

VIỆN KIỂM NGHIỆM THUỐC TRUNG ƯƠNG

ISSN 1859 - 0055

TẠP CHÍ

**KIỂM
NGHIỆM
thuốc**

JOURNAL OF DRUG QUALITY CONTROL

SỐ 3.2021

TẬP 19-SỐ 73

NATIONAL INSTITUTE OF DRUG QUALITY CONTROL

48 HAI BA TRUNG . HANOI - VIETNAM

TEL: 84.024.39363794 * FAX: 84.024.38256911 * E-MAIL: tapchiknt@nidqc.gov.vn

TẠP CHÍ KIỂM NGHIỆM THUỐC SỐ 3/2021

JOURNAL OF DRUG QUALITY CONTROL N^o 3/2021

XUẤT BẢN TỪ NĂM 2003

Tổng biên tập: PGS. TS. ĐOÀN CAO SON

Phó tổng biên tập: PGS. TS. TRỊNH VĂN LẬU

Thư ký biên tập: ThS. PHẠM THỊ DUYÊN

Trị sự: ThS. PHẠM THỊ DUYÊN

Hội đồng Biên tập:

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

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

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

In xong và nộp lưu chiểu tháng 10 năm 2021.

NGHIÊN CỨU XÂY DỰNG QUI TRÌNH ĐỊNH LƯỢNG NEBIVOLOL TRONG HUYẾT TƯƠNG NGƯỜI BẰNG PHƯƠNG PHÁP LC-MS/MS

KHUẤT VĂN MẠNH

TRỊNH NAM TRUNG

**PHAN THỊ NGHĨA, HOÀNG VĂN ĐỨC,
TẠ MẠNH HÙNG**

Bệnh viện K

Học viện Quân Y

Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương

***Từ khóa:* Nebivolol, tương đương sinh học, huyết tương, LC-MS/MS**

1. Đặt vấn đề

Nebivolol là một thuốc tim mạch thuộc nhóm ức chế beta – adrenergic có chọn lọc. Dùng nebivolol làm giảm nhịp tim và hạ huyết áp. Hiệu quả hạ huyết áp được duy trì khi điều trị lâu dài. Thuốc được sử dụng để điều trị tăng huyết áp [4]. Do nồng độ đỉnh (C_{max}) của nebivolol trong huyết tương người sau khi uống một liều đơn 5 mg được chất rất thấp (khoảng 1,67 ng/ml [1]), nên việc xác định nồng độ nebivolol 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. Dựa vào trang thiết bị hiện có và tham khảo một số phương pháp phân tích đã được các tác giả công bố [3],[5] đồng thời dựa trên nguyên lý hoạt động của phương pháp sắc ký lỏng - khối phổ, chúng tôi đã tiến hành nghiên cứu định lượng nebivolol trong huyết tương người bằng phương pháp sắc ký lỏng với detector khối phổ kiểu tứ cực chập ba (LC-MS/MS). Phương pháp phân tích sẽ được áp dụng trong các nghiên cứu sinh khả dụng và tương đương sinh học thuốc generic chứa được chất nebivolol.

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 17025 và GLP, bao gồm:

Máy sắc ký lỏng khối phổ AB Sciex QTRAP 6500+ (Sciex – Mỹ);

Cân phân tích Mettler Toledo (Thụy Sĩ, độ chính xác $d = 0,1$ mg);

Tủ lạnh sâu - $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Panasonic – Nhật Bản);

Máy ly tâm lạnh (Sigma 4 - 16K – Đức); máy lọc nước...;

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

2.1.2. Hóa chất, chất chuẩn

- *Chất chuẩn:*

+ Nebivolol hydroclorid: Chuẩn USP; SKS: F027MO; hàm lượng: 99,8% (nguyên trạng);

+ Diltiazem hydroclorid: Chuẩn chính của Viện KNTTW được dùng làm chuẩn nội trong phương pháp phân tích SKS: WS.0108218; hàm lượng 100,85%; độ ẩm: 0,3%.

- *Dung môi, hóa chất:* Methanol, diethylether, cloroform, amoni bicarbonat, amoni hydroxyd đạt tiêu chuẩn tinh khiết dùng cho phân tích hoặc sắc ký.

2.2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Đối tượng nghiên cứu

Huyết tương trắng: Không có nebivolol của Viện Huyết học và Truyền máu Trung ương.

2.2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.2.1. Điều kiện sắc ký

- Cột Hypersil Gold C8; 100 x 2,1 mm; 1,9 μm .

- Pha động: Methanol - amoni bicarbonat 5 mM tỷ lệ 80 : 20 (v/v)

- Tốc độ dòng: 0,4 ml/phút

- Thể tích tiêm mẫu: 10 μl

- Nhiệt độ autosampler (buồng tiêm mẫu): $6\text{ }^{\circ}\text{C}$

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 nebivolol và chất chuẩn nội (IS) được trình bày ở Bảng 1.

2.2.2.3. Phương pháp xử lý mẫu

Thêm 50 μl dung dịch chuẩn nội (nồng độ chính xác khoảng 10 ng/ml) vào 0,5 ml mẫu huyết tương (HT)

trắng đã rửa đông ở nhiệt độ phòng, thêm 500 µl dung dịch amoni hydroxyd 0,1M. Lắc xoáy 10 giây. Thêm 5 ml hỗn hợp dung môi diethylether - cloroform (8 : 2), lắc ngang 5 phút. Ly tâm 3000 vòng/phút trong 5 phút. Lấy 3,5 ml lớp dung môi phía trên, cô bay hơi dung môi. Hòa tan cần trong 500 µl pha động. Tiêm sắc ký.

Bảng 1. Các thông số của detector khối phổ dùng để định lượng nebivolol và diltiazem

<i>Hoạt chất</i> <i>Thông số</i>	<i>Nebivolol</i>	<i>Diltiazem (IS)</i>
Điện thế ion hóa (V)	5500	5500
Khí phun sương (psi)	60	60
Khí tăng cường (psi)	60	60
Nhiệt độ hóa hơi (°C)	500	500
Điện thế chọn lọc ion (V)	75	75
Khí làm sạch (psi)	25	25
Năng lượng phân mảnh (V)	41	20
Mảnh mẹ (m/z, Dalton)	406,2	415,2
Mảnh con (m/z, Dalton)	151,1	178,0

2.2.2.4. Phương pháp tính kết quả

Xác định nồng độ nebivolol có trong các mẫu thử (chưa biết nồng độ) dựa vào tỷ lệ diện tích pic nebivolol/IS thu được từ sắc đồ của mẫu thử và đường chuẩn biểu thị mối tương quan giữa nồng độ nebivolol có trong các mẫu chuẩn với tỷ lệ diện tích pic nebivolol/IS của mẫu chuẩn.

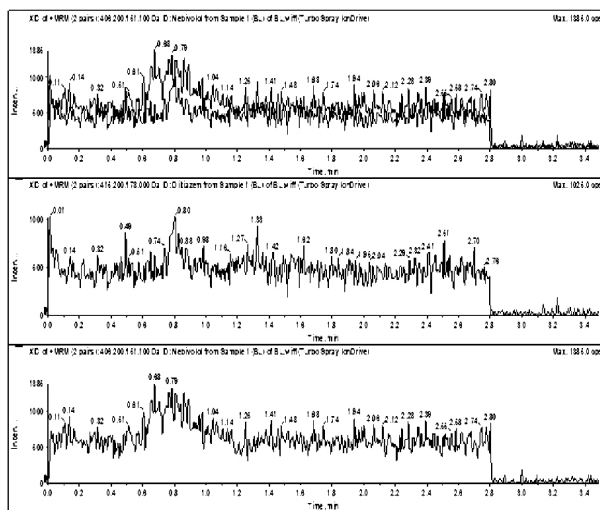
Tiến hành thẩm định phương pháp phân tích theo quy định của EMA và US-FDA [2],[6].

3. Kết quả và bàn luận

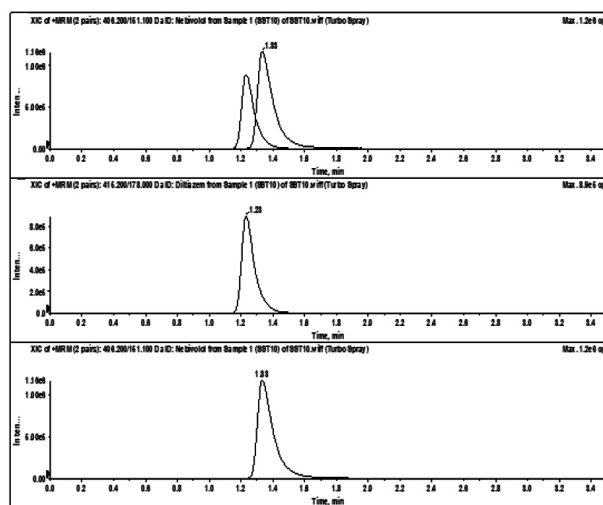
3.1. Độ đặc hiệu - chọn lọc của phương pháp

Phân tích các mẫu HT trắng, mẫu HT tự tạo chứa chuẩn nội và nebivolol nồng độ khoảng 20 pg/ml theo phương pháp đã xây dựng và ghi lại sắc ký đồ (Hình 1, 2).

