

VIỆN KIỂM NGHIỆM THUỐC TRUNG ƯƠNG

ISSN 1859 - 0055

TẠP CHÍ

**KIỂM
NGHIỆM
thuốc**

JOURNAL OF DRUG QUALITY CONTROL

SỐ 3.2020

TẬP 18-SỐ 69

NATIONAL INSTITUTE OF DRUG QUALITY CONTROL

48 HAI BA TRUNG . HANOI - VIETNAM

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

NGHIÊN CỨU ĐỊNH LƯỢNG MONOTROPEIN TRONG DƯỢC LIỆU BA KÍCH (*RADIX MORINDAE OFFICINALIS*) BẰNG PHƯƠNG PHÁP HPLC

PHẠM THỊ LINH GIANG, HOÀNG QUỲNH HOA,
TRẦN VĂN ON

Trường Đại học Dược Hà Nội

PHẠM VĂN KIẾN, ĐOÀN CAO SƠN

Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương

Từ khóa: *Monotropein, HPLC, Ba kích, Morinda officinalis.*

1. Đặt vấn đề

Ba kích là rễ đã phơi hay sấy khô của cây Ba kích (*Morinda officinalis* How.), họ Cà phê (Rubiaceae), một dược liệu được sử dụng rộng rãi trong Y học cổ truyền với tác dụng bổ thận dương, mạnh gân xương [2],[3]. Theo thống kê những năm gần đây, nhu cầu sử dụng của dược liệu Ba kích trong đời sống hàng ngày cũng như trong các chế phẩm thuốc và thực phẩm chức năng từ dược liệu ngày một tăng. Monotropein là một trong những thành phần hóa học chính trong rễ Ba kích, có tác dụng sinh học. Hiện nay, chuyên luận Ba kích trong Dược điển Việt Nam V chưa có chỉ tiêu định lượng thành phần hóa học [1] và Dược điển Trung Quốc mới có chỉ tiêu định lượng nystose [5]. Với mong muốn đưa ra phương pháp định lượng monotropein trong dược liệu Ba kích bằng phương pháp thông dụng nhưng vẫn đảm bảo độ chính xác, tin cậy và góp phần nâng cấp chuyên luận dược liệu Ba kích trong Dược điển Việt Nam, chúng tôi tiến hành nghiên cứu định lượng monotropein trong dược liệu Ba kích bằng phương pháp HPLC.

2. Thực nghiệm

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

2.1.1. Thiết bị, dụng cụ

Đã được hiệu chuẩn theo yêu cầu của ISO/IEC 17025.

- Máy sắc ký lỏng Shimadzu, Hitachi với detector DAD.

- Cột Phenomenex Gemini – C18 (250 x 4,6 mm; 5 µm).

- Cân phân tích Mettler Toledo MS 105, độ chính xác 0,01 mg.

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

2.1.2. Chất chuẩn

- Monotropein: Nguồn gốc: Sigma Aldrich; Số lô:

SLBN8437V; Hàm lượng: 99% $C_{16}H_{22}O_{11}$ (nguyên trạng).

2.1.3. Hóa chất, dung môi

- Nước (RO);
- Methanol loại dùng cho HPLC (Merck – Đức);
- Ethanol loại dùng cho HPLC (Merck – Đức);
- Acid phosphoric loại PA (VWR – Pháp).

2.2. Đối tượng, nội dung và phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Đối tượng nghiên cứu

Mẫu thử: Dược liệu Ba kích được thu hái tại huyện Tây Giang, tỉnh Quảng Nam, sau khi thu hái được rửa sạch, bỏ lõi, thái nhỏ và sấy ở nhiệt độ 55 °C cho đến khi hàm ẩm dưới 12% (Độ ẩm: 10,49%), sau đó nghiền thành bột mịn và rây qua rây cỡ mắt rây 250 µm.

2.2.2. Nội dung và phương pháp nghiên cứu

Xây dựng và thẩm định quy trình định lượng monotropein trong dược liệu Ba kích bằng phương pháp HPLC.

3. Kết quả và bàn luận

3.1. Xây dựng qui trình định lượng monotropein trong dược liệu Ba kích bằng phương pháp HPLC

Chúng tôi đã khảo sát về bước sóng UV, thành phần pha động, phương pháp chiết monotropein từ dược liệu Ba kích và lựa chọn được điều kiện sắc ký tối ưu như sau:

3.1.1. Điều kiện HPLC

- Cột sắc ký: RP 18 (250 x 4,6 mm, 5 µm).
- Pha động: Hỗn hợp dung môi methanol – acid phosphoric 0,5% theo tỷ lệ thể tích 5 : 95.
- Bước sóng phát hiện UV: 237 nm.
- Tốc độ dòng: 1 ml/phút.
- Thể tích tiêm: 10 µl.

3.1.2. Phương pháp xử lý mẫu

- **Dung dịch chuẩn:** Hòa tan chất chuẩn monotropein trong methanol để được dung dịch chuẩn gốc có nồng độ chính xác khoảng 1,0 mg/ml. Từ dung dịch chuẩn gốc này tiến hành pha loãng bằng nước để được dung dịch chuẩn có nồng độ chính xác khoảng 0,05 mg/ml.

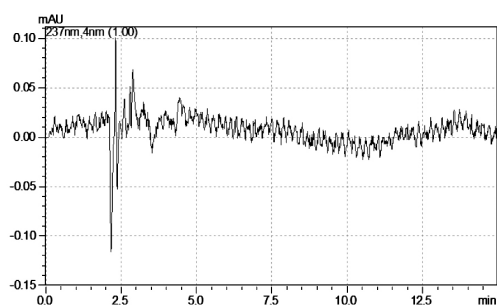
- **Dung dịch thử:** Cân chính xác khoảng 0,6 g mẫu thử vào ống ly tâm thủy tinh có nắp, thêm 15 ml ethanol 40%, đậy nắp, lắc siêu âm 30 phút, ly tâm với tốc độ 3000 vòng/phút trong 10 phút. Hút dịch chiết vào bình định mức 50 ml, phần còn lại đem chiết tiếp 2 lần, mỗi lần với 10 ml ethanol 40%, gộp các dịch chiết vào bình định mức trên, bổ sung ethanol 40% đến vạch, lắc đều. Hút 1,0 ml dung dịch này và pha loãng thành 10,0 ml bằng nước.

3.1.3. Cách tiến hành

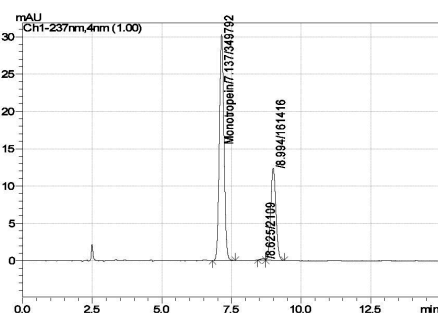
Kiểm tra độ thích hợp của hệ thống sắc ký: Tiêm lặp lại 6 lần dung dịch chuẩn vào hệ thống sắc ký, ghi lại sắc ký đồ, độ lệch chuẩn tương đối của thời gian lưu không quá 1,0% và diện tích pic monotropein không quá 2,0%, số đĩa lý thuyết tính trên pic monotropein không dưới 4000.

3.1.4. Tính kết quả

Tính hàm lượng monotropein ($C_{16}H_{22}O_{11}$) trong



Hình 1. Sắc ký đồ mẫu trắng



Hình 3. Sắc ký đồ dung dịch thử

được liệu dựa vào lượng cân monotropein, hàm lượng monotropein trong chất chuẩn, diện tích pic monotropein trong sắc ký đồ thu được từ dung dịch chuẩn, dung dịch thử, hệ số pha loãng của dung dịch chuẩn, dung dịch thử và độ ẩm của dược liệu Ba kích.

3.2. Thẩm định phương pháp định lượng monotropein trong rễ Ba kích bằng phương pháp HPLC [4],[6].

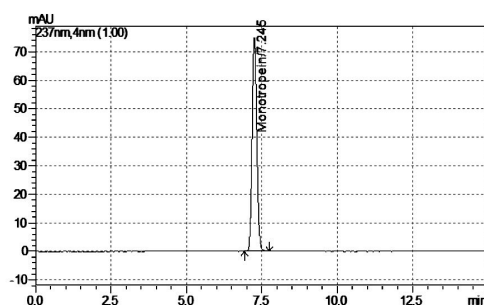
3.2.1. Tính đặc hiệu

- **Mẫu trắng** (dung môi): Nước

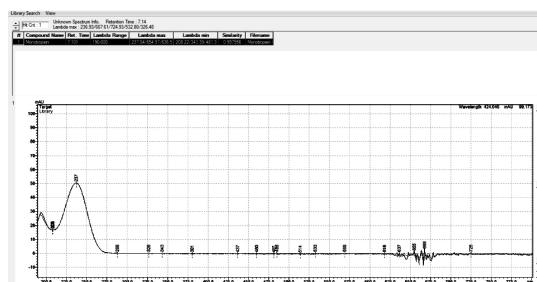
- **Dung dịch chuẩn:** Cân 10,85 mg chất chuẩn monotropein, hòa tan và định mức thành 10,0 ml bằng methanol. Lấy 1,0 ml dung dịch này và pha loãng thành 20,0 ml bằng nước.

- **Dung dịch thử:** Cân 0,6091 g bột dược liệu, tiến hành chuẩn bị dung dịch thử theo mục 3.1.2.

Tiến hành sắc ký lần lượt mẫu trắng, dung dịch thử, dung dịch chuẩn, ghi lại sắc ký đồ. So sánh phổ UV-VIS của pic chính thu được từ sắc ký đồ (SKĐ) của dung dịch thử với pic monotropein thu được từ sắc ký đồ của dung dịch chuẩn tại cùng thời gian lưu. Kết quả độ đặc hiệu của phương pháp được thể hiện tại Hình 1, Hình 2, Hình 3 và Hình 4.



Hình 2. Sắc ký đồ dung dịch chuẩn



Hình 4. Chồng phổ UV-VIS của pic monotropein trên SKĐ của dung dịch chuẩn và pic chính của dung dịch thử

- Kết quả phân tích cho thấy trên sắc ký đồ của mẫu trắng tại thời gian lưu của pic monotropein (khoảng 7,1 phút) không có pic nào xuất hiện.

- Sắc ký đồ của dung dịch thử cho pic có thời gian lưu trùng với thời gian lưu của pic monotropein thu được trong sắc ký đồ của dung dịch chuẩn ($t_R = 7,1$ phút).

- Phổ UV-VIS của pic tại thời gian lưu 7,1 phút của dung dịch thử trùng với Phổ UV-VIS của pic monotropein thu được từ dung dịch chuẩn với hệ số chồng phổ là 0,998.

- Kết quả xác định độ tinh khiết của 2 pic có thời gian

lưu 7,1 phút thu được từ dung dịch chuẩn monotropein và dung dịch thử đều bằng 1.

Như vậy, phương pháp HPLC với điều kiện đã chọn đặc hiệu, chọn lọc với chất cần phân tích.

3.2.2. 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 ở mục 3.2.1. Ghi lại các giá trị về thời gian lưu, diện tích pic, hệ số đối xứng của pic monotropein và số đĩa lý thuyết của cột sắc ký. Kết quả khảo sát được trình bày tại Bảng 1.

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

STT	Thời gian lưu (phút)	Diện tích pic (mAU.s)	Số đĩa lý thuyết	Hệ số đối xứng pic
1	7,229	802390	9808	1,14
2	7,269	803454	9670	1,12
3	7,265	802559	9913	1,13
4	7,263	804932	9815	1,12
5	7,259	803247	9912	1,13
6	7,245	802691	9677	1,13
Trung bình	7,255; n = 6; RSD = 0,21%	803212; n = 6; RSD = 0,12%		

Các số liệu thu được cho thấy độ lệch chuẩn tương đối (RSD) của thời gian lưu là $0,21\% < 1,0\%$, diện tích pic là $0,12\% < 2,0\%$; số đĩa lý thuyết > 4000 , hệ số đối xứng pic $< 1,5$ nên hệ thống sắc ký trên phù hợp và đảm bảo ổn định cho việc phân tích định tính và định lượng monotropein.

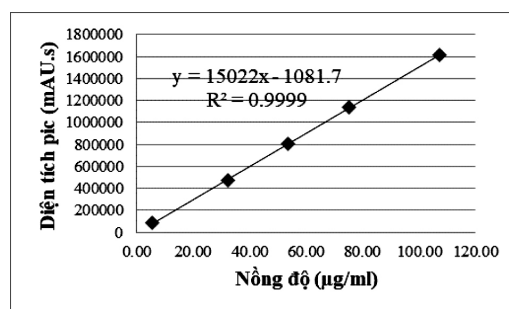
3.2.3. Độ tuyến tính

- *Dung dịch chuẩn gốc:* Cân 10,85 mg chất chuẩn monotropein, hòa tan và định mức thành 10,0 ml bằng methanol.

- Từ dung dịch chuẩn gốc này, tiến hành pha một dãy các dung dịch chuẩn trong nước để được các dung dịch có nồng độ lần lượt bằng 10%, 20%, 60%, 100%, 140% và 200% so với nồng độ định lượng. Tiêm lần lượt các dung dịch chuẩn vào hệ thống sắc ký. Kết quả khảo sát được trình bày trong Bảng 2, Hình 5.

Bảng 2. Kết quả khảo sát khoảng tuyến tính của monotropein

STT	Nồng độ ($\mu\text{g/ml}$)	Diện tích pic (mAU.s)
1	5,37	84690
2	32,22	474933
3	53,71	803212
4	75,19	1135269
5	107,42	1611123
Phương trình hồi quy: $y = 15022x - 1081,7$ $r = 0,99995$		



Hình 5. Đồ thị biểu diễn mối tương quan giữa nồng độ và diện tích pic monotropein

Kết quả cho thấy có sự tương quan tuyến tính chặt chẽ giữa nồng độ và diện tích pic monotropein trong khoảng nồng độ khảo sát từ 5,4 µg/ml – 107,4 µg/ml với hệ số tương quan gần bằng 1 ($r = 0,99995$).

3.2.4. Độ chính xác

3.2.4.1. Độ lặp lại

Khảo sát định lượng monotropein trên mẫu thử là bột dược liệu Ba kích với các điều kiện sắc ký và cách xử lý mẫu như ở mục 3.1.1 và 3.1.2. Lặp lại thí nghiệm 6 lần, kết quả được trình bày trong Bảng 3.

3.2.4.2. Độ chính xác trung gian

Độ chính xác trung gian do hai kiểm nghiệm viên khác nhau, định lượng monotropein trên cùng mẫu thử bột dược liệu Ba kích, tiến hành khác ngày trên hai thiết bị khác nhau. Kết quả thể hiện ở Bảng 3.

Bảng 3. Kết quả khảo sát độ chính xác của phương pháp

STT	Kiểm nghiệm viên 1 (Kết quả phần 3.2.4.1. Độ lặp lại) Thiết bị phân tích: Máy HPLC Shimadzu Lượng cân chuẩn: 10,85 mg Diện tích pic chuẩn: 803212 mAU.s			Kiểm nghiệm viên 2 Thiết bị phân tích: Máy HPLC Hitachi Lượng cân chuẩn: 10,42 mg Diện tích pic chuẩn: 3097657 mAU.s			
	Lượng cân thử (g)	Diện tích pic (mAU.s)	Hàm lượng (%) / dược liệu khô kiệt	Lượng cân thử (g)	Diện tích pic (mAU.s)	Hàm lượng (%) / dược liệu khô kiệt	
	1	0,6091	349792	2,14	0,6001	1352506	2,10
	2	0,6062	351099	2,16	0,6017	1360992	2,10
	3	0,6089	352394	2,16	0,6008	1360629	2,11
	4	0,6071	348900	2,14	0,6006	1351038	2,09
	5	0,6098	352052	2,15	0,6010	1358390	2,10
	6	0,6081	351728	2,16	0,6012	1357386	2,10
Trung bình = 2,15%; n = 6; RSD = 0,37%				Trung bình = 2,10%; n = 6; RSD = 0,25%			
Kết quả định lượng trung bình = 2,13 %; n = 12; RSD = 1,3%							

Kết quả ở Bảng 3 cho thấy phương pháp có độ chính xác cao, thể hiện độ lặp lại trong ngày với $RSD \leq 0,37\%$ và khác ngày với $RSD = 1,3\%$.

3.2.5. Độ đúng

- *Dung dịch chuẩn:* Dùng dung dịch chuẩn monotropein trong phần 3.2.1.

- *Dung dịch chuẩn gốc:* Cân 58,68 mg chất chuẩn monotropein, hòa tan và định mức thành 50,0 ml bằng methanol.

- *Chuẩn bị các mẫu thử:* Thêm chính xác 3,0 ml; 5,0 ml; 7,0 ml dung dịch chuẩn gốc vừa thu được (tương ứng với một lượng monotropein chuẩn khoảng 3,5 mg, 5,8 mg, 8,1 mg) vào ống ly tâm thủy tinh có nắp đã chứa sẵn khoảng 0,3 g bột dược liệu Ba kích, thêm 15 ml ethanol 40%, đậy nắp, lắc siêu âm 30 phút, ly tâm với tốc độ 3000 vòng/phút trong 10 phút. Hút dịch chiết vào bình định mức 50 ml, phần còn lại đem chiết tiếp 2 lần, mỗi lần với 10 ml ethanol 40%, gộp các dịch chiết vào bình định mức trên, bổ sung ethanol 40% đến vạch, lắc đều. Hút chính xác 1,0 ml dung dịch trên vào bình định mức 10 ml, thêm nước vừa đủ đến vạch, lắc đều. Lọc qua màng lọc 0,45 µm và tiêm vào hệ thống sắc ký. Tính lượng monotropein tìm lại được.

