định giới hạn định lượng

STT	Nồng độ dung dịch (ppb)	Lần tiêm	Tên pic	Thời gian lưu (phút)	Diện tích pic	S/N
1	1,0	1	Anastrozol	2,148	8075	11,45
2		2	Anastrozol	2,149	8381	15,27
3		3	Anastrozol	2,148	8375	14,86
4		4	Anastrozol	2,149	8588	13,85
5		5	Anastrozol	2,147	8475	15,42
6		6	Anastrozol	2,148	8255	12,44
Trung bình				2,148	8358	13,88
RSD (%)				0.04	2.13	11.72

Kết quả ở Bảng 1 cho thấy tại nồng độ dung dịch 1 ppb là giới hạn định lượng cần xác định.

3.2.3. Xác định giới hạn phát hiện

Từ dung dịch mẫu thử tự tạo tiến hành pha loãng tới ngưỡng nồng độ mà tại đó pic anastrozol có giá trị $S/N \geq 2$, tiến hành tiêm lặp lại 6 lần dung dịch này.

Kết quả xác định giới hạn phát hiện được trình bày ở Bảng 2.

Bảng 2. Kết quả xác định giới hạn phát hiện

STT	Nồng độ dung dịch (ppb)	Lần tiêm	Tên pic	Thời gian lưu (phút)	Diện tích pic	S/N
1	0,2	1	Anastrozol	2,141	1495	5,72
2		2	Anastrozol	2,148	1354	3,89
3		3	Anastrozol	2,151	1473	6,15
4		4	Anastrozol	2,146	1265	2,91
5		5	Anastrozol	2,145	1468	5,45
6		6	Anastrozol	2,148	1471	5,34
Trung bình				2,147	1421	4,91
RSD (%)				0,16	6.43	25.29

Kết quả thể hiện ở Bảng 2 cho thấy, giới hạn phát hiện của phương pháp là tại nồng độ dung dịch 0,2 ppb.

3.2.4. Tính thích hợp của hệ thống sắc ký

Tiêm 6 lần dung dịch mẫu chuẩn nồng độ 1,0 ppb vào hệ thống sắc ký lỏng khối phổ, ghi lại các sắc ký đồ, xác định các thông số của pic anastrozol.

Kết quả khảo sát tính thích hợp của hệ thống sắc ký được thể hiện ở Bảng 3.

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

STT	Thời gian lưu pic anastrozol (Phút)	Diện tích pic anastrozol	Số đĩa lý thuyết	Hệ số đối xứng	S/N
1	2,148	8075	11245	1,114	11,45
2	2,149	8381	11325	1,108	15,27
3	2,148	8375	11042	1,114	14,86
4	2,149	8588	11315	1,007	13,85
5	2,147	8475	10074	1,043	15,42
6	2,148	8255	10945	1,035	12,44
TB	2,148	8358	10991	1,070	13,88
RSD	0,04%	2,13%	2,71%	4,43%	11,72%

Kết quả cho thấy hệ thống sắc ký có độ lặp lại tốt với RSD của thời gian lưu dưới 1,0% và diện tích pic dưới 3,0%, số đĩa lý thuyết trên 10.000, hệ số đối xứng của pic anastrozol xấp xỉ 1,0. Như vậy, hệ thống sắc ký đạt yêu cầu để phân tích vết hoạt chất anastrozol.

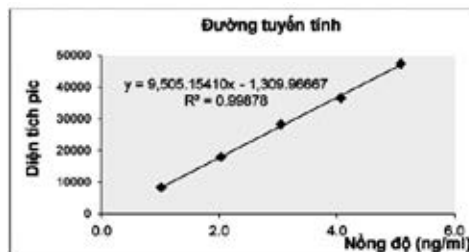
3.2.5. Tính tuyến tính

Chuẩn bị các dung dịch chuẩn: Từ dung dịch chuẩn gốc, tiến hành pha loãng dung dịch chuẩn gốc với methanol để thu được các dung dịch chuẩn ở các mức nồng độ 1 ppb; 2 ppb; 3 ppb; 4 ppb và 5 ppb.

Kết quả khảo sát sự tương quan giữa y (diện tích pic) và x (nồng độ) của anastrozol; bằng phương pháp bình phương cực tiểu, kết quả cho thấy có sự phụ thuộc tuyến tính giữa nồng độ và diện tích pic anastrozol trong khoảng nồng độ đã khảo sát với hệ số $R^2 = 0,99878$ ($r = 0,99939$). Kết quả được thể hiện ở Bảng 4, Hình 5.