Trên SKĐ của mẫu HT trắng (Hình 1), tại thời điểm 1,34 phút và 1,23 phút trùng với thời gian lưu của nebivolol và IS trong mẫu chuẩn (Hình 2) không xuất hiện các pic có mảnh phổ khối $m/z = 406,2 \rightarrow 151,1$ (đặc trưng cho nebivolol) và mảnh phổ khối $m/z = 415,2 \rightarrow 178,0$ (đặc trưng cho IS). Do vậy, phương pháp phân tích có độ đặc hiệu - chọn lọc với nebivolol và IS theo các quy định của phương pháp phân tích thuốc trong dịch sinh học [2],[6].



Hình 1. SKĐ mẫu HT trắng



Hình 2. SKĐ mẫu HT trắng có IS và nebivolol ở nồng độ 20 pg/ml

Chú thích hình (từ trên xuống): Sắc ký đồ tổng ion; sắc ký đồ chọn lọc ion nebivolol có $m/z = 406,2 \rightarrow 151,1$; sắc ký đồ chọn lọc ion chuẩn nội có $m/z = 415,2 \rightarrow 178,0$

3.2. Đường chuẩn và khoảng tuyến tính

Phân tích các mẫu HT chứa chuẩn nội và chuẩn nebivolol có nồng độ khoảng 20 pg/ml đến 10000 pg/ml theo quy trình đã xây dựng. Xác định sự tương quan giữa nồng độ nebivolol có trong mẫu và tỉ lệ diện tích pic nebivolol/IS thu được trên SKĐ bằng phương pháp hồi qui tuyến tính, sử dụng hệ số tỷ trọng $1/(\text{nồng độ})^2$.

Kết quả xác định mối tương quan này được trình bày ở Bảng 2.

Bảng 2. Kết quả xác định khoảng tuyến tính của phương pháp

Mẫu chuẩn Nồng độ (pg/ml)	Độ đúng (%)				
	Đường chuẩn 1	Đường chuẩn 2	Đường chuẩn 3	Đường chuẩn 4	Đường chuẩn 5
20,2	102,4	113,0	105,4	100,6	103,5
40,4	95,5	102,0	97,5	96,2	91,1
101,1	100,0	100,5	103,3	105,8	103,6
202,2	97,5	84,3	103,4	102,8	102,7
1010,9	101,7	99,1	98,0	95,3	101,2
2021,8	103,1	101,2	91,7	99,9	99,4
5054,5	98,6	99,4	97,9	100,9	97,8
10108,9	101,1	100,4	102,8	98,5	100,8
Phương trình hồi quy ($y = ax + b$) [*]	$y = 0,0004x + 0,0016$	$y = 0,0004x + 0,0005$	$y = 0,0004x + 0,0002$	$y = 0,0004x + 0,0004$	$y = 0,0004x + 0,0010$
Hệ số r	0,9996	0,9976	0,9989	0,9992	0,9989

(*) Ghi chú: x là nồng độ nebivolol (pg/ml) có trong mẫu; y là tỉ lệ diện tích pic nebivolol/IS

Kết quả thẩm định cho thấy trong khoảng nồng độ từ 20 pg/ml đến 10000 pg/ml có sự tương quan tuyến tính giữa nồng độ nebivolol và tỉ lệ diện tích pic nebivolol/IS với hệ số tương quan xấp xỉ bằng 1.

Nồng độ nebivolol xác định từ đường chuẩn so với nồng độ lý thuyết đều nằm trong giới hạn cho phép (80 - 120% đối với nồng độ thấp nhất, 85 - 115% đối với các nồng độ còn lại) theo quy định của phương pháp phân tích thuốc trong dịch sinh học [2],[6].

3.3. Giới hạn định lượng dưới của phương pháp

Phân tích các mẫu zero (mẫu HT chứa chuẩn nội) và mẫu HT chứa chuẩn nội và chuẩn nebivolol có nồng độ chính xác khoảng 20 pg/ml (mẫu LLOQ) trên 3 lô mẫu. Xác định nồng độ nebivolol có trong các mẫu LLOQ từ các đường chuẩn tiến hành làm song song trong cùng điều kiện.

Kết quả thẩm định giới hạn định lượng dưới của phương pháp được trình bày ở Bảng 3.

Bảng 3. Kết quả xác định giá trị LLOQ của phương pháp

Mẫu chuẩn (20 pg/ml)	Ngày 1	Ngày 2	Ngày 3
Diện tích mẫu zero	2783	9237	2013
Diện tích trung bình mẫu LLOQ; n = 6	40540	51004	51111
Tỷ lệ LLOQ/Zero	19,1	5,5	25,4
Độ đúng (%); n = 6	96,3	109,9	114,2
CV (%); n = 6	5,8	8,4	4,6
Độ đúng (%); n = 18	106,8		
CV (%); n = 18	9,5		

Kết quả thẩm định ở Bảng 3 cho thấy, tại thời điểm trùng với thời gian lưu của nebivolol, đáp ứng pic trung bình của mẫu LLOQ gấp hơn 5 lần đáp ứng pic của mẫu zero. Tỷ lệ giữa nồng độ nebivolol trung bình xác định từ đường chuẩn so với nồng độ lý thuyết có trong các mẫu LLOQ nằm trong khoảng từ 80% - 120% và CV nhỏ hơn 20%, đáp ứng yêu cầu giới hạn định lượng dưới của phương pháp phân tích thuốc trong dịch sinh học [2],[6].

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

Tiến hành thẩm định độ đúng, độ lặp lại trên 5 lô mẫu LLOQ, LQC, SQC, MQC, HQC chứa nebivolol có nồng độ tương ứng là 20 pg/ml; 60 pg/ml; 500 pg/ml, 4000 pg/ml và 8000 pg/ml. Xác định hàm lượng nebivolol có trong các mẫu bằng đường chuẩn phân tích trong cùng điều kiện. Độ đúng của phương pháp là tỷ lệ % giữa nồng độ xác định được so với nồng độ lý thuyết. Độ lặp lại của phương pháp được biểu thị bằng giá trị CV%. Kết quả xác định độ đúng, độ lặp lại của phương pháp được trình bày ở Bảng 4.

Bảng 4. Kết quả xác định độ đúng, độ lặp lại trong ngày và khác ngày

Độ đúng, độ lặp lại	LLOQ (≈ 20 pg/ml)		LQC (≈ 60 pg/ml)		SQC (≈ 500 pg/ml)		MQC (≈ 4000 pg/ml)		HQC (≈ 8000 pg/ml)	
	Độ đúng (%)	CV (%)	Độ đúng (%)	CV (%)	Độ đúng (%)	CV (%)	Độ đúng (%)	CV (%)	Độ đúng (%)	CV (%)
<i>Trong ngày</i>	96,3	5,8	102,6	3,9	105,0	2,6	103,7	1,3	98,1	7,9
<i>Khác ngày</i>	105,0	10,9	102,1	6,2	104,1	6,0	102,2	6,2	100,1	6,2

Kết quả thẩm định cho thấy ở các nồng độ thấp, trung bình và cao, phương pháp có độ đúng trong ngày và khác ngày xấp xỉ 100%; độ lặp lại trong ngày và khác ngày với giá trị CV nhỏ hơn 15%.

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

Tiến hành nghiên cứu độ ổn định của nebivolol trong HT trên các lô mẫu LQC và HQC. Đánh giá độ ổn định của nebivolol trong HT bằng cách so sánh nồng độ nebivolol có trong các mẫu được bảo quản so với nồng độ lý thuyết. Kết quả nghiên cứu độ ổn định của nebivolol được trình bày trong Bảng 5.

Bảng 5. Kết quả nghiên cứu độ ổn định của nebivolol trong huyết tương

Độ ổn định	Mẫu	Nồng độ lý thuyết (pg/ml)	Nồng độ sau bảo quản (pg/ml; n=6)	% Sai khác
4 chu kì đông - rã	LQC	64,8	72,7	12,2
	HQC	8636,5	8764,5	1,0
Độ ổn định thời gian ngắn (6 giờ, nhiệt độ phòng)	LQC	64,8	72,2	11,1
	HQC	8636,5	8080,5	- 6,4
Độ ổn định trong autosampler (48 giờ/6 °C)	LQC	65,8	74,4	- 13,0
	HQC	8775,7	8953,1	- 2,0
Độ ổn định dài ngày (- 35 °C ± - 5 °C, 106 ngày)	LQC	64,8	69,6	7,4
	HQC	8636,5	8568,0	- 0,8

Kết quả thẩm định cho thấy độ ổn định của nebivolol trong huyết tương tại các điều kiện bảo quản khác nhau (sau 4 chu kỳ đông – rã đông; bảo quản ở nhiệt độ phòng sau 6 giờ; bảo quản trong autosampler sau 48 giờ và bảo quản ở - 35°C ± - 5 °C sau 106 ngày) đáp ứng các yêu cầu về độ ổn định của phương pháp phân tích thuốc trong dịch sinh học.

4. Kết luận

Nghiên cứu đã xây dựng được phương pháp định lượng nebivolol trong huyết tương người bằng phương pháp LC-MS/MS. Kết quả thẩm định cho thấy, phương pháp có giá trị giới hạn định lượng dưới nhỏ (20 pg/ml); khoảng tuyến tính rộng (từ 20 pg/ml đến 10000 pg/ml); độ đúng dao động trong khoảng từ 96,3% - 105,0%; độ lặp lại với giá trị CV% nhỏ (1,3% - 10,9%), thời gian phân tích ngắn (3,5 phút cho mỗi mẫu), đáp ứng yêu cầu đối với phương pháp phân tích thuốc trong dịch sinh học của US- FDA và EMA [2],[6]. Phương pháp đã xây dựng có thể ứng dụng trong các nghiên cứu đánh giá tương đương sinh học đối với chế phẩm chứa hoạt chất nebivolol.