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

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

<i>STT</i>	<i>% so với định lượng</i>	<i>Lượng cân thử (g)</i>	<i>Lượng MO thêm vào (mg)</i>	<i>Diện tích pic (mAU.s)</i>	<i>Lượng MO tổng (mg)</i>	<i>Lượng MO có sẵn (mg)</i>	<i>Lượng MO tìm lại (mg)</i>	<i>Độ thu hồi (%)</i>
1	80	0,3095	3,49	281049	9,39	5,89	3,50	100,41
2	80	0,3068	3,49	281324	9,40	5,84	3,56	102,14
3	80	0,3072	3,49	280014	9,36	5,85	3,51	100,68
4	100	0,2957	5,81	343411	11,47	5,63	5,84	100,50
5	100	0,2983	5,81	343387	11,47	5,68	5,79	99,63
6	100	0,2954	5,81	344087	11,49	5,62	5,87	100,98
7	120	0,3076	8,13	415679	13,87	5,85	8,02	98,57
8	120	0,3098	8,13	415778	13,88	5,90	7,98	98,10
9	120	0,3087	8,13	415453	13,86	5,88	7,99	98,22
% Thu hồi trung bình = 99,91%; RSD = 1,38%								

Ghi chú: MO là monotropein

Kết quả ở Bảng 4 cho thấy phương pháp có độ đúng tốt (phần trăm tìm lại đạt từ 98,10% đến 102,14%) với độ lệch chuẩn tương đối (RSD) là 1,38% < 2%.

3.2.6. Khoảng xác định

Từ phần đánh giá độ tuyến tính, độ đúng suy ra khoảng xác định của phương pháp định lượng monotropein trong dược liệu Ba kích là 5,4 µg/ml – 107,4 µg/ml (10% - 200% so với nồng độ định lượng).

4. Kết luận

Phương pháp sắc ký lỏng pha đảo đã được thiết lập để định lượng monotropein trong dược liệu Ba kích. Phương pháp đã xây dựng sử dụng cột Phenomenex Gemini – C18 (250 x 4,6 mm; 5 µm), pha động là hỗn hợp dung môi methanol – acid phosphoric 0,5% (5 : 95), tốc độ dòng 1 ml/phút; Detector DAD ở bước sóng 237 nm. Phương pháp được thẩm định về tính đặc hiệu, độ thích hợp của hệ thống, khoảng xác định, độ tuyến tính, độ lặp lại, độ chính xác trung gian và độ đúng. Kết quả thẩm định cho thấy phương pháp được xây dựng hoàn toàn phù hợp để xác định hàm lượng monotropein trong dược liệu Ba kích.

Tài liệu tham khảo

1. Bộ Y tế (2017), *Dược điển Việt Nam*, Lần xuất bản thứ năm, Nhà xuất bản Y học, Hà Nội.
2. Đỗ Tất Lợi (2006), *Cây thuốc và động vật làm thuốc*, Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật, Hà Nội, tr. 101-106.
3. Phạm Xuân Sinh (2014), *Dược học cổ truyền*, Nhà xuất bản Y học, Hà Nội, tr. 280.
4. Tạ Mạnh Hùng, Đoàn Cao Sơn (2012), “Hướng dẫn thẩm định quy trình phân tích bằng phương pháp HPLC”, *Tạp chí Kiểm nghiệm thuốc*, 10(38), trang 1-8.
5. Chinese Pharmacopoeia Commission(2015), *Pharmacopoeia of the People's Republic of China*.
6. International Conference on Harmonization, *Validation of Analytical Procedure, Text and Methodology Q2 (R1)*, IFMA, Geneva, Switzerland, 2005.

SUMMARY

A reversed-phase liquid chromatography method was developed to assay Monotropein in Radix Morindae officinalis. The method was carried by using a Phenomenex Gemini – C18 (250 x 4.6 mm; 5 μ m) column and a mixture of Methanol and Phosphoric acid 5% (5:95) as mobile phase. The flow rate of mobile phase is maintained at 1.0 ml per minute, injection volume: 10 μ l, analyte was detected by a DAD detector set at 237 nm. The method was validated in specificity, linearity, range, precision and accuracy. Validation results proved that the developed method was suitable for assay of Monotropein in Radix Morindae officinalis.

(Ngày nhận bài: 13/03/2020 ; Ngày phản biện: 21/05/2020 ; Ngày duyệt đăng: 17/06/2020)

ĐỊNH LƯỢNG ĐỒNG THỜI AMLODIPIN, LOSARTAN VÀ ACID LOSARTAN CARBOXYLIC TRONG HUYẾT TƯƠNG NGƯỜI BẰNG PHƯƠNG PHÁP LC-MS/MS

ĐOÀN CAO SƠN, HOÀNG VĂN ĐỨC, PHAN THỊ NGHĨA, TẠ MẠNH HÙNG

Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương

Từ khóa: Amlodipin, losartan, acid losartan carboxylic, tương đương sinh học, huyết tương, LC-MS/MS.

1. Đặt vấn đề

Amlodipin (AML) là một dẫn chất của dihydropyridin, có tác dụng chống tăng huyết áp bằng cách trực tiếp làm giãn cơ trơn quanh động mạch ngoại biên và ít có tác dụng hơn trên kênh calci cơ tim [1]. Losartan (LOS) là chất đối kháng thụ thể AT₁ của angiotensin II, được dùng để điều trị tăng huyết áp. Acid losartan carboxylic (LCA) là chất chuyển hóa chính của losartan, là chất có hoạt tính mạnh hơn từ 10 - 40 lần so với losartan [1]. Ở mức liều sử dụng một viên nén kết hợp 5 mg amlodipin và 50 mg losartan kali, nồng độ tối đa (C_{max}) trong huyết tương người khoảng từ 3 - 5 ng/ml đối với amlodipin; 200 - 300 ng/ml đối với losartan và 400 - 500 ng/ml đối với chất chuyển hóa acid losartan carboxylic. Do sự khác nhau nhiều về các tính chất hóa lý của amlodipin, losartan và chất chuyển hóa acid losartan carboxylic, đồng thời nồng độ của amlodipin rất thấp nên việc xác định nồng độ thuốc trong các mẫu huyết tương người đòi hỏi phải có phương pháp chiết tách phù hợp và phương pháp phân tích có độ nhạy cao. Do vậy, cần xây dựng một phương pháp phân tích phù hợp để xác định được đồng thời nồng độ amlodipin, losartan và acid losartan carboxylic trong các mẫu huyết tương người. Dựa trên nguyên lý hoạt động của phương pháp sắc ký lỏng – khối phổ

(LC-MS/MS), các phương pháp chiết tách và tham khảo tài liệu [4], chúng tôi đã tiến hành nghiên cứu xây dựng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao ghép nối đầu dò khối phổ (UPLC-MS/MS) có đủ độ nhạy, đặc hiệu, chính xác, định lượng được đồng thời amlodipin, losartan và acid losartan carboxylic trong các mẫu huyết tương người.

2. Thực nghiệm

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

2.1.1. Thiết bị, dụng cụ

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

- Máy sắc ký lỏng khối phổ Waters Xevo TQD (Waters – Mỹ);
- Cân phân tích Mettler Toledo (Thụy Sĩ, độ chính xác d = 0,01 mg);
- Tủ lạnh sâu -35 °C $\pm$ 5 °C (Panasonic – Nhật Bản);
- Máy ly tâm lạnh (Sigma 4-16KS – Đức);
- Máy cô bay hơi dung môi dùng khí nitơ, máy lắc xoay, máy lọc nước,...
- Dụng cụ: Bình định mức, pipet loại A, ống ly tâm,...

2.1.2. Hóa chất, chất chuẩn

- Chất chuẩn:

+ Amlodipin besilat – chất chuẩn của Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương, SKS: 0312213.02, hàm lượng 99,68% tính theo nguyên trạng;

+ Losartan kali – chất chuẩn của Viện Kiểm nghiệm thuốc Thành phố Hồ Chí Minh, SKS: QT166060915, hàm lượng 99,45% tính theo nguyên trạng;

+ Acid losartan carboxylic – chất chuẩn của BDG synthesis, SKS: BDG3841.2, hàm lượng 97,4%;

+ Diltiazem HCl – chất chuẩn của Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương, SKS: WS.0108218, hàm lượng 100,85%, độ ẩm 0,3%. Diltiazem được sử dụng làm chất nội chuẩn (IS) của AML trong phương pháp phân tích;

+ Telmisartan – chất chuẩn của Viện Kiểm nghiệm thuốc Thành phố Hồ Chí Minh, SKS: QT217030617, hàm lượng 99,7% tính theo nguyên trạng. Telmisartan được sử dụng làm chất nội chuẩn (IS) của LOS và LCA trong phương pháp phân tích.

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

- *Huyết tương trắng:* Không có AML, LOS, LCA của Viện Huyết học và Truyền máu Trung ương.

2.2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Đối tượng nghiên cứu

Mẫu huyết tương trắng và mẫu huyết tương tự tạo chứa chuẩn AML, LOS, LCA.

2.2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.2.1. Điều kiện sắc ký

- Cột Hypersil Gold C18: 50 x 2,1 mm; 1,9 μ m. Bảo vệ cột: C18, 4 x 3 mm.

- Pha động: Methanol – acid formic 0,1%, tỷ lệ 80 : 20 (v/v).

- Tốc độ dòng: 0,2 ml/phút

- Thể tích tiêm mẫu: 10 μ l

- Nhiệt độ autosampler (buồng tiêm mẫu): 20°C

2.2.2.2. Điều kiện khối phổ

Kiểu khối phổ hai lần (MS/MS), nguồn ion hóa ESI (+). Các thông số của thiết bị khối phổ để phát hiện AML, LOS, LCA và các chất chuẩn nội (IS) được trình bày ở Bảng 1.

Bảng 1. Các thông số của detector khối phổ dùng để định lượng AML, LOS, LCA và chuẩn nội

<i>Hoạt chất</i> <i>Thông số</i>	<i>Amlodipin</i>	<i>Diltiazem</i> <i>(IS)</i>	<i>Losartan</i>	<i>Losartan</i> <i>carboxylic acid</i>	<i>Telmisartan</i> <i>(IS)</i>
Chế độ ion hóa	ESI(+)	ESI(+)	ESI(+)	ESI(+)	ESI(+)
Điện thế ion hóa (kV)	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0
Điện thế chọn lọc (V)	18	18	34	34	34
Nhiệt độ hóa hơi (°C)	400	400	400	400	400
Khí thổi (L/H)	700	700	700	700	700
Khí làm sạch (L/H)	20	20	20	20	20
Năng lượng bắn phá (V)	12	12	22	16	40
Ion ban đầu (m/z)	409,2	415,0	423,10	437,10	515,33
Ion tạo thành (m/z)	238,2	178,0	207,00	207,00	276,20

2.2.2.3. Phương pháp xử lý mẫu

Thêm 50 μ l dung dịch chuẩn nội chứa đồng thời Diltiazem và Telmisartan có nồng độ tương ứng khoảng 250 ng/ml và 5 μ g/ml vào 1 ml mẫu huyết tương (HT) đã đã đông ở nhiệt độ phòng - ống chiết (1). Lắc xoay 5 giây.

- *Chiết lần 1:* Thêm 5 ml dung môi tert-butyl methyl ether vào ống chiết (1) vừa chuẩn bị ở trên. Lắc cơ học ngang 5 phút. Ly tâm 3000 vòng/phút trong 5 phút. Hút 3 ml lớp trên vào ống cô (2).

- *Chiết lần 2:* Thêm 100 μ l dung dịch acid phosphoric 1M vào ống chiết (1) vừa chiết lần 1. Lắc cơ học ngang 5 phút. Ly tâm 3000 vòng/phút trong 5 phút. Hút 0,5 ml lớp trên vào ống cô (2) ở trên, cô bay hơi dung môi. Hòa tan cặn trong 0,5 ml pha động. Tiêm vào hệ thống sắc ký.

2.2.2.4. Phương pháp tính kết quả

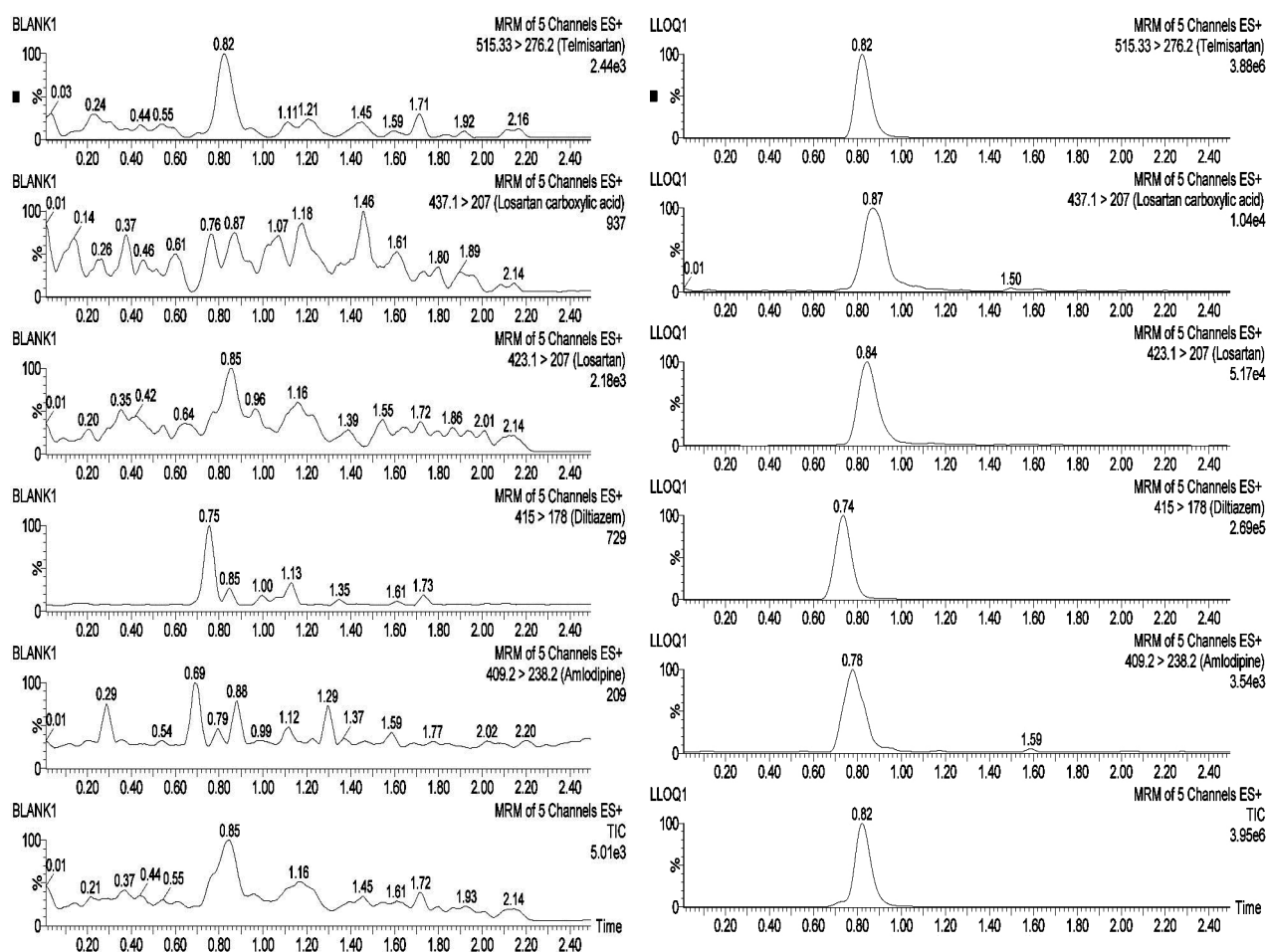
Xác định nồng độ AML, LOS, LCA có trong các mẫu thử (chưa biết nồng độ) dựa vào tỷ lệ diện tích pic tương ứng AML/IS, LOS/IS, LCA/IS thu được từ sắc đồ của mẫu thử và đường chuẩn biểu thị mối tương quan giữa nồng độ AML, LOS, LCA có trong mẫu chuẩn với tỷ lệ diện tích pic tương ứng AML/IS, LOS/IS, LCA/IS phân tích trong cùng điều kiện. Tiến hành thẩm định phương pháp phân tích theo quy định của EMA [2] và US-FDA [3].

3. Kết quả và bàn luận

3.1. Độ đặc hiệu – chọn lọc của phương pháp

Phân tích các mẫu HT trắng và các mẫu HT tự tạo chứa chuẩn nội và AML, LOS, LCA với nồng độ lần lượt khoảng 0,1 ng/ml; 2,5 ng/ml; 2,5 ng/ml theo phương pháp đã được xây dựng.

Trên SKĐ của mẫu HT trắng (Hình 1), tại thời điểm 0,78 phút, 0,74 phút, 0,84 phút, 0,87 phút và 0,82 phút trùng với thời gian lưu của AML, IS-Diltiazem và LOS, LCA, IS-Telmisartan trong mẫu chuẩn (Hình 2) không xuất hiện các pic có mảnh phổ khối $m/z = 409,2 \rightarrow 238,2$ (đặc trưng cho AML), mảnh phổ khối $m/z = 415 \rightarrow 178$ (đặc trưng cho IS-Diltiazem) và mảnh phổ khối $m/z = 423,1 \rightarrow 270$ (đặc trưng cho LOS), mảnh phổ khối $m/z = 437,1 \rightarrow 207$ (đặc trưng cho LCA), mảnh phổ khối $m/z = 515,33 \rightarrow 276,2$ (đặc trưng cho IS-Telmisartan). Do vậy, phương pháp phân tích có độ đặc hiệu - chọn lọc với AML, LOS, LCA và IS theo các quy định của phương pháp phân tích thuốc trong dịch sinh học [2],[3].



Hình 1. Sắc ký đồ mẫu huyết tương trắng

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

3.2. Đường chuẩn và khoảng tuyến tính

Phân tích các mẫu HT chứa chuẩn AML có nồng độ khoảng từ 0,1 ng/ml đến 20 ng/ml, chuẩn LOS có nồng độ khoảng từ 2,5 ng/ml đến 500 ng/ml, chuẩn LCA có nồng độ khoảng từ 2,5 ng/ml đến 500 ng/ml và chuẩn nội tương ứng theo quy trình đã xây dựng. Xác

định sự tương quan giữa nồng độ AML, LOS, LCA có trong mẫu và tỷ lệ diện tích pic tương ứng AML/DIL; LOS/TEL; LCA/TEL bằng phương pháp hồi quy tuyến tính, sử dụng hệ số tỷ trọng ($1/\text{nồng độ}^2$). Kết quả xác định mối tương quan tuyến tính giữa nồng độ và tỷ lệ diện tích pic được trình bày trong Bảng 2, 3 và 4.