Bảng 4. Kết quả khảo sát khoảng tuyến tính của phương pháp

STT	Nồng độ (ng/ml)	Diện tích pic
1	1,0	8358
2	2,0	17942
3	3,1	28294
4	4,1	36571
5	5,1	47423
Hệ số tương quan $r = 0,99939$		
Hệ số góc (a) = 9.505,15410		
Hệ số chặn (b) = - 1.309,96667		
% Hệ số chặn Y = 4,6% (< 5,0%)		



Hình 5. Đồ thị biểu diễn mối tương quan tuyến tính giữa nồng độ và diện tích pic của anastrozol

3.2.6. Xác định độ đúng

3.2.6.1. Xác định độ đúng của phương pháp

Độ đúng của phương pháp được đánh giá trên mẫu tự tạo. Tiến hành ở 3 mức nồng độ khác nhau: 1 ppb, 3 ppb và 4 ppb, mỗi nồng độ tiến hành 3 mẫu.

- Chuẩn bị các dung dịch chuẩn: Từ dung dịch chuẩn gốc, tiến hành pha loãng dung dịch chuẩn gốc với methanol để được các dung dịch chuẩn ở các mức nồng độ 1 ppb; 2 ppb; 3 ppb; 4 ppb, 5 ppb.

- Mẫu tự tạo có nồng độ 1 ppb: Cân 20,0 mg anastrozol chuẩn và 2,056 g mẫu placebo cho vào bình định mức 200 ml, thêm methanol lắc cho tan, thêm methanol đến vừa đủ thể tích, lắc đều. Hút chính xác 1,0 ml dung dịch này pha loãng với methanol tới vừa đủ 100 ml, lắc đều. Hút chính xác 1,0 ml dung dịch thu được pha loãng với methanol tới vừa đủ 100 ml, lắc đều. Hút chính xác 5,0 ml dung dịch thu được pha loãng với methanol tới vừa đủ 50 ml. Lọc qua màng lọc 0,45 μ m.

- Mẫu tự tạo có nồng độ 3 ppb: Cân 30,0 mg anastrozol chuẩn và 1,028 g mẫu placebo cho vào bình định mức 100 ml, thêm methanol lắc cho tan, thêm methanol đến vừa đủ thể tích, lắc đều. Hút chính xác 1,0 ml dung dịch này pha loãng với methanol tới vừa đủ 100 ml, lắc đều. Hút chính xác 1,0 ml dung dịch thu được pha loãng với methanol tới vừa đủ 100 ml, lắc đều. Hút chính xác 5,0 ml dung dịch thu được pha loãng với methanol tới vừa đủ 50 ml. Lọc qua màng lọc 0,45 μ m.

- Mẫu tự tạo có nồng độ 4 ppb: Cân 40,0 mg anastrozol chuẩn và 1,028 g mẫu placebo cho vào bình định mức 100 ml, thêm methanol lắc cho tan, thêm methanol đến vừa đủ thể tích, lắc đều. Hút chính xác 1,0 ml dung dịch này pha loãng với methanol tới vừa đủ 100 ml, lắc đều. Hút chính xác 1,0 ml dung dịch thu được pha loãng với methanol tới vừa đủ 100 ml, lắc đều. Hút chính xác 5,0 ml dung dịch thu được pha loãng với methanol tới vừa đủ 50 ml. Lọc qua màng lọc 0,45 μ m.

Tiêm các dung dịch chuẩn, dung dịch mẫu tự tạo vào hệ thống sắc ký lỏng khối phổ, ghi lại các sắc ký đồ. Dựa vào diện tích pic của dung dịch mẫu tự tạo, dung dịch chuẩn, hàm lượng của chất chuẩn để tính ra lượng chất chuẩn tìm lại. Kết quả xác định độ đúng của phương pháp phân tích (% thu hồi) được thể hiện ở Bảng 5.