Tài liệu tham khảo

1. Ana- Maria Gheldiu, Laurian Vlase, Adina Popa, etc. (2017), “Investigation of a Potential Pharmacokinetic Interaction Between Nebivolol and Fluvoxamine in Healthy Volunteers”, *J Pharm Pharm Sci.*, Volume 20, Pages 68 - 80.
2. European Medicines Agency, Committee for Medicinal Products for Human Use (2012): *Guideline on Bioanalytical Method Validation*.
3. Jatin Nandaniaa, S.J. Rajput, Pritesh Contractor, Pragnesh Vasavaa, Bhavik Solanki, Mohsin Vohraa (2013), “Quantitative determination of nebivolol from human plasma using liquid chromatography- tandem mass spectrometry,” *Journal of Chromatography B*, 923- 924, Pages 110 - 119.
4. Menarini, Summary of Product Characteristics of NEBILET®. Available at <https://www.medicines.org.uk/emc/product/1620/smpc>.
5. Praveen Kumar Dasari and Srinivasa Rao Dorapaneedi (2015), “Development and validation of LC-MS/MS method for the estimation of nebivolol in human plasma” *World journal of pharmacy and pharmaceutical sciences* - Volume 5, Issue 1, Pages 844 - 855.
6. U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration (2018): *Guidance for Industry - Bioanalytical Method Validation*.

SUMMARY

A high throughput and specific method using Ultra Performance Liquid Chromatography tandem Mass Spectrometry was developed for determination of Nebivolol in human plasma. The Nebivolol and internal standard were separated from human plasma by liquid - liquid extraction technique. Analytes were chromatographed on a C8 column (100 x 2.1 mm; 1.9 µm) with isocratic elution using a tandem quadrupole mass detector (QTRAP 6500+ – AB Sciex). The mobile phase consists of Methanol and Ammonium bicarbonate 5 mM solution with suitable ratio. The assay was linear over the concentration range of 20 - 10000 pg/ml. The LLOQ was 20 pg/ml. The intra day and interday accuracy were within 96,3% - 105,0%; This method can be used for BE studies of Nebivolol preparations.

(Ngày nhận bài: 28/04/2020; Ngày phản biện: 30/03/2021; Ngày duyệt đăng: 10/06/2021)

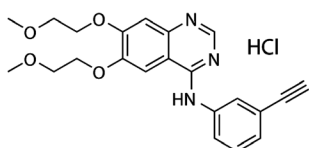
XÂY DỰNG PHƯƠNG PHÁP ĐỊNH TÍNH VÀ ĐỊNH LƯỢNG ERLOTINIB TRONG VIÊN NÉN BAO PHIM ALVOCEVA BẰNG PHƯƠNG PHÁP SẮC KÝ LỎNG HIỆU NĂNG CAO

NGUYỄN VĂN BÌNH, NGUYỄN THỊ MINH TÂM, NGUYỄN HỮU THẢO, TRẦN THỊ HỒNG ANH

Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương

Từ khóa: Erlotinib, định lượng, sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC)

1. Đặt vấn đề



Hình 1. Công thức cấu tạo của Erlotinib hydroclorid [5]

Erlotinib hydroclorid có công thức phân tử là $C_{22}H_{24}ClN_3O_4$ và khối lượng phân tử là 429,9.

Erlotinib là một chất ức chế thụ thể yếu tố tăng trưởng biểu bì (EGFR) tyrosin kinase được sử dụng trong điều trị ung thư phổi không tế bào nhỏ (non-small cell lung cancer), ung thư tuyến tụy và một số loại ung thư khác [7].

Ngày nay, đã có một số hoạt chất được sử dụng trong điều trị ung thư, trong đó có hoạt chất erlotinib đã được cấp phép và lưu hành trên thị trường. Tuy nhiên trong các dược điển hiện hành như Dược điển Mỹ (USP 42), Dược điển Anh (BP 2020), ĐVN V chưa có chuyên luận nguyên liệu cũng như thành phẩm có chứa hoạt chất erlotinib. Để đáp ứng nhu cầu kiểm tra chất lượng và góp phần nâng cao khả năng kiểm tra chất lượng thuốc, trong phạm vi bài viết này chúng tôi xin giới thiệu phương pháp định tính và định lượng erlotinib trong viên nén bao phim Alvoceva bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao.

2. Thực nghiệm

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

2.1.1. Thiết bị, dụng cụ

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

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

Cột phân tích: YMC - RP18 (150 x 4,6 mm; 5 μ m);

- Cân phân tích: Mettler Toledo AG245 với độ chính xác 0,01 mg;

- Máy lắc siêu âm;

- Bộ lọc dùng cho sắc ký, các dụng cụ thủy tinh chính xác khác, ...

2.1.2. Hóa chất, chất chuẩn

- Natri dihydrophosphat dihydrat (Merck, loại PA);

- Acetonitril loại dùng cho HPLC (Merck);

- Methanol loại dùng cho HPLC (Merck);

- Nước cất dùng cho HPLC;

- Chất chuẩn erlotinib hydroclorid: (TLC Pharmaceutical): hàm lượng 91,5% $C_{22}H_{23}N_3O_4$ (nguyên trạng).

2.2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Đối tượng nghiên cứu

- Viên nén bao phim Alvoceva, lô SX: 78674, Hạn dùng: 10/2021, do công ty Remedica Ltd., Cyprus sản xuất; chứa 150 mg erlotinib (dưới dạng erlotinib hydro...).

- Mẫu placebo: Là mẫu giả được được chuẩn bị như một mẫu thử nhưng không có thành phần erlotinib hydroclorid, do công ty Remedica Ltd., Cyprus cung cấp.

2.2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.2.1. Điều kiện sắc ký

Trên cơ sở tham khảo một số tài liệu [1],[3],[6],[7] và các trang thiết bị có sẵn, chúng tôi đã tiến hành khảo sát thành phần pha động, cột, dung môi pha mẫu, tốc độ dòng,... để xây dựng chương trình sắc ký như sau:

- Cột: YMC - RP18 (150 x 4,6 mm; 5 μ m) hoặc cột tương đương.

- Detector: 250 nm.

- Tốc độ dòng: 1,2 ml/phút.

- Thể tích tiêm: 5 μ l.
- Nhiệt độ buồng cột: 40 $^{\circ}$ C.
- Nhiệt độ buồng tiêm mẫu: 25 $^{\circ}$ C.
- Dung dịch rửa kim: Methanol - nước (90 : 10).
- Dung môi pha mẫu: Nước - acetonitril (70 : 30).
- Pha động: Dung dịch đệm pH 4,5 - methanol (30 : 70). Thay đổi tỷ lệ nếu cần.

(Dung dịch đệm pH 4,5: Hòa tan 15,6 g natri dihydrophosphat dihydrat trong 1000 ml nước. Lọc qua màng lọc 0,45 μ m).

2.2.2.2. Phương pháp chuẩn bị mẫu

- *Dung dịch chuẩn erlotinib*: Cân chính xác khoảng 32,8 mg chất chuẩn erlotinib hydroclorid (tương đương với khoảng 30 mg erlotinib) vào bình định mức 50 ml, thêm 30 ml dung môi pha mẫu, lắc siêu âm để hòa tan và thêm dung môi pha mẫu đến vạch, lắc đều. Hút chính xác 5,0 ml dung dịch trên vào bình định mức 20 ml và pha loãng bằng dung môi pha mẫu đến vạch, lắc đều.

- *Dung dịch thử*: Lấy 20 viên, cân xác định khối lượng trung bình viên, nghiền mịn. Cân chính xác một lượng bột chế phẩm (đã nghiền mịn ở trên) tương ứng với khoảng 150 mg erlotinib vào bình định mức 500 ml, thêm 350 ml dung môi pha mẫu, lắc siêu âm ở nhiệt độ phòng 60 phút để hòa tan, thêm dung môi pha mẫu đến vạch. Lắc kỹ, ly tâm 4000 vòng/phút trong 10 phút. Hút chính xác 10,0 ml dung dịch trong vào bình định mức 20 ml và pha loãng bằng dung môi pha mẫu đến vạch, lắc đều. Lọc qua màng lọc 0,45 μ m, bỏ 2 - 3 ml dịch lọc đầu.

- *Dung dịch placebo*: Cân chính xác một lượng bột mẫu placebo (đã nghiền mịn) tương ứng với khoảng

150 mg erlotinib vào bình định mức 500 ml, thêm 350 ml dung môi pha mẫu, lắc siêu âm ở nhiệt độ phòng 60 phút để hòa tan, thêm dung môi pha mẫu đến vạch. Lắc kỹ, ly tâm 4000 vòng/phút trong 10 phút. Hút chính xác 10,0 ml dung dịch trong vào bình định mức 20 ml và pha loãng bằng dung môi pha mẫu đến vạch, lắc đều. Lọc qua màng lọc 0,45 μ m, bỏ 2 - 3 ml dịch lọc đầu.

Tiêm riêng rẽ 5 μ l dung dịch chuẩn, dung dịch thử và dung dịch placebo vào hệ thống sắc ký. Ghi lại sắc ký đồ và đáp ứng của pic chính trong dung dịch chuẩn và dung dịch thử.