Bảng 2. Kết quả thẩm định khoảng tuyến tính của phương pháp (đối với AML)

Mẫu	Nồng độ (ng/ml)	Độ đúng (%)				
		Đường chuẩn 1	Đường chuẩn 2	Đường chuẩn 3	Đường chuẩn 4	Đường chuẩn 5
S1	0,101	96,8	94,4	98,4	102,8	98,8
S2	0,202	110,2	109,3	101,3	90,5	101,5
S3	0,506	89,6	104,7	104,6	107,0	101,0
S4	1,011	103,4	103,1	102,8	106,9	103,8
S5	2,023	97,7	98,1	95,1	100,9	99,7
S6	5,057	96,6	94,6	98,9	92,9	98,1
S7	10,114	102,6	98,1	98,4	99,2	96,7
S8	20,229	103,1	97,8	100,5	99,8	100,6
Phương trình hồi quy ($y = ax + b$)		a = 0,1394	a = 0,1445	a = 0,1446	a = 0,1566	a = 0,1545
		b = 0,0044	b = 0,0041	b = 0,0023	b = 0,0027	b = 0,0019
		r = 0,9975	r = 0,9982	r = 0,9994	r = 0,9977	r = 0,9997

Bảng 3. Kết quả thẩm định khoảng tuyến tính của phương pháp (đối với LOS)

Mẫu	Nồng độ (ng/ml)	Độ đúng (%)				
		Đường chuẩn 1	Đường chuẩn 2	Đường chuẩn 3	Đường chuẩn 4	Đường chuẩn 5
S1	2,5	99,5	98,5	98,9	100,2	97,9
S2	5,0	100,1	104,3	101,0	102,0	103,2
S3	12,6	98,7	96,8	102,1	94,5	101,6
S4	25,1	105,7	100,2	101,9	96,9	102,3
S5	50,3	101,3	101,9	103,6	103,7	102,2
S6	125,7	102,8	95,1	92,0	96,0	92,2
S7	251,3	102,8	100,9	97,1	102,5	98,7
S8	502,7	89,0	102,4	103,5	104,0	101,9
Phương trình hồi quy ($y = ax + b$)		a = 0,0065	a = 0,0066	a = 0,0060	a = 0,0064	a = 0,0059
		b = 0,0006	b = -0,0016	b = -0,0004	b = 0,0007	b = -0,0001
		r = 0,9984	r = 0,9994	r = 0,9990	r = 0,9991	r = 0,9991

Bảng 4. Kết quả thẩm định khoảng tuyến tính của phương pháp (đối với LCA)

Mẫu	Nồng độ (ng/ml)	Độ đúng (%)				
		Đường chuẩn 1	Đường chuẩn 2	Đường chuẩn 3	Đường chuẩn 4	Đường chuẩn 5
S1	2,4	103,2	99,9	98,9	101,1	101,7
S2	4,9	91,1	104,2	101,2	99,5	96,3
S3	12,2	100,6	90,3	102,6	96,4	100,0
S4	24,4	109,9	98,5	99,3	98,1	100,8
S5	48,8	104,8	101,7	104,4	102,7	104,3
S6	122,0	99,3	97,5	94,7	94,6	94,7
S7	243,9	102,9	104,5	98,3	102,8	101,0
S8	487,9	88,2	103,4	100,6	104,8	101,3
Phương trình hồi quy ($y = ax + b$)		a = 0,0017	a = 0,0016	a = 0,0016	a = 0,0017	a = 0,0016
		b = 0,0001	b = 0,0003	b = -0,0002	b = 0,0001	b = -0,0002
		r = 0,9966	r = 0,9986	r = 0,9995	r = 0,9991	r = 0,9993

Kết quả thẩm định cho thấy trong khoảng nồng độ từ 0,1 ng/ml đến 20 ng/ml đối với AML, từ 2,5 ng/ml đến 500 ng/ml đối với LOS, từ 2,5 ng/ml đến 500 ng/ml đối với LCA có sự tương quan tuyến tính giữa nồng độ AML, LOS, LCA với tỷ lệ diện tích pic tương ứng AML/DIL; LOS/TEL; LCA/TEL với hệ số tương quan xấp xỉ bằng 1. Nồng độ AML, LOS, LCA xác định từ đường chuẩn so với giá trị lý thuyết đều đạt xấp xỉ 100% và nằm trong giới hạn cho phép theo qui định của phương pháp phân tích thuốc trong dịch sinh học [2],[3].

3.3. Giới hạn định lượng dưới của phương pháp

Phân tích các mẫu huyết tương trắng và mẫu huyết tương chứa AML, LOS và LCA với nồng độ lần lượt khoảng 0,1 ng/ml; 2,5 ng/ml và 2,5 ng/ml (mẫu LLOQ). Xác định diện tích pic AML, LOS, LCA và chuẩn nội DIL, TEL của các mẫu LLOQ và xác định nồng độ AML, LOS, LCA có trong các mẫu từ đường chuẩn tiến hành làm song song trong cùng điều kiện. Kết quả thẩm định giới hạn định lượng dưới của phương pháp được trình bày ở Bảng 5.

Bảng 5. Kết quả xác định giá trị LLOQ

TT	Tỷ lệ diện tích pic			Nồng độ xác định từ đường chuẩn (ng/ml)			Độ đúng so với nồng độ thực (%)			Tỷ lệ LLOQ/ mẫu trắng		
	AML/ DIL	LOS/ TEL	LCA/ TEL	AML	LOS	LCA	AML	LOS	LCA	AML	LOS	LCA
1	0,017	0,016	0,004	0,087	2,4	2,3	85,7	97,3	96,2	27,9	40,0	34,9
2	0,016	0,017	0,004	0,083	2,5	2,5	82,4	99,3	104,3			
3	0,017	0,017	0,003	0,092	2,5	1,9	90,7	98,5	81,1			
4	0,021	0,018	0,004	0,119	2,6	2,5	117,5	104,5	105,6			
5	0,018	0,014	0,003	0,096	2,0	1,9	95,5	81,0	80,4			
6	0,020	0,016	0,004	0,114	2,3	2,5	112,7	92,3	102,8			
Trung bình (%)							97,4	97,3	94,2			
CV (%)							14,8	9,1	11,2			

Kết quả thẩm định cho thấy tỷ lệ đáp ứng của pic AML, LOS, LCA trong các mẫu LLOQ (nồng độ lần lượt khoảng 0,1 ng/ml; 2,5 ng/ml; 2,5 ng/ml) so với đáp ứng tại thời gian lưu tương ứng trong các mẫu huyết tương trắng đều > 5; tỷ lệ nồng độ AML, LOS, LCA xác định từ đường chuẩn so với nồng độ thực có trong mẫu nằm trong khoảng từ 80 – 120% (trung bình = 97,4% và CV = 14,8% cho AML; trung bình = 97,3% và CV = 9,1% cho LOS; trung bình = 94,2% và CV = 11,2% cho LCA) đáp ứng yêu cầu giới hạn định lượng dưới của phương pháp phân tích thuốc trong dịch sinh học.

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

Tiến hành thẩm định độ đúng, độ lặp lại trên 4 lô mẫu thử LLOQ, LQC, MQC và HQC chứa AML có nồng độ tương ứng là 0,1; 0,3; 8; 16 ng/ml, LOS có nồng độ tương ứng là 2,5; 7,5; 200; 400 ng/ml và LCA có nồng độ tương ứng là 2,5; 7,5; 200; 400 ng/ml. Xác định hàm lượng AML, LOS, LCA có trong mẫu bằng phương pháp đường chuẩn và tỷ lệ % giữa nồng độ xác định được từ đường chuẩn so với nồng độ lý thuyết. Kết quả xác định độ đúng, độ lặp lại của phương pháp được trình bày ở Bảng 6, 7 và 8.

Bảng 6. Kết quả thẩm định độ đúng, độ lặp lại trong ngày và khác ngày (đối với AML)

Độ đúng, Độ lặp lại	Mẫu LLOQ (0,1 ng/ml)		Mẫu LQC (0,3 ng/ml)		Mẫu MQC (8 ng/ml)		Mẫu HQC (16 ng/ml)	
	Độ đúng (%)	Độ lặp lại (CV%)	Độ đúng (%)	Độ lặp lại (CV%)	Độ đúng (%)	Độ lặp lại (CV%)	Độ đúng (%)	Độ lặp lại (CV%)
Trong ngày (n = 6)	116,6	12,7	101,9	14,9	95,1	5,0	97,8	1,5
Khác ngày (n = 5)	100,1	17,4	103,7	8,7	100,0	5,6	101,9	4,5

Bảng 7. Kết quả thẩm định độ đúng, độ lặp lại trong ngày và khác ngày (đối với LOS)

Độ đúng, Độ lặp lại	Mẫu LLOQ (2,5 ng/ml)		Mẫu LQC (7,5 ng/ml)		Mẫu MQC (200 ng/ml)		Mẫu HQC (400 ng/ml)	
	Độ đúng (%)	Độ lặp lại (CV%)	Độ đúng (%)	Độ lặp lại (CV%)	Độ đúng (%)	Độ lặp lại (CV%)	Độ đúng (%)	Độ lặp lại (CV%)
Trong ngày (n = 6)	110,2	4,1	99,7	6,5	107,2	5,1	108,4	7,3
Khác ngày (n = 5)	104,3	6,5	102,7	6,7	100,6	7,2	100,8	7,5

Bảng 8. Kết quả thẩm định độ đúng, độ lặp lại trong ngày và khác ngày (đối với LCA)

Độ đúng, Độ lặp lại	Mẫu LLOQ (2,5 ng/ml)		Mẫu LQC (7,5 ng/ml)		Mẫu MQC (200 ng/ml)		Mẫu HQC (400 ng/ml)	
	Độ đúng (%)	Độ lặp lại (CV%)	Độ đúng (%)	Độ lặp lại (CV%)	Độ đúng (%)	Độ lặp lại (CV%)	Độ đúng (%)	Độ lặp lại (CV%)
Trong ngày (n = 6)	115,3	4,3	101,2	4,0	105,7	7,3	105,2	6,8
Khác ngày (n = 5)	104,9	10,3	100,7	8,0	98,7	7,5	98,6	8,0

Kết quả thẩm định cho thấy ở các khoảng nồng độ thấp; trung bình và cao, phương pháp có độ đúng trong ngày, khác ngày xấp xỉ 100%; độ lặp lại trong ngày, khác ngày với giá trị CV < 15,0% (ngoại trừ mẫu LLOQ với CV < 20%); đáp ứng các yêu cầu về độ đúng, độ lặp lại của phương pháp phân tích thuốc trong dịch sinh học theo hướng dẫn của US-FDA và EMA.

3.5. Độ ổn định của hoạt chất trong huyết tương

Tiến hành nghiên cứu độ ổn định của AML, LOS, LCA trong huyết tương trên các lô mẫu LQC và HQC. Đánh giá độ ổn định của AML, LOS, LCA trong huyết tương bằng cách so sánh nồng độ AML, LOS, LCA có trong mẫu được bảo quản ở những điều kiện nhất định và các mẫu có nồng độ tương ứng được phân tích ngay sau khi chuẩn bị. Kết quả nghiên cứu độ ổn định của AML, LOS, LCA trong huyết tương ở cả hai khoảng nồng độ thấp và cao được trình bày trong Bảng 9.

Bảng 9. Kết quả nghiên cứu độ ổn định của AML, LOS, LCA trong huyết tương

Độ ổn định	Mẫu	Nồng độ ban đầu (ng/ml; n = 6)			Nồng độ sau bảo quản (ng/ml; n = 6)			% sai khác		
		AML	LOS	LCA	AML	LOS	LCA	AML	LOS	LCA
3 chu kỳ đông – rã đông (Three freeze-thaw cycles)	LQC	0,312	7,2	6,6	0,298	7,5	6,3	-4,6	3,7	-4,5
	HQC	14,857	384,0	347,5	14,503	368,5	311,9	-2,4	-4,0	-10,3
Độ ổn định thời gian ngắn (7 giờ; nhiệt độ phòng)	LQC	0,332	7,7	7,0	0,326	6,8	6,0	-1,8	-11,2	-13,6
	HQC	15,154	404,1	366,8	16,113	404,5	382,2	6,3	0,1	4,3
Độ ổn định trong autosampler (72 giờ; 20°C)	LQC	0,322	7,6	7,1	0,301	8,5	8,0	-6,5	12,8	13,2
	HQC	16,182	409,0	397,8	16,912	459,6	455,5	4,5	12,4	14,5
Độ ổn định thời gian dài (103 ngày; -35°C ± 5°C)	LQC	0,312	7,2	6,6	0,350	7,4	7,2	12,2	2,8	9,3
	HQC	14,857	384,0	347,5	15,620	336,3	317,2	5,1	-12,4	-8,7

4. Kết luận

Nghiên cứu đã xây dựng được phương pháp định lượng đồng thời amlodipin, losartan và chất chuyển hóa acid losartan carboxylic trong huyết tương người bằng UPLC/MS-MS với giá trị giới hạn định lượng dưới lần lượt là 0,1 ng/ml, 2,5 ng/ml và 2,5 ng/ml; khoảng tuyến tính từ 0,1 đến 20 ng/ml, 2,5 đến 500 ng/ml và 2,5 ng/ml đến 500 ng/ml; độ đúng cao từ 95,1% đến 116,6%; độ lặp lại với giá trị CV từ 4,0% đến 17,4%, đáp ứng yêu cầu đối với phương pháp phân tích thuốc trong dịch sinh học của US-FDA [3] và EMA [2]. Thời gian phân tích ngắn (3,0 phút cho mỗi mẫu). Phương pháp phân tích có thể ứng dụng trong các nghiên cứu đánh giá tương đương sinh học chế phẩm có chứa hai hoạt chất Amlodipin và Losartan.

Tài liệu tham khảo

1. Bộ Y tế (2015), *Dược thư quốc gia Việt Nam*, Lần xuất bản thứ hai, Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật, trang 187-188; trang 927-928.
2. European Medicines Agency, Committee for Medicinal Products for Human Use (2012). *Guideline on Validation of Bioanalytical Methods*.
3. U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration (2013): *Guidance for Industry - Bioanalytical Method Validation*.
4. Vijaya Kumari Karra, Nageswara Rao Pilli, Jaswanth Kumar Inamadugu, J. V. L. N. Seshagiri Rao (2012), “Simultaneous determination of losartan, losartan acid and amlodipine in human plasma by LC-MS/MS and its application to a human pharmacokinetic study” *Pharmaceutical methods*, Volume 3, Issue 1, Pages 18-25.

SUMMARY

A high throughput and specific method using Ultra Performance Liquid Chromatography tandem Mass Spectrometry for simultaneous determination of Amlodipine, Losartan and Losartan carboxylic acid in human plasma was developed. The Waters Xevo TQD UPLC-MS/MS was operated under the multi reaction-monitoring mode using the positive electrospray ionization technique. Amlodipine, Losartan, Losartan carboxylic acid and internal standard were extracted from human plasma by liquid - liquid extraction technique using Tert-butyl methyl ether. The reconstituted samples were chromatographed on a C18 column (dimension 50 x 2.1 mm, particle 1.9 µm) with isocratic elution at a flow rate of 0.2 ml/min using 0.1% Formic acid – Methanol with suitable ratio. The standard curves were found to be linear in the range 0.1 to 20 ng/ml, 2.5 to 500 ng/ml and 2.5 to 500 ng/ml for Amlodipine, Losartan, Losartan carboxylic acid, respectively, with mean correlation coefficient of ≥ 0.99 for all analysis. The intra-day and inter-day precision and accuracy were within 85% - 115.0%. Total run time was 3.0 min only. This method can be used for BA-BE studies of Amlodipine and Losartan combination preparations.

(Ngày nhận bài: 28/4/2020 ; Ngày phản biện: 06/08/2020 ; Ngày duyệt đăng: 21/08/2020)

XÂY DỰNG VÀ THẨM ĐỊNH QUY TRÌNH ĐỊNH LƯỢNG TRYPSIN TRONG CHẾ PHẨM VIÊN NÉN BAO TAN TRONG RUỘT TRYPSIN - CHYMOTRYPSIN BẰNG PHƯƠNG PHÁP ĐO QUANG ĐỘNG HỌC

HOÀNG XUÂN QUANG

Công ty TNHH Sinh dược phẩm Hera

LÊ VĂN ĐẠT, NGUYỄN THỊ LIÊN

Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương

Từ khóa: Trypsin, định lượng trypsin, đo quang động học, viên nén trypsin - chymotrypsin.

1. Đặt vấn đề

Trypsin là một enzym hỗ trợ tiêu hóa, được tìm thấy trong ruột non của người và một số động vật [2]. Trypsin được chiết xuất từ tuyến tụy của bò hoặc lợn thường được chỉ định trong các trường hợp thiếu hụt enzym này trong hệ tiêu hóa. Nó cũng được dùng kết hợp với bromelain và rutin trong điều trị viêm khớp. Ngoài ra, trypsin còn được kết hợp với chymotrypsin có tác dụng kháng viêm và chống phù nề.