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

STT	Nồng độ đo (ppb)	Chuẩn		Diện tích pic (mAU)	Lượng tìm lại (mg)	% Thu hồi	% Thu hồi trung bình	RSD (%)
		Lượng thêm vào (mg)	Độ pha loãng					
1	1 ppb	20,1	20000000	7532	18,64	92,75	92,59	1,02
2		20,3	20000000	7508	18,59	91,58		
3		20,2	20000000	7643	18,88	93,44		
4	3 ppb	30,2	10000000	25548	28,31	93,75	94,28	0,66
5		30,4	10000000	25834	28,61	94,13		
6		30,6	10000000	26257	29,06	94,97		
7	4 ppb	40,6	10000000	35742	39,06	96,20	96,15	0,07
8		40,8	10000000	35874	39,20	96,07		
9		40,7	10000000	35817	39,14	96,16		
% Thu hồi trung bình = 94,34% ; n = 9 ; RSD = 1,74%								

3.2.6.2. Xác định hệ số phục hồi của phương pháp

- *Chuẩn bị các dung dịch chuẩn:* Từ dung dịch chuẩn gốc, tiến hành pha loãng dung dịch chuẩn gốc với methanol để được các dung dịch chuẩn ở các mức nồng độ 1 ppb; 2 ppb; 3 ppb; 4 ppb, 5 ppb.

- *Dung dịch thử:* Cân 20,0 mg anastrozol chuẩn và 2,052 g mẫu placebo cho vào bình định mức 2000 ml, thêm methanol lắc cho tan, thêm methanol đến vừa đủ thể tích, lắc đều. Hút chính xác 1 ml dung dịch này nhỏ đều lên tấm vật liệu (10 x 10 cm), để khô, dùng tấm bông nhúng methanol phết trên bề mặt tấm vật liệu, thu hồi lượng hoạt chất trong tấm bông bằng cách chiết nhiều lần trong methanol, tập trung dịch chiết và thêm methanol pha loãng vừa đủ 200 ml. Hút 2 ml dung dịch này pha loãng với methanol tới vừa đủ 100 ml. Lọc qua màng lọc 0,45 µm.

Kết quả xác định hệ số phục hồi của phương pháp được thể hiện ở Bảng 6.

Bảng 6. Kết quả xác định hệ số phục hồi của phương pháp

STT	Lượng cân hoạt chất (mg)	HSPL	Diện tích pic	Khối lượng tìm lại (mg)	Độ phục hồi R (%)
1	20,2	20000000	5574	14,5	71,9
2	20,6	20000000	5546	14,5	70,2
3	20,5	20000000	5845	15,1	73,6
Đạt yêu cầu trong khoảng cho phép từ 40 - 120%					

3.2.7. Độ chính xác của phương pháp

3.2.7.1. Độ lặp lại

- Dung dịch chuẩn 1 ppb: Từ dung dịch chuẩn gốc, hút chính xác 1,0 ml dung dịch chuẩn gốc pha loãng với methanol tới vừa đủ 100 ml, lắc đều, lọc qua màng lọc 0,45 µm.

- Dung dịch thử tự tạo: Cân chính xác khoảng 20 mg anastrozol chuẩn và 2,052 g mẫu placebo vào bình định mức 200 ml, thêm methanol lắc cho tan, thêm methanol đến vừa đủ thể tích, lắc đều. Hút chính xác 1,0 ml dung dịch này pha loãng với methanol tới vừa đủ 100 ml, lắc đều. Hút chính xác 1,0 ml dung dịch thu được pha loãng với methanol tới vừa đủ 100 ml, lắc đều. Hút chính xác 5,0 ml dung dịch thu được pha loãng với methanol tới vừa đủ 50 ml, lọc qua màng lọc 0,45 µm.

Độ lặp lại của phương pháp được tiến hành trên 6 mẫu dung dịch thử tự tạo. Kết quả khảo sát độ lặp lại của phương pháp được thể hiện ở Bảng 7.

Bảng 7. Kết quả khảo sát độ lặp lại của phương pháp

STT	Nồng độ đo (ppb)	Lượng cân chuẩn Anastrozol thêm vào (mg)	Hệ số pha loãng	Diện tích pic	Kết quả định lượng (%)
1	Mẫu thử 1 ppb	20,4	20000000	8104	97,0
2		21,2	20000000	8197	94,4
3		20,5	20000000	8247	98,2
4		22,8	20000000	9071	97,1
5		20,2	20000000	8187	98,9
6		21,7	20000000	8184	92,1
Kết quả định lượng trung bình = 96,3%; n = 6; RSD = 2,68% (Giới hạn: RSD (%) ≤ 30%)					

Kết quả cho thấy phương pháp có độ lặp lại khá tốt với giá trị $RSD = 2,68\% < 30\%$.