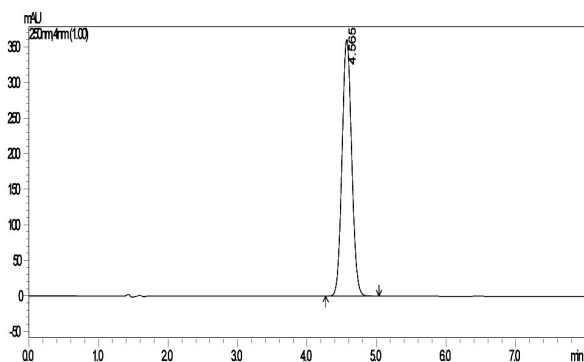
2.2.2.3. Thẩm định phương pháp

Tiến hành thẩm định phương pháp phân tích với các chỉ tiêu độ đặc hiệu, độ tuyến tính, độ đúng, khoảng xác định, độ lặp lại và độ chính xác trung gian.

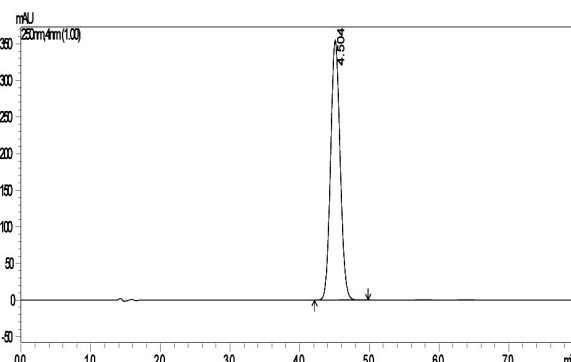
3. Kết quả và bàn luận

3.1. Độ đặc hiệu

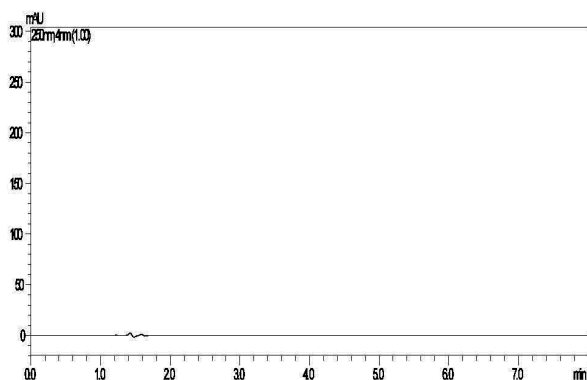
Tiêm lần lượt các mẫu: Dung môi pha mẫu, dung dịch placebo, dung dịch chuẩn và dung dịch thử vào hệ thống sắc ký. Trên sắc ký đồ dung môi pha mẫu và dung dịch placebo (Hình 4) không có pic ở thời gian lưu tương ứng với pic erlotinib (thời gian lưu khoảng 4,6 phút) trên sắc ký đồ của dung dịch chuẩn (Hình 2). Sắc ký đồ của dung dịch thử (Hình 3) cho 1 pic có thời gian lưu tương ứng với thời gian lưu pic erlotinib trên sắc ký đồ của dung dịch chuẩn. Quét phổ tử ngoại khả kiến của dung dịch chuẩn và dung dịch thử với detector PDA cho thấy quang phổ hấp thụ tử ngoại khả kiến của hoạt chất trong dung dịch thử giống với quang phổ hấp thụ tử ngoại khả kiến của hoạt chất trong dung dịch chuẩn, hệ số trùng phổ đều xấp xỉ 1,0 (Hình 5).



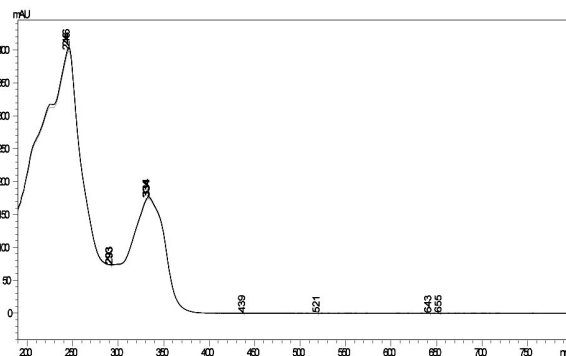
Hình 2. Sắc ký đồ dung dịch chuẩn erlotinib



Hình 3. Sắc ký đồ dung dịch thử



Hình 4. Sắc ký đồ dung dịch placebo



Hình 5. Hình ảnh trùng phổ UV- VIS của pic erlotinib dung dịch thử và chuẩn

Với các điều kiện sắc ký như trên và từ các kết quả thu được đã chứng tỏ phương pháp là đặc hiệu để phân tích định tính và định lượng hoạt chất erlotinib.

3.2. 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 có nồng độ erlotinib khoảng 0,15 mg/ml. Ghi lại các giá trị về thời gian lưu, diện tích pic, hệ số đối xứng và số đĩa lý thuyết của pic erlotinib.

Kết quả khảo sát tính thích hợp của hệ thống sắc ký được trình bày ở Bảng 1.

Bảng 1. Khảo sát tính thích hợp của hệ thống sắc ký

<i>Stt</i>	<i>Thời gian lưu (phút)</i>	<i>Diện tích pic (mAU.s)</i>	<i>Hệ số đối xứng (T)</i>	<i>Số đĩa lý thuyết (N)</i>
1	4,565	3479786	1,1	4671
2	4,542	3468794	1,1	4662
3	4,540	3482331	1,1	4671
4	4,537	3486098	1,1	4675
5	4,525	3489244	1,1	4676
6	4,525	3484193	1,1	4670
TB	4,539	3481741,0	1,1	4671
RSD %	0,32	0,20		

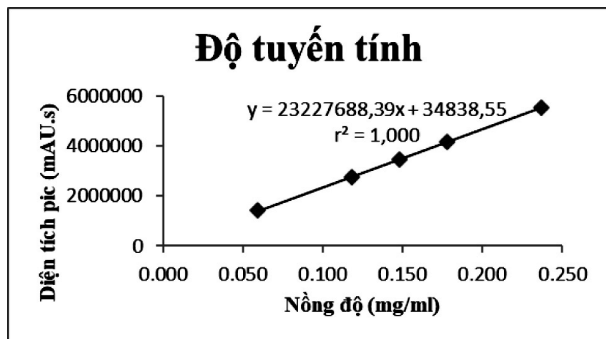
Kết quả ở Bảng 1 cho thấy độ lặp lại (RSD) của thời gian lưu = 0,3 % < 1,0 %; RSD của diện tích pic = 0,2 % < 2,0 %; Hệ số đối xứng T = 1,1 < 2,0; Số đĩa lý thuyết N = 4671 > 2000 cho thấy hệ thống sắc ký trên phù hợp cho việc phân tích định tính và định lượng erlotinib trong chế phẩm.

3.3. Khảo sát khoảng tuyến tính

Khảo sát trên 5 dung dịch chuẩn erlotinib với nồng độ từ 0,0592 – 0,2369 mg/ml, kết quả ghi được trong Bảng 2 và Hình 6.

Bảng 2. Kết quả khảo sát khoảng tuyến tính của phương pháp

Dung dịch	1	2	3	4	5
Nồng độ (mg/ml)	0,0592	0,1185	0,1481	0,1777	0,2369
Diện tích pic (mAU.s)	1418875	2773940	3481741	4153360	5545538
Kết quả	Phương trình hồi qui: $y = 23227688,39x + 34838,55$ Hệ số tương quan tuyến tính: $r \approx 1,000$ $\%Y = 1,0\%$				



Hình 6. Đồ thị khảo sát khoảng tuyến tính của phương pháp

Với điều kiện sắc ký đã chọn, trong khoảng nồng độ đã khảo sát, có sự tương quan tuyến tính chặt chẽ giữa nồng độ erlotinib và diện tích pic đáp ứng với $r \approx 1,000$.

3.4. Khảo sát độ chính xác

3.4.1. Khảo sát độ lặp lại

Khảo sát thực nghiệm trên chế phẩm viên nén bao phim Alvoceva với các điều kiện sắc ký và cách chuẩn bị mẫu như ở mục 2.2.2.1 và 2.2.2.2, lặp lại thí nghiệm 6 lần, kết quả được trình bày trong Bảng 3 (ngày 1).

Kết quả cho thấy phương pháp có độ lặp lại trong ngày tốt với RSD là 0,3% (nhỏ hơn 2,0%).

3.4.2. Khảo sát độ chính xác trung gian

Xác định độ chính xác trung gian bằng cách xác định hàm lượng hoạt chất trong mẫu chế phẩm bởi kiểm nghiệm viên khác, tiến hành thử nghiệm tại thời điểm khác nhau với các điều kiện sắc ký và cách chuẩn bị mẫu như ở mục 2.2.2.1 và 2.2.2.2, lặp lại thí nghiệm 6 lần, kết quả được trình bày trong Bảng 3 (ngày 2).

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

STT	Kiểm nghiệm viên 1 (Ngày 1)			Kiểm nghiệm viên 2 (Ngày 2)		
	Lượng cân chuẩn: 32,37 (mg) Diện tích pic chuẩn: 3481741,0 (mAU.s)			Lượng cân chuẩn: 32,92 (mg) Diện tích pic chuẩn: 3825972,0 (mAU.s)		
	Lượng mẫu thử (g)	Diện tích pic (mAU.s)	Hàm lượng (%)	Lượng mẫu thử (g)	Diện tích pic (mAU.s)	Hàm lượng (%)
1	0,4640	3375449	97,4	0,4711	3698358	97,1
2	0,4695	3406804	97,2	0,4618	3612706	96,8
3	0,4758	3463194	97,5	0,4626	3633358	97,1
4	0,4737	3457327	97,7	0,4620	3609142	96,6
5	0,4331	3129738	96,8	0,4675	3687105	97,5
6	0,4667	3391464	97,3	0,4612	3631753	97,4
Trung bình = 97,3%; n = 6; RSD = 0,3%			Trung bình = 97,1%; n = 6; RSD = 0,4%			
Trung bình = 97,2%; n = 12; RSD = 0,4%						

Kết quả xác định độ lặp lại của mỗi kiểm nghiệm viên $RSD < 2,0\%$ và độ chính xác trung gian $RSD = 0,4\% < 3,0\%$. Do đó, quy trình định tính và định lượng erlotinib trong chế phẩm bằng phương pháp HPLC với các điều kiện đã xây dựng cho độ chính xác cao.