Hiện nay, trên thị trường đã xuất hiện một số chế phẩm kết hợp hai enzym trypsin và chymotrypsin như viên nén bao tan trong ruột trypsin – chymotrypsin. Đây là hai enzym thủy phân protein, hàm lượng dễ bị biến đổi bởi điều kiện môi trường và được định lượng dựa trên nguyên lý của sự biến thiên độ hấp thụ của phản ứng enzym với cơ chất. Vì vậy, để xác định hàm lượng trypsin trong chế phẩm này cần có quy trình phân tích phù hợp và được thẩm định một cách đầy đủ, chính xác. Dược điển Mỹ 41 có chuyên luận nguyên liệu trypsin. Tuy nhiên, trong các dược điển đều chưa có chuyên luận về thành phẩm trypsin và dạng kết hợp hai enzym trypsin và chymotrypsin. Vì vậy, chúng tôi tiến hành nghiên cứu xây dựng và thẩm định quy trình định lượng trypsin trong viên nén bao tan trong ruột trypsin – chymotrypsin nhằm đưa ra phương pháp có thể dùng để định lượng trypsin trong viên nén kết hợp 2 enzym trypsin và chymotrypsin.

2. Thực nghiệm

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

2.1.1. Thiết bị, dụng cụ

Đã được hiệu chuẩn theo ISO/IEC 17025 và GLP.

- Máy quang phổ UV-VIS Shimadzu 2600;
- Cân phân tích Sartorius CP224S, độ chính xác 0,1 mg;
- Cân phân tích Mettler MS105, độ chính xác 0,01 mg;

- Bể ổn nhiệt Labec;
- Bộ Micropipette eppendorf;
- Các dụng cụ thủy tinh chính xác: bình định mức, pipet,...

2.1.2. Hóa chất, dung môi, chất chuẩn

- Kali dihydrophosphat (KH_2PO_4) loại PA (Merck);
- Dinatri hydrophosphat khan (Na_2HPO_4) loại PA (Merck);
- N-benzoyl-L-arginin ethyl ester hydroclorid (Sigma);
- Acid hydrocloric 37% loại PA (Fisher chemical);
- Chất chuẩn trypsin crystallized USP, lô: J0L380, hàm lượng: 3369 đơn vị USP/mg, hàm ẩm: 0,96%.

2.2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Đối tượng nghiên cứu

- **Mẫu thử:** Viên nén bao tan trong ruột trypsin – chymotrypsin (trypsin 31,35 mg tương đương 85800 đơn vị USP và chymotrypsin 10,45 mg tương đương 14300 đơn vị USP).

- **Nơi sản xuất:** Công ty TNHH sinh Dược phẩm HERA.

- **Mẫu placebo:** Bao gồm các thành phần như công thức bào chế nhưng không có trypsin. Công thức mẫu placebo trong một viên gồm: Chymotrypsin 10,45 mg; cellulose vi tinh thể (MCC 102) 65,2 mg; crospovidon XL 6 mg; magnesi stearat 2 mg. Khối lượng nhân viên là 115 mg.

2.2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.2.1. Chuẩn bị thuốc thử

- **Dung dịch A:** Hòa tan 4,54 g kali dihydrophosphat (TT) trong 500 ml nước.
- **Dung dịch B:** Hòa tan 4,73 g dinatri hydrophosphat khan (TT) trong 500 ml nước.
- **Dung dịch đệm phosphat pH 7,6:** Trộn 13 ml dung

dịch A với 87 ml dung dịch B, khuấy đều. Điều chỉnh về pH 7,6 (nếu cần) bằng một trong hai dung dịch A hoặc dung dịch B.

- *Dung dịch HCl 0,001 N*: Hòa tan 1,0 ml dung dịch HCl 1 N với nước vừa đủ 1000 ml.

- *Dung dịch cơ chất*: Hòa tan khoảng 85,7 mg N-benzoyl-L-arginin ethyl ester hydroclorid (loại thích hợp để dùng định lượng enzym trypsin) trong nước vừa đủ 100 ml. Hút 10 ml dung dịch này pha loãng bằng dung dịch đệm phosphat pH 7,6 vừa đủ 100 ml. Xác định độ hấp thụ của dung dịch này bằng cách đo độ hấp thụ ở bước sóng 253 nm với cốc đo 1 cm, duy trì nhiệt độ cốc đo ở $25 \pm 0,1^{\circ}\text{C}$, sử dụng nước làm mẫu trắng. Điều chỉnh độ hấp thụ của dung dịch cơ chất trong khoảng từ 0,575 - 0,585 (nếu ngoài khoảng này thì điều chỉnh bằng dung dịch đệm phosphat pH 7,6 hoặc dung dịch cơ chất đậm đặc) với mẫu trắng là nước. Sử dụng dung dịch cơ chất này trong vòng 2 giờ.

2.2.2.2. Phương pháp xử lý mẫu

Chuẩn bị dung dịch thử: Lấy 20 viên bỏ lớp bao phim, cân và xác định khối lượng trung bình, nghiền thành bột mịn. Cân chính xác khoảng 55 mg bột viên, hòa tan trong dung dịch HCl 0,001 N vừa đủ 200 ml. Lọc, bỏ 20 ml dịch lọc đầu. Hút 5 ml dịch lọc, pha loãng vừa đủ 20 ml bằng dung dịch HCl 0,001 N (dung dịch này có nồng độ khoảng 50 đơn vị trypsin USP trong 1 ml).

2.2.2.3. Quy trình phân tích

Định lượng bằng máy quang phổ tử ngoại thích hợp, có hệ thống điều nhiệt để duy trì nhiệt độ buồng chứa cốc đo ở $25 \pm 0,1^{\circ}\text{C}$. Xác định nhiệt độ trong cốc đo trước và sau khi đo độ hấp thụ để đảm bảo nhiệt độ không thay đổi quá $0,5^{\circ}\text{C}$.

Hút chính xác 0,2 ml dung dịch HCl 0,001 N và 3,0 ml dung dịch cơ chất vào cốc đo dày 1 cm, lắc đều. Đặt cốc đo vào máy quang phổ tử ngoại và điều chỉnh để có độ hấp thụ là 0,050 ở 253 nm.

Hút chính xác 0,2 ml dung dịch thử và 3,0 ml dung dịch cơ chất cho vào cốc đo dày 1 cm, lắc đều. Đặt cốc đo vào máy quang phổ tử ngoại và bắt đầu ghi thời gian phản ứng ngay sau khi thêm dung dịch cơ chất. Đo độ hấp thụ sau mỗi 30 giây trong ít nhất 5 phút. Lặp lại thí nghiệm cùng độ pha loãng ít nhất một lần.

Từ đồ thị biểu diễn mối tương quan giữa độ hấp thụ và thời gian, tính hoạt lực trypsin (lưu ý chỉ sử dụng các giá trị cho thấy mối tương quan tuyến tính). Nếu tốc độ suy giảm độ hấp thụ không hằng định trong 3 phút, thì

lặp lại thí nghiệm hoặc sử dụng nồng độ mẫu thử loãng hơn (nếu cần).

2.2.2.4. Tính kết quả

Một đơn vị trypsin USP là hoạt tính làm thay đổi 0,003 đơn vị độ hấp thụ trong mỗi phút với các điều kiện quy định của phương pháp định lượng này.

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

$$X(\%) = \frac{(A_t - A_0) \times D \times M \times 100}{T \times 0,003 \times m_t \times 0,2 \times L}$$

Trong đó :

A_0 và A_t : Độ hấp thụ ở thời điểm đầu và cuối trong khoảng biến thiên độ hấp thụ tuyến tính

T : Khoảng thời gian độ hấp thụ biến thiên từ A_0 đến A_t (phút)

D : Độ pha loãng của mẫu thử

m_t : Khối lượng mẫu thử (mg)

M : Khối lượng trung bình viên (mg)

L : Hàm lượng ghi trên nhãn của viên (đơn vị/viên)

3. Kết quả và bàn luận

3.1. Độ đặc hiệu

- *Dung dịch chuẩn*: Cân 50,5 mg chất chuẩn trypsin USP hòa tan trong dung dịch HCl 0,001 N vừa đủ 100 ml. Lọc, bỏ 20 ml dịch lọc đầu. Hút chính xác 3 ml dịch lọc pha loãng vừa đủ 100 ml bằng dung dịch HCl 0,001 N.

- *Dung dịch thử*: Cân 56,2 mg bột viên, hòa tan trong dung dịch HCl 0,001 N vừa đủ 200 ml. Lọc, bỏ 20 ml dịch lọc đầu. Hút chính xác 5 ml dịch lọc pha loãng vừa đủ 20 ml bằng dung dịch HCl 0,001 N.

- *Dung dịch placebo*: Cân khoảng 42,0 mg bột placebo (chứa tất cả các thành phần theo công thức bào chế trừ trypsin), hòa tan trong dung dịch HCl 0,001 N vừa đủ 200 ml. Lọc, bỏ 20 ml dịch lọc đầu. Hút chính xác 5 ml dịch lọc pha loãng vừa đủ 20 ml bằng dung dịch HCl 0,001 N.

Tiến hành định lượng trypsin có trong dung dịch placebo, dung dịch chuẩn và dung dịch thử theo quy trình phân tích đã nêu ở mục 2.2.2.3.

Dung dịch chuẩn và dung dịch thử đều làm tăng độ hấp thụ của phép thử. Dung dịch placebo có làm tăng độ hấp thụ của phép thử, tuy nhiên ảnh hưởng này $< 2,0\%$. Kết quả được trình bày ở Bảng 1 và Bảng 2. Như vậy, phương pháp phân tích đã xây dựng có độ đặc hiệu để định lượng trypsin trong chế phẩm viên nén bao tan trong ruột trypsin - chymotrypsin.

Bảng 1. Chênh lệch độ hấp thụ của phép thử khi thêm dung dịch chuẩn, thử và placebo

<i>STT</i>	<i>Dung dịch</i>	A_0	A_t	$A_t - A_0$
1	Dung dịch placebo	0,0422	0,0424	0,0002
2	Dung dịch thử	0,0970	0,1859	0,0889
3	Dung dịch chuẩn	0,0969	0,1877	0,0908

Bảng 2. Ảnh hưởng của mẫu giả dược (placebo) đối với sự chênh lệch độ hấp thụ

<i>STT</i>	<i>m (mg)</i>	<i>T</i>	A_0	A_t	$A_t - A_0$	% ảnh hưởng	% ảnh hưởng
1	42,5	60-240	0,0464	0,0459	-0,0005	-0,51	0,51
2	41,9	60-240	0,0422	0,0424	0,0002	0,21	0,21
3	43,0	60-240	0,0433	0,0431	-0,0002	-0,20	0,20
4	41,8	60-240	0,0415	0,0401	-0,0014	-1,45	1,45
5	42,1	60-240	0,0436	0,0423	-0,0013	-1,34	1,34
6	42,5	60-240	0,0423	0,0417	-0,0006	-0,61	0,61
Trung bình							0,72%

Kết quả khảo sát độ đặc hiệu cho thấy: dung dịch thử và dung dịch chuẩn làm tăng độ hấp thụ của cơ chất theo thời gian trong khi dung dịch placebo làm thay đổi không đáng kể độ hấp thụ của dung dịch cơ chất. Ảnh hưởng của mẫu placebo là $0,72\% < 2,0\%$. Như vậy phương pháp phân tích đạt về tính đặc hiệu để định lượng trypsin [1].

3.2. Độ thích hợp của hệ thống

Tiến hành định lượng lặp lại 6 lần dung dịch chuẩn trypsin ở mục 3.1. Ghi lại sự biến thiên độ hấp thụ của phép thử. Kết quả được trình bày ở Bảng 3.

Bảng 3. Kết quả khảo sát độ thích hợp của hệ thống

<i>STT</i>	A_0	A_t	$A_t - A_0$
1	0,0969	0,1877	0,0908
2	0,0987	0,1907	0,0920
3	0,0990	0,1886	0,0896
4	0,1016	0,1917	0,0901
5	0,1050	0,1978	0,0928
6	0,0962	0,1844	0,0882
Trung bình = 0,0906; n = 6; RSD = 1,84%			

Kết quả cho thấy hệ thống quang phổ có độ lặp lại tốt với RSD của chênh lệch độ hấp thụ là $1,84\% (< 2,0\%)$. Như vậy, hệ thống sử dụng phù hợp cho việc định lượng trypsin trong chế phẩm [1].

3.3. Khoảng tuyến tính

Khảo sát trên 6 dung dịch chuẩn với 6 nồng độ khác nhau 40%, 60%, 80%, 100%, 120% và 160% so với nồng độ định lượng.

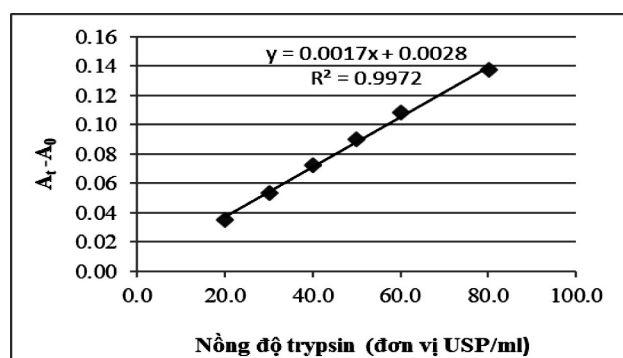
- *Dung dịch chuẩn gốc*: Cân 60,0 mg chuẩn trypsin USP hòa tan trong dung dịch HCl 0,001 N vừa đủ 200 ml.

- *Dãy dung dịch chuẩn*: Lần lượt hút 2,0 ml; 3,0 ml; 4,0 ml; 5,0 ml; 6,0 ml và 8,0 ml dung dịch chuẩn gốc pha loãng vừa đủ 100 ml bằng dung dịch HCl 0,001 N.

Tiến hành định lượng theo quy trình phân tích ở mục 2.2.2.3. Kết quả được thể hiện ở Bảng 4 và Hình 1.

Bảng 4. Kết quả khảo sát khoảng tuyến tính

STT	% so với nồng độ định lượng	Nồng độ trypsin (đơn vị USP/ml)	A_0	A_t	$A_t - A_0$
1	40	20,02	0,0704	0,1057	0,0353
2	60	30,03	0,0809	0,1345	0,0536
3	80	40,04	0,0889	0,1613	0,0724
4	100	50,05	0,0978	0,1877	0,0899
5	120	60,06	0,1084	0,2165	0,1081
6	160	80,08	0,1229	0,2602	0,1373
Phương trình hồi quy: $y = 0,0017x + 0,0028$ Hệ số tương quan (r) = 0,9986					



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

Trong khoảng nồng độ từ 20,02 đến 80,08 đơn vị trypsin USP/ml có sự tương quan tuyến tính chặt chẽ

giữa nồng độ và chênh lệch độ hấp thụ với hệ số tương quan $r = 0,9986$

3.4. Độ đúng

Chuẩn bị mẫu tự tạo: Cân lần lượt khoảng 9,5 mg; 12,0 mg và 15,0 mg chuẩn trypsin tương ứng với 3 mức nồng độ 80%, 100% và 120% so với nồng độ định lượng vào bình định mức 200 ml chứa khoảng 42 mg placebo, hòa tan bằng dung dịch HCl 0,001 N vừa đủ đến vạch. Lọc, bỏ 20 ml dịch lọc đầu. Hút chính xác 5 ml dịch lọc, pha loãng vừa đủ 20 ml bằng dung dịch HCl 0,001 N. Tại mỗi mức nồng độ, thực hiện 3 mẫu độc lập.

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

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

STT	% so với định lượng	Khối lượng placebo (mg)	Khối lượng trypsin chuẩn thêm vào (mg)	Nồng độ trypsin thêm vào (đơn vị USP/ml)	$A_t - A_0$	Nồng độ trypsin tìm lại (đơn vị USP/ml)	Tỷ lệ thu hồi (%)	Trung bình (%)
1.	80%	41,8	9,65	40,25	0,0694	38,56	95,79	95,80% RSD = 0,49%
2.	80%	42,5	9,45	39,41	0,0683	37,94	96,27	
3.	80%	42,1	9,99	41,67	0,0715	39,72	95,33	
4.	100%	42,3	11,95	49,84	0,0861	47,83	95,97	97,13% RSD = 1,37%
5.	100%	41,9	12,05	50,26	0,0876	48,67	96,83	
6.	100%	43,1	12,58	52,47	0,0931	51,72	98,58	
7.	120%	41,5	14,54	60,64	0,1044	58,00	95,64	95,87% RSD = 1,00%
8.	120%	42,7	15,01	62,60	0,1071	59,50	95,04	
9.	120%	43,9	15,05	62,77	0,1095	60,83	96,91	
Trung bình = 96,26%; n = 9; RSD = 1,07%								

Kết quả thu được ở Bảng 5 cho thấy tỉ lệ thu hồi trypsin đạt từ 95,04% đến 98,58% và RSD nhỏ hơn 5,0% phù hợp cho một phương pháp định lượng các hoạt chất có nguồn gốc sinh học [3].

3.5. Độ chính xác

3.5.1. Độ lặp lại

Tiến hành định lượng trypsin trong viên nén bao tan trong ruột trypsin – chymotrypsin trên 6 dung dịch thử

được chuẩn bị theo mục 2.2.2.2 và quy trình phân tích ở mục 2.2.2.3. Kết quả được trình bày ở Bảng 6 cho thấy phương pháp có độ lặp lại tốt với RSD là 0,5% (< 5%).

3.5.2. Độ chính xác trung gian

Kiểm nghiệm viên 2 tiến hành định lượng trypsin trên cùng một mẫu chế phẩm vào ngày khác. Cách tiến hành như phần độ lặp lại. Kết quả được trình bày ở Bảng 6.

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

STT	Ngày 1, Kiểm nghiệm viên 1			Ngày 2, Kiểm nghiệm viên 2		
	Lượng cân mẫu thử (mg)	$A_t - A_0$	Hàm lượng (%)	Lượng cân mẫu thử (mg)	$A_t - A_0$	Hàm lượng (%)
1	56,2	0,0889	93,08	60,2	0,0978	95,48
2	55,1	0,0881	94,09	59,5	0,0963	95,12
3	54,5	0,0874	94,37	57,9	0,0932	94,60
4	55,4	0,0880	93,47	57,1	0,0917	94,39
5	54,0	0,0858	93,50	56,5	0,0911	94,76
6	54,2	0,0862	93,59	56,8	0,0911	94,26
Trung bình = 93,68%; n = 6; RSD = 0,50%				Trung bình = 94,77%; n = 6; RSD = 0,49%		
Hàm lượng trung bình = 94,23%; n = 12; RSD = 0,76%						

Kết quả cho thấy phương pháp định lượng trypsin có độ chính xác cao với độ lặp lại trong ngày là 0,50% và 0,49% (n = 6), độ lặp lại khác ngày là 0,76% (n = 12).