3.2.7.2. Độ chính xác trung gian

Độ chính xác trung gian được tiến hành tương tự giống như độ lặp lại trên 12 mẫu thử tự tạo, được phân tích bởi hai kiểm nghiệm viên khác nhau và ngày khác nhau. Kết quả khảo sát độ chính xác trung gian được thể hiện ở Bảng 8.

Bảng 8. Kết quả khảo sát độ chính xác trung gian của phương pháp

STT	Tiến hành	Lượng cân chuẩn (mg)	Diện tích pic	Hàm lượng (%)	Hàm lượng trung bình (%)	RSD (%)
1	Trong ngày Lượng cân chuẩn: 20,4 mg Diện tích pic chuẩn: 8358	20,4	8104	97,0	96,3% ; n = 6	2,68
2		21,2	8197	94,4		
3		20,5	8247	98,2		
4		22,8	9071	97,1		
5		20,2	8187	98,9		
6		21,7	8184	92,1		
7	Khác ngày Lượng cân chuẩn: 21,8 mg Diện tích pic chuẩn: 8845	20,9	8149	96,1	98,0% ; n = 6	3,33
8		21,5	8157	93,5		
9		20,6	8617	103,1		
10		20,3	8209	99,7		
11		21,1	8317	97,2		
12		20,4	8127	98,2		
Hàm lượng trung bình = 97,1%; n = 12; RSD = 3,03% (Yêu cầu: RSD (%) ≤ 30%)						

Kết quả ở Bảng 8 cho thấy phương pháp có độ chính xác trung gian khá cao với giá trị $RSD = 3,03\%$.

4. Kết luận

Các kết quả thực nghiệm cho thấy phương pháp phân tích UPLC-MS/MS để xác định vết hoạt chất anastrozol áp dụng trong qui trình thẩm định vệ sinh thiết bị sau khi sản xuất viên anastrozol 1 mg, đã được thẩm định các chỉ tiêu: tính đặc hiệu; giới hạn định lượng (LOQ); giới hạn phát hiện (LOD); tính thích hợp của hệ thống sắc ký; tính tuyến tính; độ đúng; độ lặp lại; độ chính xác trung gian đều đạt yêu cầu. Phương pháp có độ đặc hiệu tốt, các giá trị LOD (0,2 ppb) và LOQ (1,0 ppb) rất nhỏ, phù hợp để xác định lượng dược chất anastrozol tồn dư ở dạng vết sau qui trình vệ sinh thiết bị sản xuất.

Tài liệu tham khảo

- Bộ Y tế (2015), *Dược thư Quốc gia Việt Nam*, Lần xuất bản thứ hai, Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật.
- Bộ Y tế, Thông tư số 25/2011/TT-BYT về Ban hành Danh mục hóa chất, chế phẩm diệt côn trùng, diệt khuẩn dùng trong lĩnh vực gia dụng và y tế được phép đăng ký để sử dụng, được phép đăng ký nhưng hạn chế sử dụng và cấm sử dụng tại Việt Nam.
- Tài liệu tập huấn GMP (2004), GMP nâng cao (2014).
- Cleaning Validation - Know – How of an Effective Cleaning Program.
- Guidance on aspects of cleaning validation in active pharmaceutical ingredient plants.
- Cleaning Validation Manual - A Comprehensive Guide for the Pharmaceutical and Biotechnology Industries, Syed Imtiaz Haider, Erfan Syed Asif.
- Pharmaceutical Process Validation* (2003), Robert A, Nash, Alfred H, Wachter.
- Human Genome Centre, School of Medical Sciences, Universiti Sains Malaysia 16150, Kubang Kerian, Kelantan, Malaysia.
- Setting Cleaning Validation Acceptance Limits for Topical Formulations* (2008), M,Ovais, Lai Yeo Lian.
- WHO TRS 937 (2006), Annex 4 - *Supplementary guidelines on good manufacturing practices: validation*, Appendix 3 – Cleaning Validation.