3.5. Khảo sát độ đúng

Độ đúng được xác định bằng phương pháp thêm chuẩn. Cân một lượng chính xác chất chuẩn erlotinib hydroclorid khoảng 131 mg, 164 mg và 197 mg (tương ứng với khoảng 120 mg, 150 mg và 180 mg erlotinib) và 0,32 g bột placebo (tương ứng 1 viên) đã nghiền mịn vào bình định mức 500 ml, thêm 350 ml dung môi pha

mẫu, lắc siêu âm ở nhiệt độ phòng 60 phút để hòa tan, thêm dung môi pha mẫu đến vạch. Lắc kỹ, ly tâm 4000 vòng/phút trong 10 phút. Hút chính xác 10,0 ml dung dịch trong vào bình định mức 20 ml và pha loãng bằng dung môi pha mẫu đến vạch, lắc đều. Lọc qua màng lọc 0,45 μm , bỏ 2 - 3 ml dịch lọc đầu, thu được các dung dịch có nồng độ tương ứng 80%, 100%, 120% so với nồng độ định lượng. Mỗi mức nồng độ tiến hành 3 mẫu độc lập. Tiến hành sắc ký theo điều kiện đã ghi ở mục 2.2.2.1 và ghi lại diện tích pic, tính lượng hoạt chất thu hồi với dung dịch chuẩn ở mục 3.1. Khảo sát tính đặc hiệu. Kết quả khảo sát độ đúng của phương pháp được thể hiện ở Bảng 4.

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

STT	Nồng độ (%) so với nồng độ định lượng	Lượng Erlotinib hydroclorid chuẩn thêm vào (mg)	Diện tích pic (mAU.s)	Lượng Erlotinib hydroclorid tìm lại (mg)	% Erlotinib hydroclorid tìm lại	% thu hồi TB ở mỗi mức nồng độ khảo sát
1	80%	132,4	2810146	130,6	98,7	TB = 98,9% RSD = 0,3%
2		132,1	2819940	131,1	99,2	
3		131,3	2792383	129,8	98,9	
4	100%	163,8	3484906	162,0	98,9	TB = 99,1% RSD = 0,3%
5		161,7	3445578	160,2	99,1	
6		165,8	3546264	164,8	99,4	
7	120%	195,7	4167192	193,7	99,0	TB = 99,2% RSD = 0,2%
8		194,9	4169527	193,8	99,4	
9		195,2	4168207	193,8	99,3	

Từ kết quả thu được trong Bảng 4 cho thấy tỉ lệ thu hồi của erlotinib nằm trong giới hạn từ 98,0% đến 102,0% và RSD đều nhỏ hơn 2,0%. Như vậy phương pháp có độ thu hồi tốt. Do đó, quy trình phân tích đạt yêu cầu về độ đúng.

3.6. Khoảng xác định

Kết quả đánh giá độ đúng, độ chính xác, ở các mức nồng độ 80%, 100% và 120% so với nồng độ định lượng, hàm lượng hoạt chất đảm bảo khả năng tìm lại, độ chính xác và nằm trong khoảng tuyến tính. Vậy khoảng xác định của phương pháp là từ 0,12 mg/ml đến 0,18 mg/ml.

4. Kết luận

Quy trình định lượng erlotinib trong viên nén bao phim Alvoceva bằng phương pháp HPLC đáp ứng yêu cầu về độ đặc hiệu, độ thích hợp của hệ thống sắc ký, có sự tương quan tuyến tính chặt chẽ giữa nồng độ erlotinib và diện tích pic đáp ứng. Đồng thời quy trình phân tích này cũng có độ đúng và độ chính xác cao, phù hợp để định lượng erlotinib trong viên nén bao phim. Quy trình phân tích này có các điều kiện về trang thiết bị, dung môi hóa chất phù hợp với đa số các phòng thí nghiệm. Dựa trên các kết quả thu được, chúng tôi đề nghị có thể áp dụng quy trình đã xây dựng để định lượng erlotinib trong các chế phẩm tương tự.

Tài liệu tham khảo

1. Bộ Y tế (2017), *Dược điển Việt Nam V*, NXB Y học, Hà Nội, Phụ lục 5.3 “Phương pháp sắc ký lỏng”.
2. Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương (2010), *Đảm bảo chất lượng thuốc và một số phương pháp kiểm nghiệm thuốc, Tài liệu đào tạo*.
3. International Conference on Harmonization, ICH Guidelines (2005), “Validation of Analytical Procedures Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use: Text and Methodology Q 2 (R1)”, *International Conference on Harmonization, Geneva, Switzerland, November*.
4. International Conference on Harmonization (2005), *Validation of Analytical Procedure, Text and Methodology Q2 (R1)*, IFMA, Geneva, Switzerland.
5. <https://www.selleckchem.com/products/Erlotinib-Hydrochloride.html>
6. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Erlotinib-hydrochloride>
7. <https://www.drugbank.ca/drugs/DB00530>

SUMMARY

A simple, rapid, precise and accurate reversed phase high-performance chromatographic method for the determination of Erlotinib in a commercial tablet was validated. The chromatographic condition is programmed as follows:

- Column: RP18 (150 x 4,6 mm; 5 μ m), maintained at 40 °C.
- Detector UV: 250 nm.
- Flow rate: 1.2 ml/ phút.
- Injection volume: 5 μ l.
- Mobile phase: Buffer solution pH 4.5 - Methanol (30 : 70).

(Buffer solution pH 4.5: Dissolve 15,6 g sodium dihydrogen phosphate dihydrate in 1000 ml of water).

The developed method was validated according to the ICH guidelines for specificity, system suitability, linearity, accuracy, range and precision. This HPLC method has been applied successfully for the quantitative analysis of erlotinib in a commercial tablet.

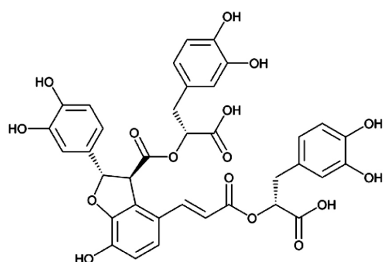
(Ngày nhận bài: 10/09/2020; Ngày phản biện: 28/01/2021; Ngày duyệt đăng: 21/09/2021)

NGHIÊN CỨU PHÂN LẬP, TINH CHẾ ACID SALVIANOLIC B TỪ RỄ ĐẠN SÂM

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

Từ khóa: Acid salviolic B, Đạn sâm, *Salviae miltiorrhizae*, phân lập, tinh chế.

1. Đặt vấn đề



Hình 1: Công thức cấu tạo của acid salviolic B

Công thức phân tử: $C_{36}H_{30}O_{16}$

Phân tử lượng: 718,6 g/mol.

Tên khoa học: Acid (2R)-2-[[[(2E)-3-[(2S,3S)-3-[[[(1R)-1-Carboxy-2-(3,4-dihydroxyphenyl) ethoxy] carbonyl]-2-(3,4-dihydroxyphenyl)-7-hydroxy-2,3-dihydrobenzofuran-4-yl]prop-2-enoyl]oxy]-3-(3,4-dihydroxyphenyl) propanoic.

Dược liệu Đan sâm là rễ và thân rễ phơi hoặc sấy khô của cây Đan sâm (*Salvia miltiorrhiza* Bunge), họ Bạc hà (Lamiaceae). Đan sâm có tác dụng giãn tĩnh mạch, hoạt huyết, tăng cường tuần hoàn máu, làm hết ứ máu,... Vì vậy, Đan sâm hay được kết hợp với các vị dược liệu khác trong điều trị cho các bệnh nhân mắc bệnh tim mạch như giúp tiêu huyết khối, chống rối loạn nhịp tim, tăng huyết áp và thiếu máu cơ tim.

Chất lượng của dược liệu Đan sâm đã được tiêu chuẩn hóa trong các dược điển, cụ thể Dược điển Việt Nam V, Dược điển Trung Quốc 2015, Bộ dữ liệu dược liệu chuẩn của Hồng Kông, Dược điển Mỹ, Dược điển Anh. Các dược điển quy định về chỉ tiêu định tính bằng sắc ký lớp mỏng và định lượng bằng phương pháp HPLC có xác định hàm lượng các marker khác nhau trong đó có acid salvianolic B. Hàm lượng acid salvianolic B được quy định không dưới: 3,0 % (ĐDVN V, CP 2015, USP 42, BP 2019) và 4,4 % (Hong Kong). Các chế phẩm đông dược có Đan sâm ở Việt Nam cũng được đánh giá về hàm lượng acid salvianolic B theo quy định.

Việc kiểm soát chất lượng dược liệu Đan sâm đòi hỏi phải có các chất chuẩn trong đó có acid salvianolic B. Đến nay việc mua chuẩn acid salvianolic B phải đặt mua từ nước ngoài, giá thành cao, thời gian cung cấp bị kéo dài gây khó khăn cho các đơn vị kiểm nghiệm. Hiện chưa có chuẩn acid salvianolic B được thiết lập tại Việt Nam.