3.6. Khoảng xác định

Từ kết quả độ đúng và độ tuyến tính suy ra khoảng xác định của phương pháp từ 39,41 đến 62,77 đơn vị trypsin USP/ml.

4. Kết luận

Qua khảo sát chúng tôi đã xây dựng và thẩm định được phương pháp định lượng trypsin trong chế phẩm viên nén bao tan trong ruột có chứa trypsin và chymotrypsin bằng phương pháp đo quang động học. Nguyên lý của phương pháp dựa vào sự biến thiên độ hấp thụ của hỗn hợp phản ứng enzym trypsin với cơ chất N-benzoyl-L-arginin ethyl ester hydroclorid theo thời gian tại bước sóng 253 nm, nhiệt độ $25^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$. Phương pháp được thẩm định về tính đặc hiệu, độ thích hợp của hệ thống, khoảng tuyến tính, khoảng xác định, độ đúng, độ lặp lại và độ chính xác trung gian. Kết quả thẩm định cho thấy phương pháp hoàn toàn phù hợp cho việc định lượng trypsin trong viên nén bao tan trong ruột trypsin - chymotrypsin và có thể áp dụng định lượng chất này trong các chế phẩm viên nén đơn thành phần chứa trypsin hoặc chứa đồng thời trypsin và chymotrypsin.

Tài liệu tham khảo

1. Cục quản lý Dược – Bộ Y tế (2018), *Thông tư số 32/2018/TT-BYT ngày 12/11/2018 của Bộ Y tế Quy định việc đăng ký lưu hành thuốc, nguyên liệu làm thuốc*.
2. The U.S Pharmacopeial Convention (2018), *United states Pharmacopoeia 41*.
3. U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research Center for Veterinary Medicine (2018): *Bioanalytical Method Validation Guidance for Industry*.

SUMMARY

The method for determining the activity of Trypsin in enteric coated Trypsin - Chymotrypsin tablet by the reaction with N-Benzoyl-L-arginine ethyl ester hydrochloride and Kinetic Spectrophotometry method was developed. The Trypsin unit was calculated based on rate of absorbance change within 3 minutes at 253 nm, $25^{\circ} \pm 0.5^{\circ}$ C. The method was validated in specificity, linearity, range, accuracy and precision. The results showed that the method had linear over the concentration range of 20.02 – 80.08 USP unit/ml; the accuracy were within 95.04% - 98.58%; precision had RSD < 5%. Validation results proved that the method was suitable for assay for Trypsin in enteric coated Trypsin - Chymotrypsin tablet.

(Ngày nhận bài: 30/11/2019 ; Ngày phản biện: 20/02/2020 ; Ngày duyệt đăng: 24/03/2020)

NGHIÊN CỨU CHIẾT XUẤT, PHÂN LẬP VÀ TINH CHẾ GRACILLIN TỪ THÂN RỄ CÂY BẢY LÁ MỘT HOA (*Paris polyphylla* var. *chinensis* Smith.)

THÁI NGUYỄN HÙNG THU

Trường Đại học Dược Hà Nội

ĐỖ THỊ HÀ

Viện Dược liệu

CAO NGỌC ANH

Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương

Keywords: *Paris polyphylla* var. *chinensis*, phân lập, tinh chế, gracillin.

1. Đặt vấn đề

Gracillin là diosgenin-3-O- β -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 3)-[α -L-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)]- β -D-glucopyranosid. Gracillin có trong thành phần của dược liệu Bảy lá một hoa (*Paris polyphylla* var. *chinensis* Smith. Trilliaceae) [4],[6], một dược liệu được biết đến với các tác dụng dược lý như ức chế enzym tyrosinase và chống bệnh Leishmania [2], cầm máu trong bệnh chảy máu bất thường ở tử cung, kháng khuẩn, ức chế tổn thương ở dạ dày,... đặc biệt là tác dụng chống ung thư và ức chế sự phát triển của khối u [7],[8].

Gracillin đã được chứng minh là có tác dụng gây chết dòng tế bào bạch cầu của người (HL60) thông qua stress oxy hóa và ngừng chu kỳ tế bào của G1 [2]; gây độc tế bào đối với hầu hết các dòng tế bào ở mức vi phân tử, nhưng không có hoạt tính chống lại EKVX (ung thư phổi không phải tế bào nhỏ), HT29 (ung thư đại tràng), OVCAR-5 (ung thư buồng trứng) và SN12C (ung thư thận) [3]. Ngoài ra, gracillin còn có tác dụng kháng ký sinh trùng *Ichthyophthirius multifiliis* ở nồng độ 4,5 mg/l [5],[7].

Nhằm góp phần phục vụ công tác kiểm tra và đánh giá chất lượng dược liệu và các sản phẩm từ cây Bảy lá một hoa tại Việt Nam, chúng tôi tiến hành nghiên cứu chiết xuất, phân lập và tinh chế gracillin từ thân rễ cây Bảy lá một hoa (*Paris polyphylla* var. *chinensis* Smith.).

2. Thực nghiệm

2.1. Thiết bị, hóa chất, chất chuẩn

2.1.1. Thiết bị

Sử dụng các thiết bị phân tích của Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương đã được hiệu chuẩn, đáp ứng yêu cầu của ISO/IEC 17025 và GLP; các trang thiết bị chiết xuất, phân lập và đo phổ của Viện Dược liệu, Viện Hóa học và Viện Hóa Sinh biển - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam, bao gồm:

- Máy cất quay Buchi Rotavapor R-220 (Thụy sỹ);
- Tủ sấy UFB 500 (Mettler, Đức);
- Cân phân tích MS105 độ chính xác 0,01 mg (Mettler, Thụy Sĩ);
- Hệ thống máy sắc ký lỏng hiệu năng cao HPLC Agilent 1260, cột Phenomenex Luna C₁₈ (150 $\times$ 4,6 mm; 5 μ m);
- Máy quang phổ UV-VIS U-1900 (Hitachi, Nhật Bản);
- Máy cộng hưởng từ hạt nhân Bruker Avance AM500FT- NMR (Bruker BioSpin, Thụy Sĩ);
- Máy đo phổ khối APCI-MS Varian Agilent 1100LC-MSD (Agilent Technologies, Mỹ);
- Các dụng cụ cần thiết khác trong quá trình thí nghiệm.

2.1.2. Hóa chất và dung môi

- Dung môi, hóa chất tinh khiết phân tích dùng để chiết xuất và phân lập: ethanol (EtOH) 70%, ethyl acetat (EtOAc), methanol, butanol (n-BuOH), dicloromethan (DCM), cloroform, acid phosphoric, nước cất (H₂O),

silica gel phathuận (40 - 63 μm , Merck), silica gel pha đảo RP-18 (30 - 50 μm , FujiSilica Chemical Ltd). Bản mỏng tráng sẵn DC-Alufoilen 60 F₂₅₄ (silica gel; 0,25 mm; Merck) và bản mỏng pha đảo RP-18 F₂₅₄ (0,25 mm; Merck), dung dịch acid sulfuric 10% trong ethanol 96%.

- Dung môi tinh khiết HPLC: Acetonitril (Merck), methanol (Merck), nước cất hai lần.

2.1.3. Chất chuẩn

Chất chuẩn gracillin được cung cấp bởi Shanghai yuanye Bio-Technology Co., Ltd, (Trung Quốc), số lô CFO227QC14, hàm lượng 96,8%, độ ẩm 1,12%.

2.2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Đối tượng nghiên cứu

Thân rễ cây Bầy lá một hoa thu hái vào tháng 11/2017 tại Lào Cai và được định danh tên khoa học là: *Paris polyphylla* var. *chinensis* Smith. Trilliaceae. Mẫu tươi thu hái được rửa sạch, để ráo nước, sấy ở nhiệt độ 55°C đến khô giòn, sau đó xay thành bột thô, sấy ở nhiệt độ 55°C đến khối lượng không đổi.

2.2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.2.1. Phương pháp chiết xuất, phân lập và tinh chế

Bột thân rễ cây Bầy lá một hoa được chiết hồi lưu bằng ethanol 70% và cất thu hồi dung môi dưới áp suất giảm. Phân tán cao ethanol trong nước, chiết với butanol và cất loại dung môi dưới áp suất giảm. Cao butanol được phân tách bằng sắc ký cột silica gel. Tinh chế phân đoạn có chứa gracillin bằng sắc ký cột silica gel và có thể cả sắc ký cột pha đảo (nếu cần) để thu được gracillin tinh khiết.

2.2.2.2. Định tính và xác định cấu trúc

Chất gracillin đã chiết xuất, phân lập và tinh chế được định tính, đối chiếu với gracillin chuẩn bằng các phương pháp: TLC, HPLC, IR và UV.

Phân tích dữ liệu phổ UV, phổ IR, phổ cộng hưởng từ hạt nhân (NMR), phổ khối (MS) và so sánh với dữ liệu phổ của gracillin trong các tài liệu tham khảo để khẳng định cấu trúc hóa học của gracillin tinh chế.

2.2.2.3. Kiểm tra chất lượng của gracillin đã tinh chế

a. Định tính

- Phổ hồng ngoại: Tiến hành theo Dược điển Việt Nam V, Phụ lục 4.2.

- Phương pháp HPLC: So sánh thời gian lưu và phổ UV-VIS của pic gracillin trên sắc ký đồ của dung dịch pha từ gracilin tinh chế được với thời gian lưu và phổ UV-VIS của pic gracillin trên sắc ký đồ của dung dịch chuẩn.

b. Định lượng

Tiến hành bằng phương pháp HPLC [1], với các điều kiện sắc ký như sau:

- Cột Phenomenex Luna C₁₈ (150 × 4,6 mm; 5 μm).

- Pha động: ACN - Dung dịch H₃PO₄ 0,1% với chương trình sắc ký:

Thời gian (phút)	Acetonitril (%)	Dung dịch acid phosphoric 0,1% (%)
0	45	55
15	55	45
16	45	55
20	45	55

- Detector: 203 nm; Tốc độ dòng: 1 ml/phút; Thể tích tiêm: 10 μl .

- Dung dịch thử, dung dịch chuẩn: Chuẩn bị các dung dịch chuẩn, dung dịch thử trong methanol có nồng độ gracillin chính xác khoảng 0,4 mg/ml.

c. Mật khối lượng do làm khô

Phương pháp TGA (Dược điển Việt Nam V, Phụ lục 6.12).

Chương trình gia nhiệt: Từ 25°C đến 105°C, tốc độ gia nhiệt 10°C/phút, giữ ở 105°C trong 180 phút. Cân chính xác khoảng 4 - 5 mg chế phẩm.

d. Nhiệt độ nóng chảy

Tiến hành theo Dược điển Việt Nam V, Phụ lục 6.7 - Phương pháp 1.

3. Kết quả và bàn luận

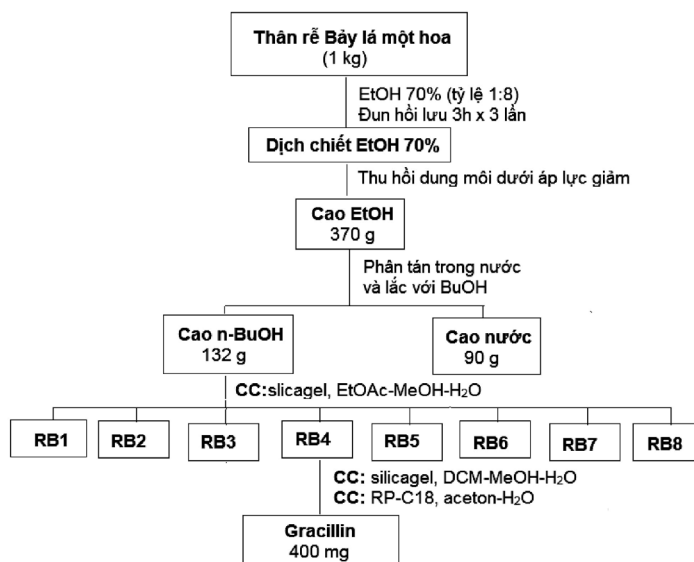
3.1. Chiết xuất, phân lập

1 kg bột thân rễ cây Bầy lá một hoa được chiết hồi lưu bằng ethanol 70% (tỷ lệ 1:8) 3 giờ x 3 lần. Gộp các dịch chiết, lọc và cất thu hồi dung môi dưới áp suất giảm thu được 370 g cao ethanol. Phân tán cao trong nước và chiết phân bố với butanol (tỷ lệ 1:1), 3 lần. Gộp các dịch chiết và cất thu hồi dung môi dưới áp suất giảm thu được 132 g cao butanol và cồn nước. Cao butanol được phân tách bằng sắc ký cột silica gel (chiều dài cột = 90 cm, đường kính cột = 12,5 cm, chiều cao lớp silica gel = 20 cm), rửa giải bằng hỗn hợp dung môi ethyl acetat - methanol - nước với tỷ lệ thay đổi từ 80:15:5 (tt/tt/tt) đến 0:100:0 (tt/tt/tt) (Bảng 1) thu được 8 phân đoạn (RB1 đến RB8). Sử dụng phương pháp sắc ký lớp mỏng với hệ dung môi khai triển là cloroform - ethyl acetat - methanol - nước (20:40:20:10, tt/tt/tt/tt), đối chiếu với chất chuẩn gracillin đã xác định được hợp chất này có mặt trong phân đoạn RB4.

Bảng 1. Hệ dung môi rửa giải cao butanol phân lập gracillin

<i>Ethyl acetat (%)</i>	<i>Methanol (%)</i>	<i>Nước (%)</i>	<i>Thể tích (lít)</i>
80	15	5	8
75	20	5	4
70	25	5	4
65	30	5	4
0	100	0	2

Tinh chế phân đoạn RB4 bằng sắc ký cột silica gel, rửa giải bằng 5 lít hỗn hợp dung môi dicloromethan - methanol - nước (80:19:1, tt/tt/tt). Tiếp tục tinh chế bằng sắc ký cột pha đảo RP-18 với 1,5 lít hỗn hợp dung môi rửa giải acetone - nước (60:40, tt/tt) thu được 400 mg hợp chất gracillin dưới dạng bột màu trắng với độ tinh khiết 96,1% tính theo % diện tích pic bằng phương pháp HPLC.

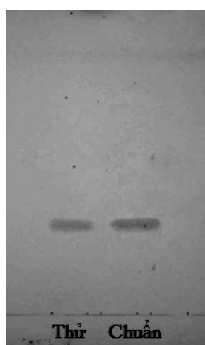


Hình 1. Sơ đồ chiết xuất, phân lập, tinh chế gracillin từ bột thân rễ Báy lá một hoa

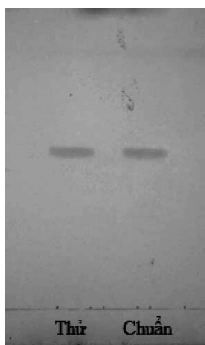
3.2. Định tính và xác định cấu trúc

3.2.1. Sắc ký lớp mỏng

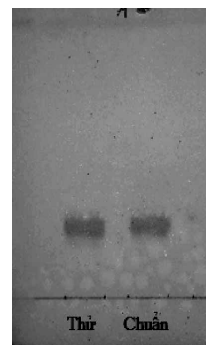
Trên 3 hệ dung môi khai triển khác nhau, gracillin tinh chế được chỉ cho 1 vết duy nhất có màu sắc và giá trị R_f phù hợp với vết của gracillin trên sắc ký đồ của dung dịch đối chiếu (Hình 2).



Ethyl acetat - methanol - nước
(85:15:5, tt/tt/tt)



Cloroform - ethyl acetat - methanol - nước
(20:40:20:10, tt/tt/tt/tt)

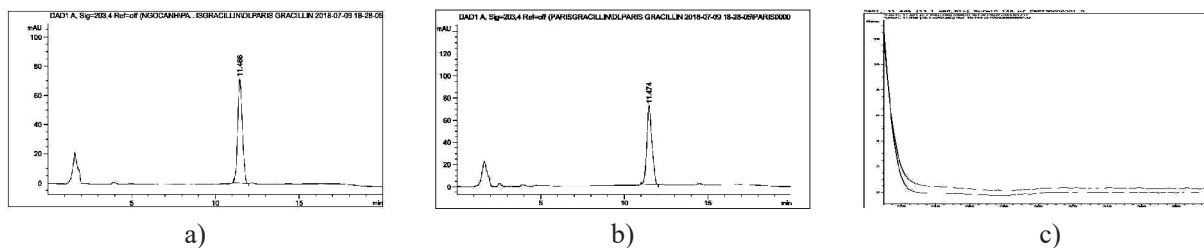


Methanol - nước
(85:15, tt/tt)

Hình 2. Sắc ký đồ so sánh gracillin tinh chế và gracillin đối chiếu trên các hệ dung môi khác nhau

3.2.2. Sắc ký lỏng hiệu năng cao

Tiến hành theo phương pháp được mô tả ở mục 2.2.2.3. Thời gian lưu và phổ UV-VIS của pic gracillin trên sắc ký đồ của dung dịch thử pha từ gracillin tinh chế được tương ứng với thời gian lưu và phổ UV-VIS của pic gracillin trên sắc ký đồ của dung dịch chuẩn (Hình 3).