SUMMARY

An Ultra Performance Liquid Chromatography tandem Mass Spectrometry (UPLC-MS/MS) was developed for the residual determination of Anastrozole activities the cleaning assessment process. The chromatography was performed as: Column: Chromagabond C6 5µm 60Å (150 x 4.6 mm), serial 095-17-88632; Column temperature: 30°C; Flow rate: 1.0 ml/min; Detector: triple quadrupole mass spectrometer system with an ESI interface in multiple reaction monitoring mode, and an injection volume of 1 µl, Autosampler temperature: 5°C, Mobile phase: Acetonitrile - Acid formic 0.1% in water (70:30 V/V). The method was validated in specificity, limit of detection, limit of quantitative linear range, accuracy, repeatability, precision, recovery. Validation results proved that the developed method was suitable for residual determination of Anastrozole activities and application in the cleaning assessment process.

(Ngày nhận bài: 21/03/2019 ; Ngày phản biện: 27/05/2019 ; Ngày duyệt đăng: 02/10/2019)

MỤC LỤC

	<i>Trang</i>
● <i>Nghiên cứu khoa học</i>	
- Định lượng Acid acetic trong thuốc nhỏ tai với công thức bào chế có chứa Acid citric bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao. <i>MAI THANH HÀ, NGUYỄN THỊ HẰNG, TRẦN THÚY HẠNH, THÁI PHAN QUỲNH NHƯ</i>	1
- Nghiên cứu xây dựng phương pháp phát hiện và định lượng Thủy ngân trong một số mỹ phẩm bằng máy đo thủy ngân trực tiếp. <i>ĐOÍ HẢI LINH, NGUYỄN VĂN HÀ, ĐOÀN CAO SƠN</i>	6
- Thẩm định quy trình xác định hoạt tính enzym Nattokinase bằng phương pháp đo quang. <i>NGUYỄN THỊ HẰNG, NGUYỄN THỊ LIÊN, TẠ MẠNH HÙNG</i>	11
- Phân biệt dược liệu Bạch hoa xà thiệt thảo và dược liệu dễ nhầm lẫn Cỏ lười rắn. <i>VŨ TRỌNG KHOA, TRẦN THỊ THU TRANG, BẠCH THỊ THẨM, NGUYỄN TUẤN ANH</i>	16
- Bộ dữ liệu hình ảnh soi bột và sắc ký lớp mỏng của 5 dược liệu chuẩn để tham khảo đối chiếu trong kiểm nghiệm dược liệu. <i>TRẦN THỊ KIM NINH, VÕ THỊ HUỜNG, BÙI THÁI THẢO LY</i>	21
- Xây dựng phương pháp UPLC - MS/MS xác định vết hoạt chất Anastrozol trong thẩm định quy trình vệ sinh thiết bị sản xuất. <i>NGUYỄN PHI HẢI, TRẦN ĐÌNH KHÁI, NGUYỄN ANH TUẤN</i>	26

CONTENTS

	<i>Page</i>
● <i>Scientific researches</i>	
- Determination of Acetic Acid in ear drops with a formulation containing Citric Acid by High Performance Liquid Chromatography method. <i>MAI THANH HÀ, NGUYỄN THỊ HẰNG, TRẦN THÚY HẠNH, THÁI PHAN QUỲNH NHƯ</i>	1
- Development the method of identification and determination of Mercury in some cosmetics by direct mercury meter machine. <i>ĐOÍ HẢI LINH, NGUYỄN VĂN HÀ, ĐOÀN CAO SƠN</i>	6
- Validation of the procedure for determination of the bioactivity of Nattokinase enzyme by Ultraviolet and Visible Absorption Spectrophotometric method. <i>NGUYỄN THỊ HẰNG, NGUYỄN THỊ LIÊN, TẠ MẠNH HÙNG</i>	11
- Distinguish medicinal herbs “Bạch hoa xà thiệt thảo - <i>Herba Hedyotis diffusae</i> ” from easy-to-confuse medicinal herbs “Cỏ lười rắn - <i>Herba Hedyotis corymbosa</i> ”. <i>VŨ TRỌNG KHOA, TRẦN THỊ THU TRANG, BẠCH THỊ THẨM, NGUYỄN TUẤN ANH</i>	16
- Image data of medicinal herb powder examination and Thin Layer Chromatography of 5 standard medicinal herbs for reference in medicinal herbs testing. <i>TRẦN THỊ KIM NINH, VÕ THỊ HUỜNG, BÙI THÁI THẢO LY</i>	21
- Development of UPLC – MS/MS method for determination of residual Anastrozole in evaluating the procedure of cleaning the production equipment. <i>NGUYỄN PHI HẢI, TRẦN ĐÌNH KHÁI, NGUYỄN ANH TUẤN</i>	26