Do vậy để có được nguyên liệu thiết lập chuẩn, chúng tôi tiến hành: Nghiên cứu phân lập, tinh chế acid salvianolic B từ dược liệu Đan sâm (*Radix et Rhizoma Salviae miltiorrhizae*).

2. Thực nghiệm

2.1. Thiết bị, hóa chất, chất chuẩn

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

* Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương:

- Máy HPLC Shimadzu;
- Máy sắc ký lỏng khối phổ Sciex Qtrap 6500+ (Mỹ);
- Máy cận hồng ngoại Niolet iS50 NIR (Thermo);
- Cân kỹ thuật Mettler Toledo (d = 1mg), cân phân tích Mettler Toledo (d = 0,1mg);
- Bản mỏng silicagel 60 F₂₅₄; 60 RP-18 F₂₅₄ (Merck);
- Silica gel 60 (40 - 63 μm) (Merck); silica gel RP-18 (150 μm) (YMC);

- Bộ cất quay chân không Buchi;
- Cột thủy tinh, pipet chính xác và các dụng cụ thủy tinh cần thiết khác.

* Viện Hóa học:

- Máy cộng hưởng từ hạt nhân Bruker 500MHz.

2.1.2. Hóa chất, dung môi, chất chuẩn

- Chất chuẩn acid salvianolic B: Hàm lượng 95 % (C₃₆H₃₀O₁₆) tính theo nguyên trạng; Số lô: FOM013, nguồn gốc: USP.

- Chuẩn dược liệu Đan sâm, số lô: CV 0116016.01, nguồn gốc: VKNTTW

- n-Hexan, ethyl acetat, dicloromethan, methanol, aceton, acid formic: đạt tinh khiết phân tích; Acetonitril, methanol: đạt tinh khiết sắc ký.

2.2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Đối tượng nghiên cứu

Nguyên liệu sử dụng là dược liệu Đan sâm mua trên thị trường, được định tính và kiểm tra hàm lượng acid salvianolic B đạt theo ĐDVN V, hàm lượng acid salvianolic B trong nguyên liệu là 3,98 %, tính theo nguyên trạng.

2.2.2. Phương pháp nghiên cứu

a. Phân lập và tinh chế acid salvianolic B (AS-B)

* **Chiết xuất:** Tham khảo chuyên luận *Salvia Total Phenolic Acids*, trong CP 2015 và tiến hành khảo sát khả năng phân tán của AS-B trong nước ở các pH khác nhau và ethyl acetat, chúng tôi đưa ra quy trình chiết xuất cao chứa acid salvianolic B như sau: Dược liệu Đan sâm được thái nhỏ, nghiền thành bột thô, sau đó chiết bằng nước nóng. Loại tạp bằng ethanol, n-hexan, sau đó được acid hóa và đem chiết với ethyl acetat. Dịch chiết ethyl acetat được cô thu hồi dung môi tạo cặn A.

* **Phân lập và tinh chế**

Acid salvianolic B tiếp tục được phân lập ra khỏi **Cặn A** lần lượt trên các cột pha thuận và pha đảo. Do AS-B là chất phân cực, do đó dung môi rửa giải qua cột cần có độ phân cực cao.

Phân lập thô: Mẫu thử được hòa tan trong methanol, sau đó được phân tách bằng phương pháp sắc ký cột pha thuận. Khảo sát để lựa chọn dung môi rửa giải. Kiểm tra các phân đoạn bằng phương pháp sắc ký lớp mỏng. Phân đoạn chứa AS-B (**cặn B**) được chuyển sang giai đoạn phân lập tinh.

Phân lập tinh và tinh chế: Sử dụng phương pháp sắc ký cột pha đảo. Khảo sát để lựa chọn dung môi rửa giải. Kiểm tra các phân đoạn bằng phương pháp sắc ký lớp mỏng. Định danh chất tinh chế được bằng các phương pháp đo phổ UV, IR, MS, NMR. Xác định hàm lượng chất tinh chế được bằng phương pháp HPLC.

b. Điều kiện sắc ký để định tính và định lượng AS-B

Chúng tôi tiến hành khảo sát các hệ dung môi thích hợp để phân tách AS-B bằng phương pháp sắc ký lớp mỏng, xây dựng và thẩm định phương pháp định lượng AS-B để đưa ra các phương pháp để định tính và định lượng AS-B như sau:

* Điều kiện sắc ký lớp mỏng (TLC)

- Pha thuận: Bản mỏng silica gel 60 F₂₅₄ (Merck)

+ Dung môi triển khai: Dicloromethan - methanol - acid formic (4 : 1 : 0,1);

+ Phát hiện vết: UV 254 nm hoặc 366 nm.

- Pha đảo: Bản mỏng silica gel 60 RP-18 GF 254 (Merck)

+ Dung môi triển khai:

Hệ 1: Aceton - nước - acid formic (40 : 60 : 1);

Hệ 2: MeOH - nước - acid formic (40 : 60 : 1);

Hệ 3: Acetonitril- nước - acid formic (30 : 70 : 0,4).

+ Phát hiện vết: UV 254 nm hoặc 366 nm.

* Phương pháp định lượng AS-B

Dung dịch chuẩn: Khoảng 0,2 mg/ml acid salvianolic B trong methanol.

Dung dịch thử: Cân chính xác khoảng 10 mg chất tinh chế được vào trong bình định mức 50 ml, thêm 35 ml methanol, lắc siêu âm 10 phút, để nguội và thêm vừa đủ đến vạch bằng methanol, lắc đều.

- Điều kiện sắc ký:

+ Cột sắc ký RP-18 (25cm x 4,6 mm, 5μm).

+ Pha động: Methanol - acetonitril - nước - acid formic (30 : 10 : 59 : 1).

+ Bước sóng phát hiện: 286 nm.

+ Tốc độ dòng: 1,0 ml/phút.

+ Thể tích tiêm: 10 μl.

3. Kết quả và bàn luận

3.1 Chiết xuất phân lập và tinh chế AS-B

3.1.1 Chiết xuất

Cân 200 g dược liệu Đan sâm đã nghiền thành bột thô chiết với nước nóng 2 lần (500 ml nước, đun ở 80°C trong 1h), lọc. Gộp dịch chiết nước, cô đến cao lỏng tỷ trọng khoảng 1,2. Thêm ethanol vào cao lỏng đến khi được dung dịch ethanol 70%, để yên trong 12 h, lọc lấy dịch. Cô dịch lọc còn khoảng 200 ml. Lắc dịch lọc với 200 ml n-hexan, loại bỏ lớp n-hexan. Dịch chiết nước được acid hóa bằng dung dịch HCl 5N đến pH2, chiết tiếp với ethyl acetat. Cô dịch chiết ethyl acetat đến khô được **cẩn A (20g)**.

3.1.2. Phân lập và tinh chế AS-B

* **Phân lập thô:** Chuẩn bị cột sắc ký: Dùng cột thủy tinh đường kính 10 cm, được nhồi 400g silica gel (cỡ hạt 40 - 63 μm). Lấy 20 g **cẩn A** hòa trong 5 ml methanol, đưa lên cột. Rửa giải bằng hỗn hợp dung môi dicloromethan-methanol-acid formic (9 : 1 : 0,2). Kiểm tra sự có mặt của AS-B trong các lọ hứng bằng phương pháp TLC pha thuận (**Mục 2.2.2.b**) (**Hình 2**). Gộp các lọ có AS-B, cất thu hồi dung môi đến cạn thu được **cẩn B (9 g)**.

* **Phân lập tinh và tinh chế:** Tiến hành lần lượt qua 3 cột sắc ký pha đảo (cột thủy tinh đường kính 6 cm, nhồi 200 g silica gel pha đảo RP-18, cỡ hạt 150 μm). Cẩn được nghiền mịn, đưa lên cột.

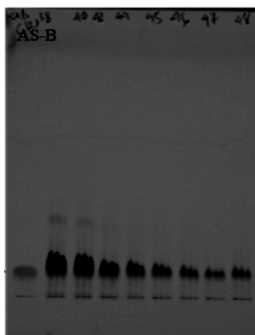
- Cột 1: Hỗn hợp dung môi rửa giải: Aceton - nước - acid formic (25 : 75 : 1). Hứng dịch rửa giải, kiểm tra sự có mặt của AS-B bằng phương pháp TLC pha đảo, dung môi triển khai Hệ 1 (**Hình 3**). Gộp các lọ chứa AS-B, cất thu hồi dung môi được **cẩn C (2,3 g)**.

- Cột 2: Hỗn hợp dung môi rửa giải: Methanol-nước-acid formic (30 : 70 : 1). Hứng dịch rửa giải, kiểm tra sự có mặt của AS-B bằng phương pháp TLC pha đảo, dung môi triển khai Hệ 2 (**Hình 4**). Gộp các lọ chứa AS-B, cất thu hồi dung môi được **cẩn D (1,3 g)**.

- Cột 3: Hỗn hợp dung môi rửa giải: Acetonitril-nước - acid formic (30 : 70 : 0,4). Hứng dịch rửa giải, kiểm tra sự có mặt của AS-B bằng phương pháp TLC pha đảo, dung môi triển khai Hệ 3 (**Hình 5**). Gộp các lọ chứa AS-B, cất thu hồi dung môi được **Chất tinh chế (1,1 g)**.