Hình 3. Sắc ký đồ của gracillin chuẩn và gracillin tinh chế

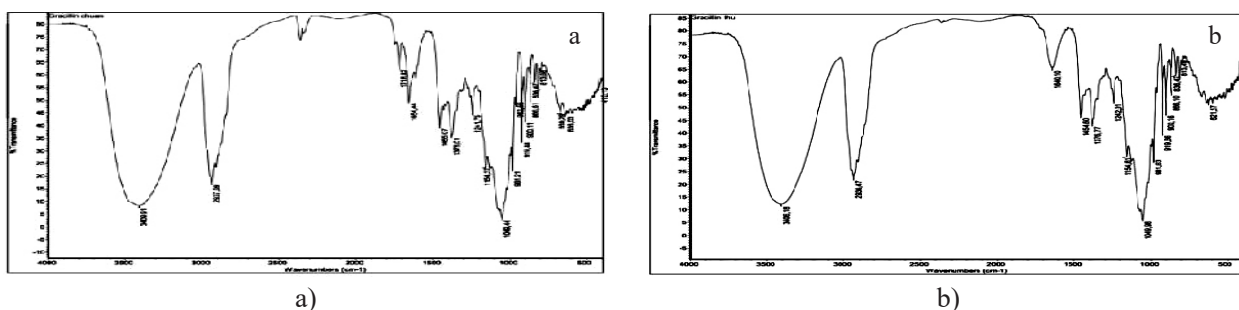
a) Gracillin chuẩn

b) Gracillin tinh chế được

c) Kết quả chồng phổ

3.2.3. Phổ hồng ngoại

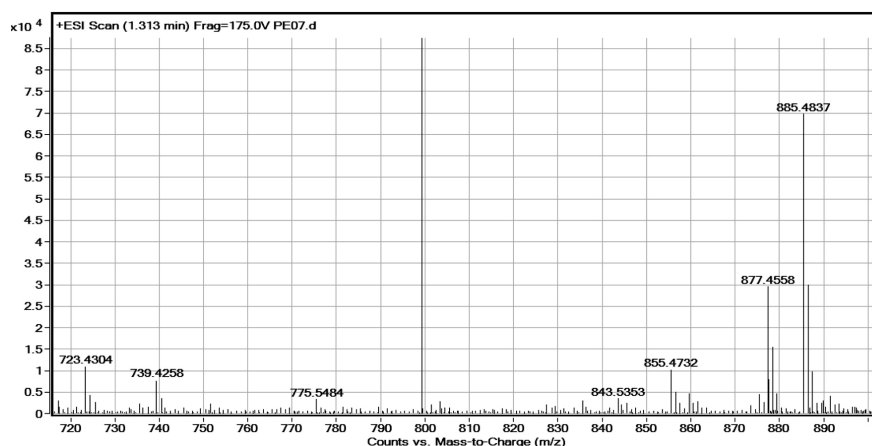
Phổ hồng ngoại của mẫu thử gracillin tinh chế được phù hợp với phổ hồng ngoại của gracillin chuẩn (Hình 4).



Hình 4. Phổ IR của gracillin chuẩn (a) và gracillin tinh chế được (b)

3.2.4. Phổ khối lượng

Phổ HR-ESI-MS của gracillin tinh chế được cho pic ion tại m/z 885,4837 $[M+H]^+$ tương ứng với công thức phân tử $C_{45}H_{72}O_{17}$ của gracillin (Hình 5).



Hình 5. Phổ khối lượng của gracillin tinh chế được

3.2.5. Phổ cộng hưởng từ hạt nhân

Dữ liệu phổ 1H -NMR, ^{13}C -NMR của gracillin tinh chế được phù hợp với dữ liệu phổ 1H -NMR, ^{13}C -NMR của gracillin đã công bố [6] (Bảng 2).

Bảng 2. Dữ liệu phổ của gracillin tinh chế và gracillin đối chiếu

STT	Gracillin tinh chế được *		Gracillin [6]	
	$^{13}\text{C-NMR}^b \delta$ (ppm)	$^1\text{H-NMR}^a \delta$ (ppm)	$^{13}\text{C-NMR}^d \delta$ (ppm)	$^1\text{H-NMR}^c \delta$ (ppm)
1	37,3		38,0	
2	30,4		30,6	
3	77,9		79,0	
4	38,5		39,2	
5	140,6		141,3	
6	121,7	5,29 (1H, m)	122,3	5,40 (1H, d; 4,6)
7	32,1		32,7	
8	31,9		32,3	
9	50,1		50,8	
10	36,9		37,7	
11	20,9		21,9	
12	39,7		40,4	
13	40,3		41,0	
14	56,4		57,2	
15	33,7		32,8	
16	81,0		81,6	
17	62,6		63,4	
18	16,1	0,79 (3H, s)	16,8	0,90 (3H, s)
19	19,2	1,00 (3H, s)	19,9	1,13 (3H, s)
20	41,8		42,5	
21	14,8	1,09 (3H, d; 7,0)	15,5	1,21 (3H, d; 6,9)
22	109,2		109,7	
23	31,9		32,2	
24	29,4		29,8	
25	31,5		31,1	
26	66,7		67,4	
27	17,1	0,64 (3H, d; 5,5)	17,8	0,76 (3H, d; 5,1)
1'	99,7	4,86 (1H, d; 7,0)	100,5	
2'	76,9		77,5	
3'	88,8		90,0	
4'	69,4		70,1	
5'	77,4		78,2	
6'	62,0		62,9	
1''	101,9	6,24 (1H, d; 1,5)	102,7	6,49 (1H, s)
2''	72,0		73,0	
3''	72,3		73,3	
4''	73,6		74,6	
5''	69,4		70,1	
6''	18,4	1,69 (3H, d; 6,5)	19,2	1,83 (3H, d; 5,3)
1'''	104,2	5,03 (1H, d; 8,0)	105,0	5,20 (1H, d; 7,8)
2'''	74,6		75,5	
3'''	78,3		79,2	

STT	Gracillin tinh chế được *		Gracillin [6]	
	$^{13}\text{C-NMR}^b \delta \text{ (ppm)}$	$^1\text{H-NMR}^a \delta \text{ (ppm)}$	$^{13}\text{C-NMR}^d \delta \text{ (ppm)}$	$^1\text{H-NMR}^c \delta \text{ (ppm)}$
4'''	71,2		72,0	
5'''	77,7		78,4	
6'''	62,0		62,9	

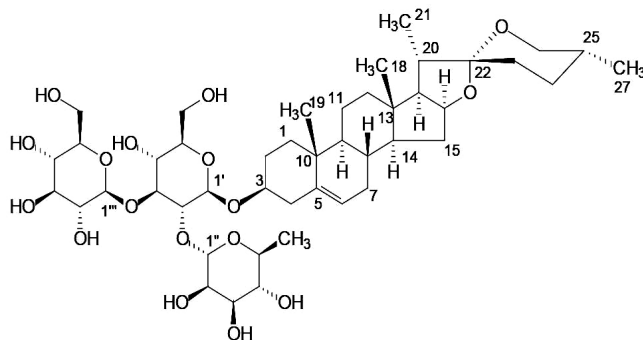
^a(pyridin- d_3)

^b500 MHz

^c125 MHz;

^d300 MHz ^e75 MHz

Từ các kết quả phân tích trên, cấu trúc hóa học của gracillin xác định được như sau:



$\text{C}_{45}\text{H}_{72}\text{O}_{17}$

Ptl: 885,04

3.3. Kiểm tra chất lượng của gracillin tinh chế được

Gracillin tinh chế được kiểm tra chất lượng theo các chỉ tiêu và phương pháp nêu ở mục 2.2.2.3. Kết quả được tóm tắt trong Bảng 3.

Bảng 3. Kết quả kiểm tra chất lượng của gracillin tinh chế

Chỉ tiêu	Kết quả
Mô tả	Bột kết tinh màu trắng
Định tính Phổ hồng ngoại	Phổ hồng ngoại của mẫu thử gracillin tinh chế được phù hợp với phổ hồng ngoại của gracillin chuẩn
Sắc ký lỏng hiệu năng cao	Thời gian lưu và phổ UV-VIS của pic gracillin trên sắc ký đồ của dung dịch thử pha từ gracillin tinh chế tương ứng với thời gian lưu và phổ UV-VIS của pic gracillin trên sắc ký đồ của dung dịch chuẩn
Mất khối lượng do làm khô Phương pháp TGA	1,13%
Nhiệt độ nóng chảy	290,5°C
Định lượng Phương pháp HPLC	96,30% (nguyên trạng)

4. Kết luận

Qua thời gian nghiên cứu và triển khai thực nghiệm, nhóm nghiên cứu đã đưa ra được quy trình chiết xuất, phân lập và tinh chế được 400 mg gracillin tinh khiết từ thân rễ cây Bảy lá một hoa (*Paris polyphylla* var. *chinensis* Smith.). Sản phẩm thu được sau khi tinh chế đã được định tính và xác định cấu trúc dựa trên phương pháp quang phổ hồng ngoại, quang phổ tử ngoại- khả kiến, phổ khối lượng và phổ cộng hưởng từ hạt nhân. Kết quả phân tích thể hiện công thức phân tử cũng như cấu trúc của nguyên liệu tinh chế được là gracillin. Kết quả kiểm tra chất lượng cho thấy gracillin tinh chế được có thể sử dụng để thiết lập chất đối chiếu.

Tài liệu tham khảo

1. Cao Ngọc Anh, Thái Nguyễn Hùng Thu, Đỗ Thị Hà, Lê Đình Chi (2019), “Xây dựng quy trình định lượng paris saponin H (paris H), paris saponin II (paris II) và gracillin chiết xuất, phân lập từ cây Bảy lá một hoa Việt Nam bằng kỹ thuật HPLC”, *Tạp chí Dược học*, 2/2019 (Số 514 năm 59), 14-16.

- Chen C. R., Zhang J., Wu K. W., Liu P. Y., Wang S. J., Chen D. Y., Ji Z. N. (2015), “Gracillin induces apoptosis in HL60 human leukemic cell line via oxidative stress and cell cycle arrest of G1”, *Die Pharmazie-An International Journal of Pharmaceutical Sciences*, 70(3), pp. 199-204.
- Darbour N., Bayet C., Doreau A., Raad I., Phung B. H., Dumontet C., Di Pietro A., Dijoux-Franca M. G., Guilet D. (2009), “Selective modulation of P-glycoprotein activity by steroidal saponins from *Paris polyphylla*”, *Fitoterapia*, 80(1), pp. 39-42.
- Kang L. P., Ma B. P., Zhang J., Xiong C. Q., Tan D. W., Cong Y. W. (2005), “Isolation and identification of steroidal saponins from *Paris polyphylla* Smith”, *Chinese Journal of Medicinal Chemistry*, 15, pp. 25-30.
- Qin X. J., Sun D. J., Ni W., Chen C. X., Hua Y., He L., Liu H. Y. (2012), “Steroidal saponins with antimicrobial activity from stems and leaves of *Paris polyphylla* var. *yunnanensis*”, *Steroids*, 77(12), pp. 1242-1248.
- Yun H., Lijian C., Wenhong Z., Yuhong D., Yongli W., Qiang W., Ding Z. (2007), “Separation and identification of steroidal compounds with cytotoxic activity against human gastric cancer cell lines in vitro from the rhizomes of *Paris polyphylla* var. *chinensis*”, *Chemistry of Natural Compounds*, 43(6), pp. 672-677.
- Zheng W., Yan C. M., Zhang Y. B., Li Z. H., Z. Q. Li, Li X. Y., Wang Z. W., Wang X. L., Chen W. Q., Yu X. H. (2015), “Antiparasitic efficacy of gracillin and zingiberenis saponin from *Costus speciosus* (Koen ex. Retz) Sm. against *Ichthyophthirius multifiliis*”, *Parasitology*, 142(3), pp. 473-479.
- Wang Y., Zhang Y. J., Gao W. Y., Yan L. L. (2007), “Anti-tumor constituents from *Paris polyphylla* var. *yunnanensis*”, *China Journal of Chinese Materia Medica*, 32(14), pp. 1425-1428.

SUMMARY

400 mg of a high purity compound was extracted, isolated and purified from rhizome of *Paris polyphylla* var. *chinensis* by using column chromatographic method. The chemical structure of the isolated compound was identified as Gracillin based on comparison of the UV-Vis, IR, MS, ¹H-NMR and ¹³C-NMR of isolated Gracillin and those of standard Gracillin purchased from Shanghai Yuanye Bio-Technology Co., Ltd, (China) company. The product can be used to establish reference standard.

(Ngày nhận bài: 18/5/2020 ; Ngày phản biện: 14/07/2020 ; Ngày duyệt đăng: 25/08/2020)

NGHIÊN CỨU ĐẶC ĐIỂM HÌNH THÁI, ĐA DẠNG DI TRUYỀN VÀ THÀNH PHẦN HÓA HỌC CỦA CÂY BA KÍCH TẠI HUYỆN TÂY GIANG, TỈNH QUẢNG NAM

PHẠM THỊ LINH GIANG, HOÀNG QUỲNH HOA, NGHIÊM ĐỨC TRỌNG, TRẦN VĂN ON

Trường Đại học Dược Hà Nội

Từ khóa: Ba kích, Ba kích Tây Giang, đa dạng di truyền Ba kích, monotropein, nystose.

1. Đặt vấn đề

Ba kích là một dược liệu được sử dụng rộng rãi trong Y học cổ truyền với tác dụng bổ thận dương, mạnh gân xương với nhu cầu sử dụng ngày càng tăng. Ba kích đã được trồng tại một số tỉnh phía Bắc như Quảng Ninh, Bắc Giang tuy nhiên sản lượng chưa đáp ứng được nhu cầu thị trường dẫn đến tình trạng dược liệu Ba kích giả, Ba kích không rõ nguồn gốc được bán tràn lan. Trước

thực trạng đó, cần thiết phải xây dựng những vùng trồng Ba kích rõ nguồn gốc và chất lượng để đáp ứng nhu cầu về loại dược liệu này.

Trong quá trình điều tra thực địa một số khu vực thuộc huyện Tây Giang, tỉnh Quảng Nam, nhóm nghiên cứu nhận thấy tại đây có xuất hiện nhiều mẫu Ba kích sinh trưởng và phát triển tốt ở vành đai ôn đới ở độ cao trên 700 m. Trong khi đó, theo ghi nhận của các tài liệu

hiện có, các giống Ba kích tại Miền Bắc như Quảng Ninh, Bắc Giang chỉ sinh trưởng tốt ở độ cao dưới 400 m. Khi quan sát đặc điểm thực vật các mẫu Ba kích tại huyện Tây Giang, tỉnh Quảng Nam, một số mẫu có đặc điểm thực vật khác so với các mẫu Ba kích đã được mô tả trước đó ở Miền Bắc Việt Nam. Ngoài ra, còn xuất hiện một số giống cây Ba kích từ Miền Bắc do du nhập thông qua các dự án tại địa phương.

Để nghiên cứu rõ hơn về đặc điểm thực vật, đa dạng di truyền của cây Ba kích tại huyện Tây Giang, tỉnh Quảng Nam, tiến hành đánh giá chất lượng Ba kích thông qua một thành phần hóa học chính, so sánh với các giống Ba kích ở Miền Bắc, nhằm cung cấp các cơ sở khoa học cho việc sử dụng cây Ba kích trồng tại Quảng Nam, nghiên cứu “*Đặc điểm hình thái, đa dạng di truyền và thành phần hóa học của cây Ba kích tại huyện Tây Giang, tỉnh Quảng Nam*” đã được thực hiện.

2. Thực nghiệm

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

2.1.1. Thiết bị, dụng cụ

- Máy sắc ký lỏng hiệu năng cao Shimadzu UFLC DAD;

- Máy sắc ký lỏng hiệu năng cao HITACHI DAD-ELSD;

- Cân phân tích Shimadzu (AY 220), độ chính xác 0,1 mg;

- Máy xác định hàm ẩm AND MF-50;

- Tủ lạnh sâu - 23°C; -30°C (Biomedical Freezer – Sanyo);

- Máy ly tâm để bàn tốc độ cao Eppendorf 5415R;

- Dụng cụ tách chiết bao gồm: Chày, cối sứ, ống eppendorf, bể ổn nhiệt Memmert WNB10, máy lắc vortex IKA.

- Dụng cụ nhân gen: Eppendorf mastercycler pro S, máy soi chụp ảnh gen UVP Gel-docIt, máy điện di Consort EV 222.

- Dụng cụ giải trình tự gen: Máy giải trình tự ABI 3730xl DNA Analyzer, máy nhân gen DNA Engine Tetrad 2 Peltier Thermo Cycler (BIO-RAD).

2.1.2. Hóa chất, chất chuẩn

- Chất chuẩn Monotropein: Nguồn gốc: Sigma – Aldrich; Số lô: SLBN8437V; Hàm lượng 99% $C_{16}H_{22}O_{11}$ (nguyên trạng);

- Chất chuẩn Nystose: Nguồn gốc: Sigma – Aldrich; Số lô: BCBN6357V; Hàm lượng 99,6% $C_{24}H_{42}O_{21}$ (nguyên trạng);

- Hóa chất thông dụng dùng trong sinh học phân tử của các hãng Sigma, Merck: CTAB, tris base, boric acid, natri clorid, dNTPs, EDTA, 6X orange loading dye solution, Taq polymeraza, ethanol, 2-propanol, acetic acid glacial, phenol, cloroform, isoamylalcohol, agarose, kit Qiagen;

- Mồi ITS 1: 5'TCCGTAGGTGAACCTTGCGG3';

- Mồi ITS 8: 5'GCACTACGATGAAGAACGCT3';

Kích thước đoạn DNA được khuếch đại bởi cặp mồi ITS 1-8 nằm trong khoảng từ 600 - 800 bp.

2.2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Đối tượng nghiên cứu

- 09 mẫu Ba kích được thu thập từ các quần thể mọc tự nhiên và trồng tại huyện Tây Giang, tỉnh Quảng Nam trong giai đoạn từ tháng 7/2018 - 4/2019 ký hiệu lần lượt là: 1TG05, 1TG06, 1TG10, 1TG34, 3TG04, 3TG08, 4TG63, 4TG65 và 5TG07.

- Mẫu so sánh đối chiếu là 05 mẫu Ba kích Miền Bắc thu hái tại Thái Nguyên và Quảng Ninh ký hiệu lần lượt là BK1, BK2, BK3, BK4 và BK6.

Trong đó, các mẫu 1TG05, 3TG04, 4TG63, 5TG07, BK1, BK3, BK4 và BK6 được sử dụng cho nội dung phân tích về hóa học.

Các mẫu được giám định tên khoa học và lưu mẫu tại Phòng Tiêu bản - Trường Đại học Dược Hà Nội.

2.2.2. Phương pháp nghiên cứu

Phương pháp mô tả đặc điểm hình thái bằng phương pháp mô tả phân tích. Tên khoa học được xác định dựa trên phương pháp đối chiếu với khóa phân loại và mô tả loài trong các tài liệu thực vật. Các mẫu sau khi tra khóa được so sánh đối chiếu với các tiêu bản type hoặc isotype của từng loài tham khảo từ mẫu lưu tại Phòng Tiêu bản tại Việt Nam và trên Thế giới.

Sau khi mô tả đặc điểm hình thái và giám định được tên khoa học của các mẫu, nghiên cứu tiến hành tách chiết, khuếch đại, điện di trên thạch, tinh sạch gel và xác định được trình tự nucleotid vùng ITS1-5.8S-ITS2 của các mẫu Ba kích thuộc loài *Morinda officinalis* F.C.How và đối chiếu với các mẫu Ba kích ở Miền Bắc. Sự khác biệt về trình tự vùng ITS1-5.8S-ITS2 giữa các mẫu khảo sát được thể hiện thông qua hệ số tương đồng của từng cặp mẫu, được tính toán bằng công cụ đo khoảng cách di truyền của phần mềm CLC v8.02, thống kê và xây

dựng cây quan hệ phát sinh dựa trên đoạn trình tự ITS giữa các mẫu nghiên cứu bằng phần mềm Mega 6.0 theo phương pháp maximum likelihood.

Phương pháp xử lý mẫu: Rễ Ba kích sau khi thu hái được rửa sạch, bỏ lõi, thái nhỏ và sấy ở nhiệt độ 55°C cho đến hàm ẩm dưới 12%. Xay thành bột, rây qua rây 250 µm và bảo quản trong túi ni-lông kín, đặt vào bình hút ẩm chứa hạt silica gel hút ẩm để tiến hành phân tích định tính và định lượng về hóa học.

Phương pháp định lượng nystose trong các mẫu nghiên cứu bằng phương pháp HPLC-ELSD tham khảo chuyên luận Ba kích trong Dược điển Trung Quốc [6]. Tiến hành thẩm định độ tương thích hệ thống và khoảng tuyến tính của phương pháp định lượng nystose bằng HPLC – ELSD.

Phương pháp định lượng monotropein trong mẫu rễ Ba kích được tiến hành bằng phương pháp HPLC-DAD tham khảo theo quy trình đã được Bùi Quốc Thái và cộng sự [5] xây dựng và thẩm định năm 2016. Tuy nhiên, dung môi chiết mẫu được sử dụng trong nghiên cứu là ethanol 40% thay vì methanol như trong nghiên cứu của Bùi Quốc Thái. Phương pháp được tiến hành thẩm định một số chỉ tiêu như: Độ đặc hiệu, độ thích hợp của hệ thống sắc ký, độ tuyến tính, độ đúng, độ lặp lại và độ chính xác trung gian trên mẫu 5TG07 trước khi định lượng các mẫu Ba kích trong nghiên cứu.

3. Kết quả và bàn luận

3.1. Kết quả

3.1.1. Kết quả nghiên cứu về đặc điểm hình thái

Các mẫu nghiên cứu tại Tây Giang có đặc điểm hình thái được mô tả như sau: Cây dây leo bằng thân quấn. Rễ phình to thành củ, hình trụ, mập, vẩy vẩy, từ 1 củ chính phân thành 2 hoặc nhiều nhánh gồm 2-3 nhánh cấp hai; từ nhánh cấp hai phân thành 3-5 nhánh cấp ba, có thể phân tới nhánh cấp năm.

Đường kính củ chính từ 4-8 mm; chiều dài củ từ 15-40 cm. Củ thường hơi thắt lại tạo thành các đốt có chiều dài từ 1-3 cm, trông giống ruột gà. Vỏ ngoài màu vàng trắng, thịt màu trắng hơi vàng, có thể có ánh tím, trên mặt vỏ có nhiều vân dọc, lõi dạng sợi, có gai, tỷ lệ lõi/củ thay đổi từ 1/5-1/3.

Thân leo, đường kính 2 mm màu xanh hoặc tím, bề mặt nhẵn hoặc phủ lông thưa hoặc dày; thân già có màu nâu, xanh đậm hoặc tím đậm, lông rụng dần; thường nhẵn, mỗi giống dài 4-15 cm.

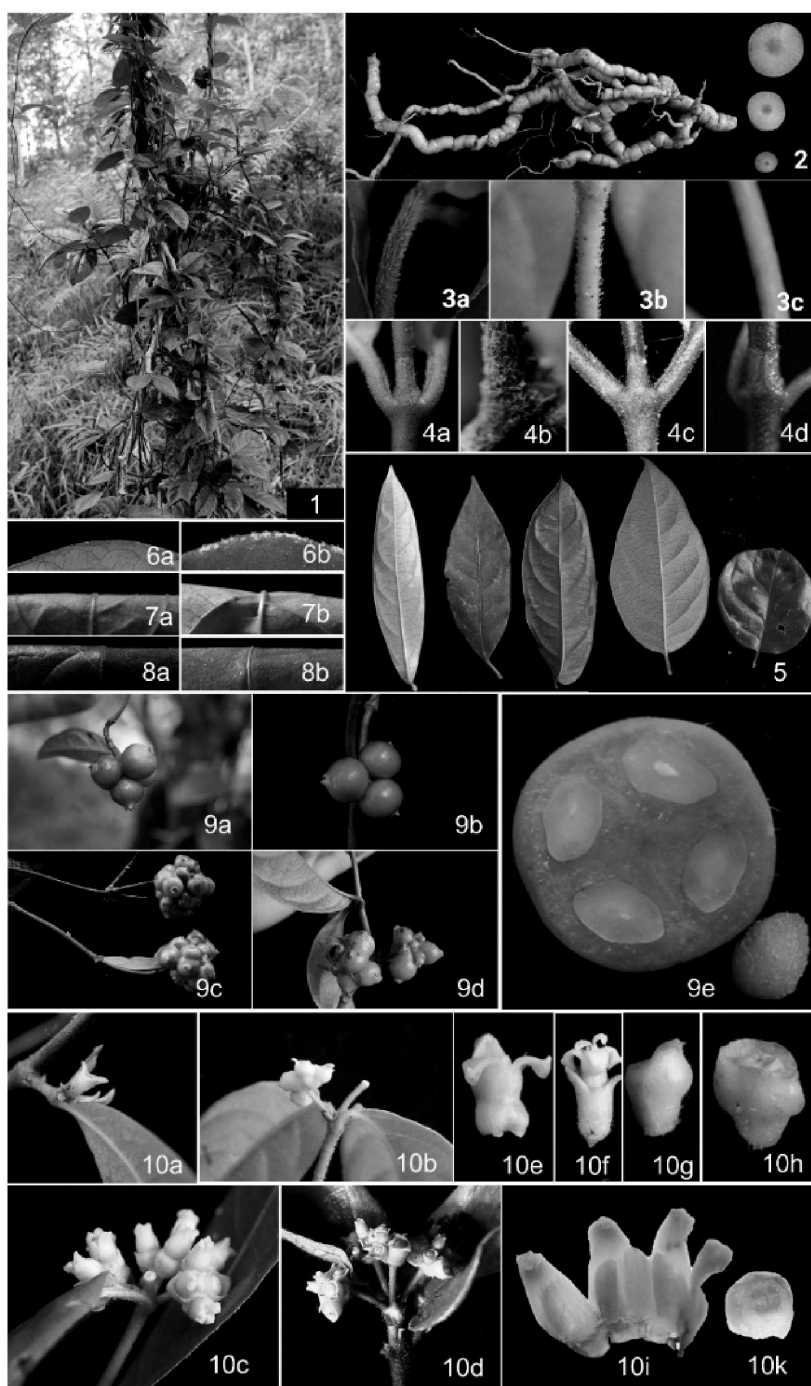
Lá đơn, mọc đối; cuống dài 3-9 mm, đường kính 1-2 mm, nhẵn hoặc phủ lông ngắn hay dài; phiến lá dày hoặc mỏng, có hình trứng, hình bầu dục thuôn nhọn, hình bầu dục hoặc hình gần tròn, dài 5-13 cm, rộng 2,5-5 cm, chỉ số lá 1-3,5; gốc lá tròn hoặc nhọn, mép nguyên hay lượn sóng đôi khi có lông mi; ngọn lá nhọn hoặc hơi tù; mặt trên và mặt dưới nhẵn hoặc có lông ngắn; thường có hốc Domatia - hốc giữa gân chính và phụ có phủ lông; gân lá hình lông chim, gồm 6 -12 cặp gân phụ rời hoặc nối tiếp nhau ở gân mép lá; gân chính nổi rõ và có lông hoặc nhẵn ở mặt dưới; màu xanh, gân cấp 3 hình mạng. Lá kèm mỏng, dính nhau, ôm lấy thân, hàn liền, dài 2-4 mm, màu trắng xanh hay tím, có phủ lông ngắn và thưa, đỉnh ngang hoặc hơi nhọn.

Cụm hoa dạng tán, gồm 4-5 tán mọc ở nách lá hay đầu cành, mỗi tán mang 1-5-10 hoa; cuống tán dài 0,3-4 cm, đường kính 1-2 mm, có phủ lông. Hoa nhỏ, đều, lưỡng tính, khi mới nở màu xanh, trắng, sau ngả sang vàng. Đài 3-4, hàn liền hình ống, rộng 2-3 mm, dài 3-4 mm, màu xanh, thường phủ lông dày hoặc thưa, trên chia 2, 3 hoặc 4 thùy, dài 1-4 mm, rộng 1-3 mm. Tràng 3-4, có phần móng dính nhau tạo thành ống hình chum hoặc hình trụ, đường kính 2-3 mm, cao 2-4 mm, phủ lông ở mặt ngoài dày hay thưa; phần trên rời, hình tam giác, dài, rộng khoảng 3 mm, mặt ngoài nhẵn hay phủ lông, mặt trong có một vòng lông ở phía trên họng tràng dày đặc, thẳng, màu trắng, dài khoảng 1 mm. Bộ nhị 3-4, rời, chỉ nhị dính vào họng tràng; chỉ nhị rất ngắn; bao phấn 2 ô, dài 1 mm, thuôn hai đầu, nứt dọc. Bộ nhụy gồm 2 lá noãn dính nhau tạo thành bầu dưới, 4 ô, đường kính 2-3 mm; bề mặt bầu nhẵn hoặc có lông thưa, ngắn.

Cụm quả mọc thành tán. Quả hình cầu, từ 1-5 quả/1 tán, quả rời hoặc quả kép. Bề mặt quả phủ lông hoặc nhẵn, xanh khi non và chuyển màu cam khi chín, mang đài còn lại trên đỉnh quả. Hạt 3-4/ quả, bề mặt có lông màu trắng (Hình 1).

3.1.2. Giám định tên khoa học các mẫu nghiên cứu

Dựa trên đặc điểm hình thái được mô tả, đối chiếu với các bản mô tả và các khóa phân loại chi Nhàu (*Morinda* L.) trong thực vật chí Trung Quốc [10], bản mô tả các loài thuộc chi Nhàu (*Morinda* L.) tại Việt Nam [1],[2], các mẫu nghiên cứu đã được xác định có tên khoa học là *Morinda officinalis* F.C.How.



1. Dạng sống;
 2. Hình thái rễ;
 3a, 3b, 3c. Bề mặt thân;
 4a, 4b, 4c, 4d. Hình thái lá kèm;
 5. Các dạng phiến lá;
 6a, 6b. Mép lá;
 7a, 7b. Mặt dưới lá;
 8a, 8b. Mặt trên lá;
 9a, 9b, 9c, 9d. Các kiểu cụm quả
 và bề mặt quả;
 9e. Quả bổ ngang và hạt;
 10a, 10b, 10c, 10d. Các kiểu cụm hoa;
 10e, 10f, 10g, 10h. Hình thái và tràng hoa;
 10i. Đặc điểm tràng hoa và nhị;
 10k. Bầu cắt ngang.

Hình 1. Đặc điểm hình thái các mẫu Ba kích nghiên cứu tại Tây Giang

3.1.3. Kết quả nghiên cứu đa dạng di truyền

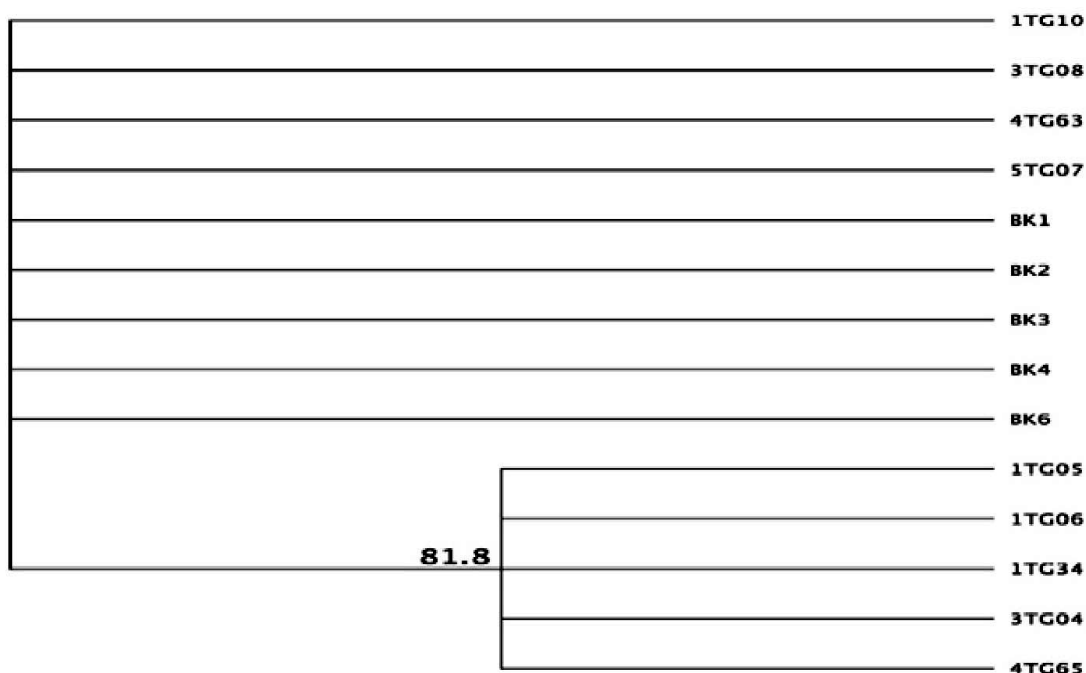
Kết quả phân tích dựa vào đoạn trình tự ITS1-5,8S-ITS2 cho thấy, các mẫu Ba kích thuộc loài *Morinda officinalis* F.C.How thu thập tại các địa phương khác nhau của Việt Nam, trong đó tập trung chủ yếu tại một số tỉnh Miền Bắc và Miền Nam Trung Bộ (huyện Tây Giang, tỉnh Quảng Nam) là khá đa dạng về mặt di truyền, có sự tương đồng di truyền cao của một số mẫu trong 14 trình tự. Hệ số tương đồng cao nhất là 100%, còn hệ số thấp nhất là 98,02%; khoảng cách di truyền gần nhất là 0,00 và xa nhất là 0,0198.

Kết quả phân tích cây quan hệ phát sinh trên hình cho thấy 14 mẫu Ba kích nghiên cứu phân thành 2 nhánh chính:

* Nhóm I: gồm các mẫu: 1TG05, 1TG06, 1TG34, 3TG04, 4TG65

* Nhóm II: gồm các mẫu: BK1, BK2, BK3, BK4, BK6, 1TG10; 3TG08, 4TG63, 5TG07

Như vậy, các mẫu Ba kích 1TG05, 1TG06, 1TG34, 3TG04, 4TG65 là những cây bản địa của Tây Giang, Quảng Nam có mối quan hệ gần gũi với nhau trong khi các mẫu còn lại là 1TG10; 3TG08, 4TG63, 5TG07 có mối quan hệ di truyền gần gũi với các mẫu Ba kích thu tại Miền Bắc.



Hình 2. Cây quan hệ phát sinh giữa 14 mẫu Ba kích nghiên cứu

3.1.4. Kết quả nghiên cứu thành phần hóa học

Sau khi tiến hành thẩm định phương pháp định lượng nystose bằng kỹ thuật HPLC với detector tán xạ bay hơi – ELSD và phương pháp định lượng monotropein bằng kỹ thuật HPLC – DAD trên các chỉ tiêu như đã trình bày cho thấy hai phương pháp đạt yêu cầu của phương pháp phân tích theo tiêu chuẩn của AOAC. Tiến hành định lượng hai chất trên 08 mẫu dược liệu Ba kích thu tại các vùng khác nhau ở Việt Nam thu được kết quả hàm lượng nystose dao động từ 0,970 đến 9,488% so với dược liệu khô tuyệt đối bỏ lõi; mẫu 3TG04 và 4TG63 lần lượt là hai mẫu có hàm lượng cao nhất và thấp nhất. Trong khi đó, hàm lượng monotropein dao động từ 0,739 đến 2,156%; mẫu 5TG07 và 4TG63 lần lượt là hai mẫu có hàm lượng cao nhất và thấp nhất.