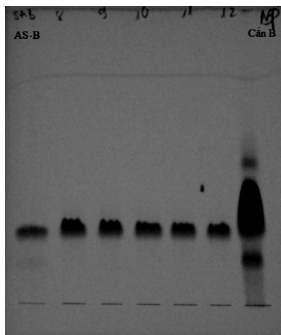
Từ kết quả đánh giá hàm lượng AS-B trong nguyên liệu Đan sâm: 3,98 % và khối lượng **Chất tinh chế** thu được (1,1 g), tính được hiệu suất của quy trình là: 13,8 %.

Lặp lại quy trình chiết xuất phân lập và tinh chế thêm 2 lần, tổng sản phẩm thu được là 3,3 g **Chất tinh chế**.



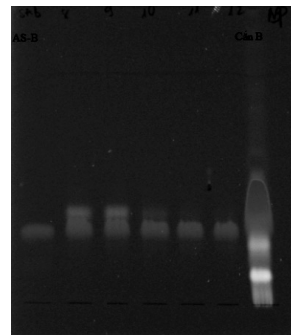
UV 254

Hình 2: Phân đoạn có AS-B trong giai đoạn **Phân lập thô**

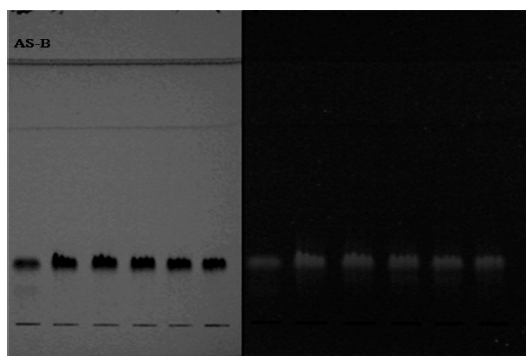


UV 254

Hình 3: Phân đoạn có AS-B trong giai đoạn **Phân lập tinh và tinh chế (cột 1)**



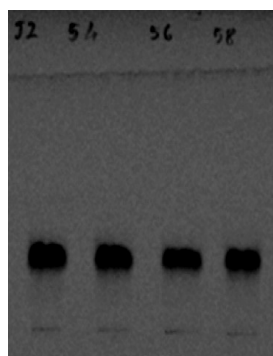
UV 366



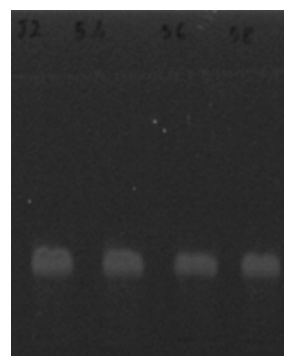
UV 254

UV 366

Hình 4: Phân đoạn có AS-B trong giai đoạn **Phân lập tinh và tinh chế (cột 2)**



UV 254



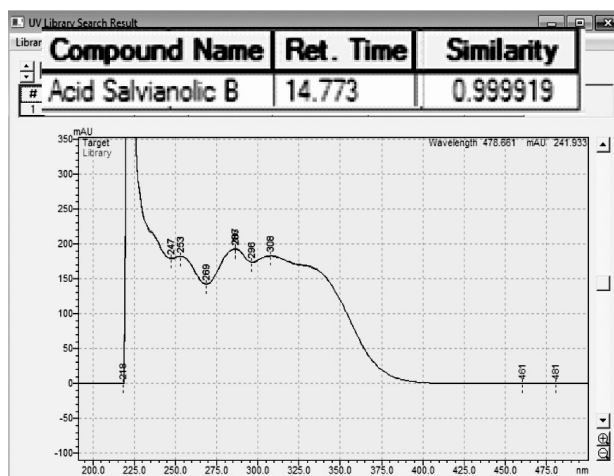
UV 366

Hình 5: Phân đoạn có AS-B trong giai đoạn **Phân lập tinh và tinh chế (cột 3)**

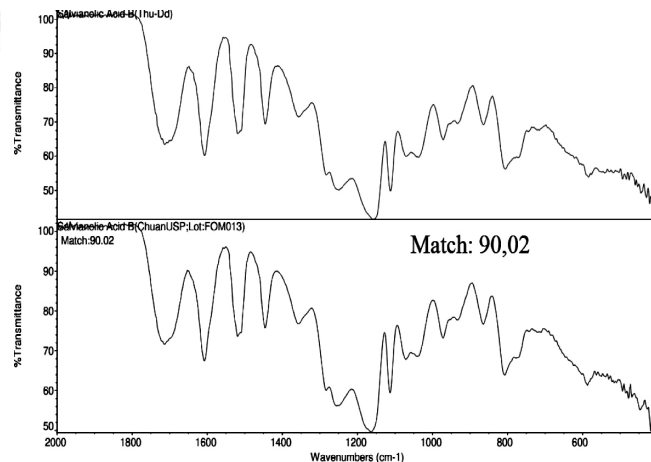
3.2. Xác định cấu trúc và hàm lượng chất tinh chế được

3.2.1. Xác định cấu trúc của chất tinh chế được

Tiến hành đo phổ UV, IR, MS và NMR của chất tinh chế được và chuẩn acid salvianolic B. Kết quả như sau:

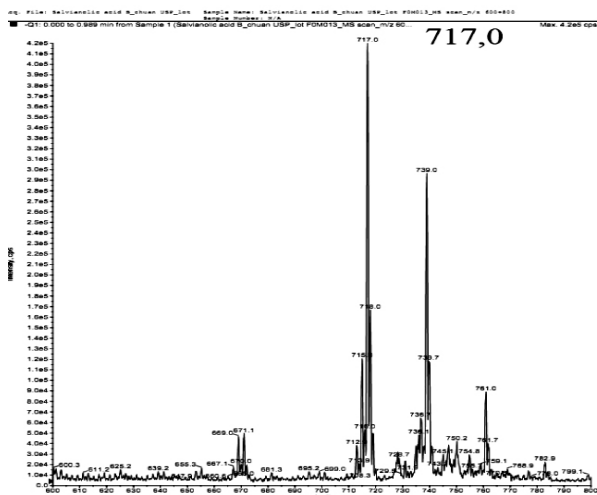


Hình 6: So phổ UV của chất tinh chế và chuẩn acid salvianolic B

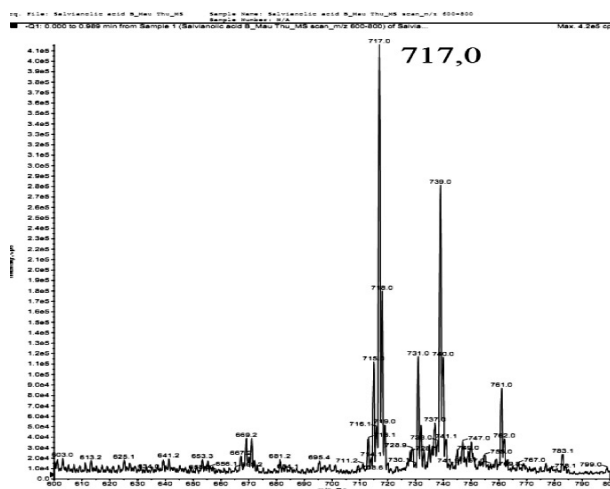


Hình 7: So phổ IR của chất tinh chế và chuẩn acid salvianolic B

Nhận xét: Kết quả chồng phổ UV có hệ số similarity là 0,9999 và so sánh phổ IR cho hệ số match là trên 90%.

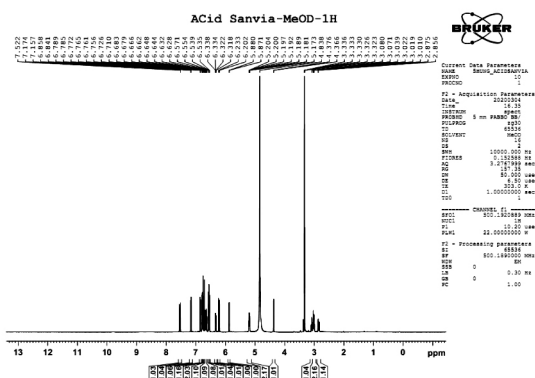


Hình 8: Phổ MS của chuẩn acid salvanolic B

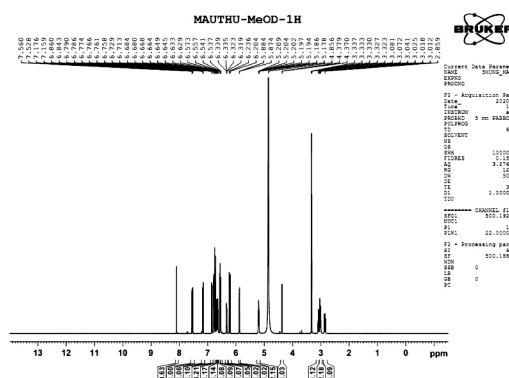


Hình 9: Phổ MS của chất tinh chế

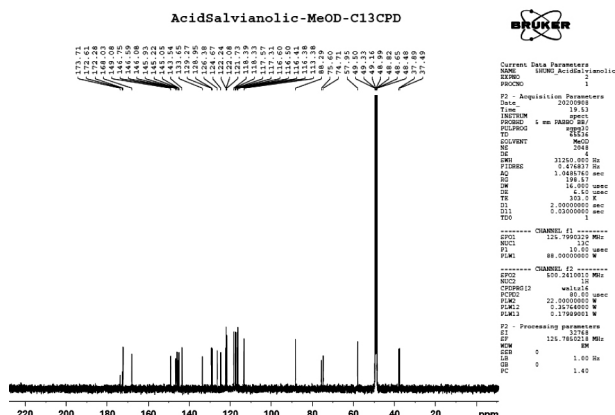
Nhận xét: Kết quả thu được, trên sắc ký đồ của dung dịch chuẩn và dung dịch thử đều cho mảnh phổ có số khối $m/z \approx 717,0$ tương ứng với ion $[M-H]^-$ phù hợp với khối lượng phân tử của acid salvanolic B ($M = 718,6$ g/mol).