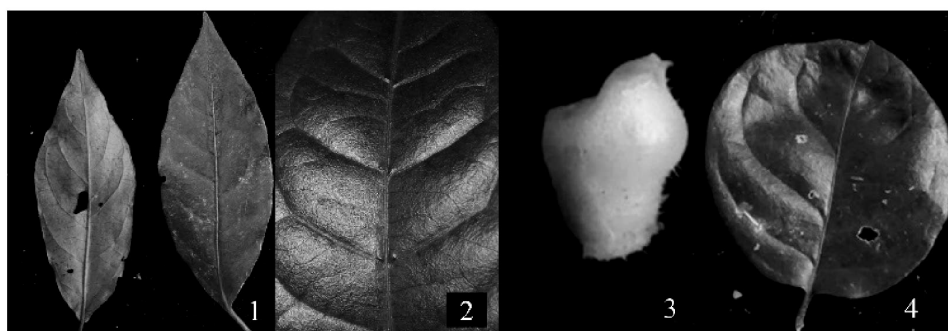
3.2. Bàn luận

3.2.1. Bàn luận về đặc điểm hình thái

Đề tài đã thu được 14 mẫu Ba kích có tên khoa học là *Morinda officinalis* F. C. How. trong đó có 05 mẫu Ba kích thu hái tại Miền Bắc (Thái Nguyên và Quảng Ninh) và 09 mẫu Ba kích thu hái tại huyện Tây Giang, tỉnh Quảng Nam. Kết quả phân tích đặc điểm hình thái của 09 mẫu nghiên cứu tại Tây Giang cho thấy những đặc điểm đa dạng về mặt hình thái tương tự như các nghiên cứu khác như về mật độ các nút thắt ruột gà, màu sắc của rễ, màu sắc, bề mặt thân, hình thái, màu sắc, bề mặt lá, kiểu cụm hoa, cụm quả, hình dạng tràng, quả đơn/kép [3],[4]. Tuy nhiên, trên 09 mẫu tại Tây Giang cũng xuất hiện một số đặc điểm khác biệt so với những đặc điểm đã được công bố trong các nghiên cứu trên như phiến lá mỏng (mẫu 1TG34; 4TG63; 1TG06), hốc lông giữa gân chính và gân phụ nổi rõ ở mặt trên (mẫu 1TG06); đài hoa ít phát triển (mẫu 1TG06); phiến lá có hình gần tròn (mẫu 4TG65).

Bảng 1. Kết quả hàm lượng nystose và monotropein trong một số mẫu Ba kích nghiên cứu (%)

STT	Ký hiệu mẫu	Lần	Hàm lượng nystose trên khối lượng dược liệu khô tuyệt đối (%)	Hàm lượng trung bình (%)	RSD (%)	Hàm lượng monotropein trên dược liệu khô tuyệt đối (%)	Hàm lượng trung bình (%)	RSD (%)
1	BK1	1	7,33	7,285	0,75	0,866	0,884	1,83
		2	7,31			0,889		
		3	7,22			0,897		
2	BK3	1	4,65	4,610	1,26	1,435	1,439	0,22
		2	4,54			1,441		
		3	4,64			1,440		
3	BK4	1	8,76	8,958	1,95	0,774	0,773	0,18
		2	9,05			0,772		
		3	9,07			0,772		
4	BK6	1	6,21	6,139	1,36	0,927	0,918	1,14
		2	6,15			0,920		
		3	6,05			0,906		
5	1TG05	1	9,16	9,180	0,77	1,425	1,430	0,25
		2	9,12			1,432		
		3	9,26			1,431		
6	3TG04	1	9,59	9,488	1,61	2,095	2,090	0,25
		2	9,56			2,085		
		3	9,31			2,092		
7	4TG63	1	0,98	0,970	1,53	0,748	0,739	1,12
		2	0,97			0,735		
		3	0,95			0,734		
8	5TG07	1	6,20	6,195	0,12	2,147	2,156	0,41
		2	6,19			2,164		
		3	6,19			2,159		



Hình 3. Đặc điểm hình thái đặc trưng của Ba kích Tây Giang

1. Phiến lá mỏng; 2. Hốc lông nổi rõ mặt trên lá; 3. Đài hoa ít phát triển; 4. Phiến lá hình gần tròn

3.2.2. Bàn luận về đa dạng di truyền

Kết quả nghiên cứu đa dạng di truyền chỉ ra rằng, 14 mẫu nghiên cứu có sự sai khác về mặt di truyền từ 0,00 - 1,8%. Nghiên cứu của Ding và cộng sự [7],[8] đã chỉ ra sự sai khác về đoạn trình tự ITS của các mẫu Ba kích tại Trung Quốc là 0,00 - 6,00% và nghiên cứu của Ngô Thị Thu Hiền [3] cho kết quả sự sai khác của 11 mẫu Ba kích tại các tỉnh Miền Bắc Việt Nam là 1,00 - 9,00%. Như vậy, 14 mẫu Ba kích trong nghiên cứu không có sự khác biệt quá lớn về mặt di truyền khi so sánh với hai nghiên cứu trên.

Mặt khác, dựa trên cây quan hệ phát sinh, 09 mẫu Ba kích tại Tây Giang chia làm hai nhóm, trong khi các mẫu Ba kích Miền Bắc không có sự phân nhóm. Mẫu 1TG10 nghi ngờ có nguồn gốc tại Miền Bắc từ các dự án tài trợ cây giống cho việc trồng và phát triển cây Ba kích tại địa phương, 03 mẫu còn lại đều là các mẫu thu được trong vùng sinh thái tự nhiên của cây Ba kích trong đó có mẫu 3TG08 đã được thuần hóa ở vườn trồng tại xã Lăng, huyện Tây Giang, tỉnh Quảng Nam, sự khác biệt này cho thấy sự đa dạng nhất định của các mẫu Ba kích trồng và tự nhiên tại Tây Giang.

3.2.3. Bàn luận về thành phần hóa học

Phương pháp định lượng nystose, hợp chất thuộc nhóm polysaccharid sử dụng detector tán xạ bay hơi - ELSD cho độ tin cậy cao. Phương pháp được tham khảo theo chuyên luận Ba kích trong Dược điển Trung Quốc [6] có tính chính xác hơn so với kỹ thuật HPTLC trong một số nghiên cứu tại Việt Nam [9].

Tại Trung Quốc, Liu và cộng sự xác định hàm lượng nystose trên mẫu Ba kích tại Quảng Đông, Trung Quốc bằng kỹ thuật HPLC cho kết quả hàm lượng nystose khoảng 6,65% [11]. Tại Việt Nam, năm 2018, Nguyễn Thị Phương đã sử dụng kỹ thuật HPTLC kết hợp máy SCAN sau khi phun thuốc thử để xác định hàm lượng nystose của các mẫu Ba kích tại Việt Nam, kết quả cụ thể là: Trà Lĩnh - Cao Bằng (4,56 - 5,13%); Ba Chẽ - Quảng Ninh (5,93 - 7,23%) và Hoàn Bò - Quảng Ninh (4,11 - 5,84%) [9]. Trong khi đó, hàm lượng nystose của các mẫu nghiên cứu của đề tài từ 0,970 - 9,488%.

Hàm lượng nystose tại 4 mẫu rễ Ba kích thu tại Miền Bắc và 4 mẫu thu tại Tây Giang - Quảng Nam không cho thấy sự khác biệt rõ rệt với sự dao động lần lượt là 6,139 - 8,958% và 0,970 - 9,488%. Mẫu 4TG63 có kích thước củ tương đối lớn (theo kinh nghiệm người dân địa phương có thể là củ từ 4-6 năm) nhưng lại cho hàm lượng nystose thấp nhất (0,97%). Rễ mẫu BK1 có màu tím rõ nhất, đường kính lớn nhất, nhiều nút thắt ruột già

nhưng hàm lượng hoạt chất nystose lại không quá cao so với các mẫu còn lại (7,285%). Như vậy, chưa thể khẳng định được sự liên quan giữa mức độ tím của thịt rễ và số tuổi đến hàm lượng của nystose trong rễ.

Để có thể đánh giá đầy đủ hơn về chất lượng của Ba kích tại Tây Giang, nhóm nghiên cứu đã tiến hành định lượng thêm một chất thuộc nhóm iridoid glycosid là monotropein. Sau khi thẩm định phương pháp định lượng monotropein - một hợp chất có tác dụng chống viêm quan trọng và có hàm lượng cao trong rễ Ba kích bằng kỹ thuật HPLC-DAD với các chỉ tiêu cơ bản cần thiết như độ đặc hiệu, tính tương thích của hệ thống sắc ký, khoảng tuyến tính, độ chính xác và độ đúng cho các kết quả có độ tin cậy cao.

Hàm lượng monotropein trong một số mẫu Ba kích theo một số nghiên cứu trên Thế giới dao động từ 11,832 đến 12,791 mg/g được liệu khô [11] trong khi kết quả của đề tài hàm lượng dao động từ 0,739 đến 2,156%. Trong đó, các mẫu thu tại Tây Giang có xu hướng hàm lượng monotropein cao hơn các mẫu tại Miền Bắc với giá trị lần lượt là 0,739 - 2,156% và 0,773 - 1,439%. Mẫu 4TG63 tại Tây Giang có hàm lượng thấp nhất (0,739%) và gần với hàm lượng của mẫu BK4 tại Miền Bắc (0,773%) trong khi hai mẫu 3TG04 và 5TG07 tại Tây Giang là hai mẫu có hàm lượng monotropein cao nhất trong 8 mẫu nghiên cứu (2,090 và 2,156%).

Trong số 04 mẫu rễ Ba kích thu tại Tây Giang, 3TG04 và 5TG07 là hai mẫu có hàm lượng cả hai thành phần nystose và monotropein cao nhất trong 8 mẫu được phân tích trong khi 4TG63 lại là mẫu có hàm lượng thấp nhất. Đây là một trong những cơ sở ban đầu nhằm lựa chọn được một số giống Ba kích tại Tây Giang có hàm lượng hoạt chất cao, phục vụ công tác nhân giống, trồng trọt Ba kích tại địa phương.

Như vậy, với những kết quả nghiên cứu bước đầu về đặc điểm thực vật, đa dạng di truyền và thành phần hóa học, nhận thấy các mẫu Ba kích ở Tây Giang có sự đa dạng nhất định về đặc điểm hình thái và di truyền so với các mẫu Ba kích phổ biến ở Miền Bắc. Về chất lượng rễ Ba kích, qua các kết quả nghiên cứu thu được nhận thấy không có sự khác biệt quá rõ ràng về hàm lượng hai thành phần chính là nystose và monotropein trong các mẫu khác nhau về vị trí địa lý, sự khác biệt xuất phát từ đặc tính khác nhau của những giống Ba kích khác nhau. Điều này là cơ sở cho việc lựa chọn các giống Ba kích thích hợp để tăng hiệu quả kinh tế cho địa phương.

4. Kết luận

Đã mô tả đặc điểm hình thái của 09 mẫu mang tên Ba kích tại Tây Giang, giám định tên khoa học là *Morinda*

officinalis F.C.How. Các mẫu *M. officinalis* F.C.How tại Tây Giang có sự đa dạng về hình thái, một số đặc điểm như độ dày phiến lá, hình dạng phiến lá, hình dạng đài hoa có sự khác biệt với các mẫu *M. officinalis* F.C.How đã được mô tả ở Việt Nam.

Đã tách chiết và giải trình tự được đoạn trình tự ITS-rADN, xây dựng cây đa dạng dựa trên đoạn trình tự ITS của 14 mẫu thuộc loài *M. officinalis* F.C.How có sự

sai khác về đoạn trình tự ADN, khoảng cách di truyền gần nhất là 0,00 và xa nhất là 0,0198. Kết quả phân tích cây quan hệ phát sinh cho thấy 14 mẫu Ba kích nghiên cứu phân thành 2 nhánh.

Đã định lượng nystose và monotropein trong 8 mẫu rễ Ba kích có độ tuổi từ 4-6 năm tuổi, hàm lượng tương ứng là 0,970 – 9,488% và 0,739 - 2,156% tính theo trọng lượng khô tuyệt đối của dược liệu bỏ lõi.

Tài liệu tham khảo

1. Võ Văn Chi (2012), *Từ điển cây thuốc Việt Nam*, Nhà xuất bản Y học, tập 1, tr. 68- 69.
2. Võ Văn Chi (2004), *Từ điển thực vật thông dụng*, Nhà xuất bản Khoa học kỹ thuật, tập 1.
3. Ngô Thị Thu Hiền (2016), “Nghiên cứu đa dạng di truyền nguồn gen của cây Ba kích (*Morinda officinalis* How.) ở Miền Bắc Việt Nam”, Luận văn Thạc sĩ Dược học - Trường Đại học Dược Hà Nội.
4. Lê Hoàng Khẩn (2018), “Nghiên cứu tính đa dạng di truyền của cây Ba kích tại Quảng Nam - Đà Nẵng bằng chỉ thị phân tử RAPD”, Văn phòng hợp tác khoa sinh môi trường và hội đồng vật Frankfurt.
5. Bùi Quốc Thái (2016), *Nghiên cứu chiết xuất, phân lập và tinh chế Monotropein từ Ba kích làm nguyên liệu thiết lập chuẩn*, Luận văn Thạc sĩ Dược học - Trường Đại học Dược Hà Nội.
6. Chinese Pharmacopoeia Commission (2015), *Pharmacopoeia of people's republic of China*, vol. I, 284-285.
7. Ding P. et al. (2006), “RAPD analysis on germplasm resources of different farm races of *Morinda officinalis*”, *Zhong Yao*, vol. 29(1), 1-3.
8. Ding P. et al. (2012), “Genuineness of *Morinda officinalis* How germplasm inferred from ITS sequences variation of nuclear ribosomal DNA”, *Acta pharmaceutica Sinica*, vol. 47(4), 535-540.
9. Nguyen Thi Phuong et al. (2018), “HPTLC Densitometry method for the quantification of nystose in *Radix Morindae officinalis* collected from different regions in Vietnam”, *Journal of Medicinal Materials*, vol. 23, 131- 136.
10. Tao Chen et al. (2011), Rubiaceae In: Wu, Z. Y., P. H. Raven & D. Y. Hong, (eds.), *Flora of China, Vol. 19 (Cucurbitaceae through Valerianaceae, with Annonaceae and Berberidaceae)*, Science Press, Beijing, and Missouri Botanical Garden Press, St. Louis.
11. Zhang J.H. et al. (2018), “*Morinda officinalis* How - A comprehensive review of traditional uses, phytochemistry and pharmacology”, *J Ethnopharmacol*, vol. 213, 230-255.

SUMMARY

The study has collected night samples called “Ba kích” at Tay Giang, Quang Nam. These samples were identified scientific name are *Morinda officinalis* F.C.How with some botany characteristics that different from 05 samples collected from Quang Ninh and Thai Nguyên such as leaf thickness, leaf shape, sepals. ITS-rADN sequences were extracted and sequenced, 14 samples of *M. officinalis* F.C.How had differences in DNA sequences, the nearest genetic distance was 0.00 and the farthest was 0.0198. The results of the relation tree analysis generated that 09 samples were divided into 2 branches with a number of samples lying in the same branch with the Northern research samples. Evaluation Nystose and Monotropein content in eight samples of *M. officinalis* F.C.How roots aged 3-6 years old, the contents were 0.970 – 9.488% and 0.739 – 2.156% by dried materials, respectively. There was the same in content of two main components between Tay Giang and Northern samples.

(Ngày nhận bài: 0/03/2019 ; Ngày phản biện: 20/04/2020 ; Ngày duyệt đăng: 27/06/2020)

MỤC LỤC

• Nghiên cứu khoa học

Trang

- Nghiên cứu định lượng Monotropein trong dược liệu Ba kích (*Radix Morindae officinalis*) bằng phương pháp HPLC.
PHẠM VĂN KIẾN, PHẠM THỊ LINH GIANG, HOÀNG QUỲNH HOA, TRẦN VĂN ON, ĐOÀN CAO SƠN 1
- Định lượng đồng thời Amlodipin, Losartan và Acid losartan carboxylic trong huyết tương người bằng phương pháp LC-MS/MS.
ĐOÀN CAO SƠN, HOÀNG VĂN ĐỨC, PHAN THỊ NGHĨA, TẠ MẠNH HÙNG 6
- Xây dựng và thẩm định quy trình định lượng Trypsin trong chế phẩm viên nén bao tan trong ruột Trypsin – Chymotrypsin bằng phương pháp đo quang động học.
LÊ VĂN ĐẠT, HOÀNG XUÂN QUANG, NGUYỄN THỊ LIÊN 13
- Nghiên cứu chiết xuất, phân lập và tinh chế Gracillin từ thân rễ cây Bảy lá một hoa (*Paris polyphylla* var. *Chinensis* Smith.).
CAO NGỌC ANH, ĐỖ THỊ HÀ, THÁI NGUYỄN HÙNG THU 18
- Nghiên cứu đặc điểm hình thái, đa dạng di truyền và thành phần hóa học của cây Ba kích tại huyện Tây Giang, tỉnh Quảng Nam.
PHẠM THỊ LINH GIANG, HOÀNG QUỲNH HOA, NGHIÊM ĐỨC TRỌNG, TRẦN VĂN ON 24

CONTENTS

Page

• Scientific researches

- Study on determination of Monotropein in medicinal herbs named “Ba kích - *Radix Morindae officinalis*” by HPLC method.
PHẠM VĂN KIẾN, PHẠM THỊ LINH GIANG, HOÀNG QUỲNH HOA, TRẦN VĂN ON, ĐOÀN CAO SƠN 1
- Simultaneous assay of Amlodipine, Losartan and Losartan carboxylic acid in human plasma by LC-MS/MS method.
ĐOÀN CAO SƠN, HOÀNG VĂN ĐỨC, PHAN THỊ NGHĨA, TẠ MẠNH HÙNG 6
- Development and validation of kinetic spectrophotometry method for determining the activity of Trypsin in enteric coated Trypsin - Chymotrypsin tablet.
LÊ VĂN ĐẠT, HOÀNG XUÂN QUANG, NGUYỄN THỊ LIÊN 13
- Study on extracting, isolating and purifying Gracillin from the rhizome of the plant named “Bảy lá một hoa - *Paris polyphylla* var. *Chinensis* Smith.”.
CAO NGỌC ANH, ĐỖ THỊ HÀ, THÁI NGUYỄN HÙNG THU 18
- Study on botanical characteristics, genetic diversity and chemical composition of “Ba kích - *Morinda officinalis* How” plants in Tay Giang district, Quang Nam province.
PHẠM THỊ LINH GIANG, HOÀNG QUỲNH HOA, NGHIÊM ĐỨC TRỌNG, TRẦN VĂN ON 24