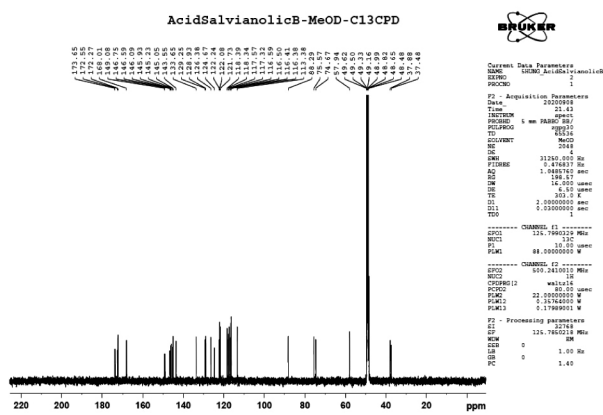
Hình 10: Phổ 1H -NMR của chuẩn acid salvanolic B



Hình 11: Phổ 1H -NMR của chất tinh chế



Hình 12: Phổ ^{13}C -NMR của chuẩn acid salvanolic B



Hình 13: Phổ ^{13}C -NMR của chất tinh chế

Nhận xét: Phổ NMR cho phổ ^1H -NMR và ^{13}C -NMR tương tự nhau giữa chất tinh chế được và chất chuẩn acid salvianolic B.

Từ kết quả UV, IR, MS và NMR cho thấy chất tinh chế được chính là acid salvianolic B.

3.2.2. Xác định hàm lượng acid salvianolic B tinh chế

Tiến hành định lượng hàm lượng chất tinh chế bằng phương pháp HPLC như mô tả trong **Mục 2.2.2.b**, ghi sắc ký đồ, thời gian lưu và diện tích pic AS-B trên sắc ký đồ dung dịch chuẩn và dung dịch thử. Căn cứ vào nồng độ dung dịch chuẩn, tính kết quả hàm lượng AS-B trong

mẫu thử. Kết quả thu được chất tinh chế có hàm lượng AS-B là 92,58%, tính theo nguyên trạng.

4. Kết luận

Nhóm nghiên cứu đã xây dựng được quy trình chiết xuất, phân lập và tinh chế acid salvianolic B bằng phương pháp chiết lỏng - lỏng và sắc ký cột. Quy trình khá đơn giản, dễ tiến hành, sử dụng các dung môi hóa chất thông dụng. Chất tinh chế thu được là acid salvianolic B có khối lượng 3,3 g, có hàm lượng 92,58% đáp ứng được nguyên liệu để thiết lập chất chuẩn acid salvianolic B.

Tài liệu tham khảo

1. Đỗ Tất Lợi (1999), *Những cây thuốc và vị thuốc Việt Nam*, Nhà xuất bản Y học.
2. Bộ Y tế (2017), *Dược điển Việt Nam V*, Nhà xuất bản Y học.
3. Viện Dược liệu (2006), *Cây thuốc và động vật làm thuốc ở Việt Nam tập 1*, Nhà xuất bản khoa học và kỹ thuật, Hà Nội.
4. Chinese Medicine Division, Department of Health, Government of the Hong Kong Special Administrative Region, *The Hong Kong Chinese Materia Medica Standards*, Vol.1.
5. The State Pharmacopoeia Commission of P.R. China (2015), *The Chinese Pharmacopoeia*, vol.1, P. 401, 402, pp. 520 - 524.
6. Hyounghae Lee, Ki Hoon Lee, Keun-Hyung Park, and Jae-Hak Moon (2010) "Large scale isolation and purification of salvianolic acid B in high purity from roots of Danshen (*Salvia miltiorrhiza* Bunge)", *Food Sci. Biotechnol.*, 19(2), pp. 497-502.
7. Hanqing Pang, Liang Wu, Yuping Tang, Guisheng Zhou, Cheng Qu and Jin-ao Duan (2016), "Chemical Analysis of the Herbal Medicine *Salviae miltiorrhizae Radix et Rhizoma* (Danshen)" *Molecules*, 21, 51; doi:10.3390/molecules21010051.
8. Yinshi Suna, Haifang Zhua, JianhuaWanga, Zhengbo Liua, Jianjie Bi (2009), "Isolation and Purification of salvianolic acid A and salvianolic acid B from *Salvia miltiorrhiza* by high-speed counter-current chromatography and comparison of their antioxidant activity", *Journal of Chromatography B*, 877, pp. 733-737.
9. Tiantian Ye, Haibin Qu and Xingchu, Gong (2019), "Preparation of salvianolic acid B disodium salt considering the water extract quality standard", *Molecules*, 24, 1269; doi: 10.3390/molecules 24071269.
10. Min Zhang, Huihua Yang, Xian Chen, Yongchuan Zhou, Hongyang Zhang YuerongWang, Ping Hu (2011), "Insitu extraction and separation of salvianolic acid B from *Salvia miltiorrhiza* Bunge by integrated expanded bed adsorption", *Separation and Purification Technology*, 80, pp. 677-682.

SUMMARY

Column chromatography method was developed for isolation and purification of salvianolic acid B from the root of Danshen (*Salvia miltiorrhiza* Bunge). Using of silica gel G (size 40 - 63 μm) and RP-18 (size 150 μm) as station phases and suitable mobile phases. The resulting purifier is salvianolic acid B with the weight of 3.3 g, with a content of 92.58%, meeting the raw materials to establish the salvianolic acid B standard.

(Ngày nhận 27/03/2020; Ngày phản biện 21/04/2020; Ngày duyệt đăng 30/03/2021)

ĐÁNH GIÁ ĐỘC TÍNH CẤP VÀ BÁN TRƯỜNG DIỄN CỦA VIÊN NHUẬN TRÀNG HADIPHAR

NÔNG THỊ VÂN, NGUYỄN THỊ LIÊN

Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương

Từ khóa: Thử độc tính cấp, thử độc tính bán trường diễn, viên nhuận tràng Hadiphar.

1. Đặt vấn đề

Rối loạn tiêu hóa là vấn đề về tiêu hóa phổ biến hiện nay, bất cứ ai cũng có thể mắc phải tình trạng này. Đây là vấn đề tuy không ảnh hưởng trực tiếp tới tính mạng nhưng nếu tình trạng này kéo dài có thể dẫn đến các bệnh lý mạn tính về đường tiêu hóa, ảnh hưởng tới cuộc sống của con người. Trong các triệu chứng rối loạn tiêu hóa thì tiêu chảy và táo bón là những triệu chứng thường gặp nhất. Hiện nay do nhu cầu về các loại thuốc điều trị rối loạn đường tiêu hóa ngày càng lớn nên có nhiều loại thuốc mới ra đời, đi cùng với đó là nhu cầu đánh giá tính an toàn và hiệu quả của thuốc. Đáp ứng nhu cầu trên, ở Việt Nam cũng có nhiều các đơn vị tham gia vào hoạt động đánh giá này với cách làm đôi khi còn khác nhau. Để thống nhất cách thức thực hiện tạo điều kiện thuận lợi cho việc đánh giá kết quả và công nhận kết quả lẫn nhau, Bộ y tế đã ban hành hướng dẫn “Thử nghiệm tiền lâm sàng và lâm sàng thuốc Đông y, thuốc từ dược liệu” (ban hành kèm theo Quyết định số 141/QĐ-K2ĐT ngày 27/10/2015) [2]. Trong hướng dẫn đã nêu nghiên cứu độc tính cấp và bán trường diễn là hai chỉ tiêu được đề cập đầu tiên trong số các chỉ tiêu cơ bản để bước đầu đánh giá tính an toàn của các thuốc nói chung và thuốc điều trị rối loạn đường tiêu hóa nói riêng [2]. Vì vậy ở nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành thử độc tính cấp và độc tính bán trường diễn của sản phẩm “Viên nhuận tràng Hadiphar” do Công ty Cổ phần Dược Hà Tĩnh sản xuất nhằm sơ bộ đánh giá tính an toàn của sản phẩm.

2. Thực nghiệm

2.1. Thiết bị, dụng cụ, hóa chất

- Máy xét nghiệm sinh hóa (Beckman Coulter AU 680, Mỹ);
- Máy xét nghiệm huyết học (Sysmex XS-1000I, Nhật Bản);

- Máy li tâm lạnh (Eppendorf 5804 R, Đức);
- Máy cắt vi thể Microm HM315, Đức;
- Kính hiển vi quang học gắn camera kết nối máy tính (Nikon);
- Kim cong cho uống;
- Xy lanh, găng cao su, cốc thủy tinh, chày cối sứ;
- Bộ kit định lượng các chỉ số huyết học và sinh hóa (của Stromatolyser và Beckman Coulter);
- Các hóa chất khác.

2.2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Động vật thí nghiệm

Chuột nhắt trắng giống Swiss, trọng lượng 18 - 20 g, đạt tiêu chuẩn thí nghiệm do Trung tâm Chăn nuôi động vật thí nghiệm CIMAD - Viện Vệ sinh Dịch tễ Trung ương cung cấp.

Thỏ trưởng thành khỏe mạnh, cả 2 giống (đực và cái), cân nặng 2,0 - 2,5 kg, đạt tiêu chuẩn thí nghiệm do Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương cung cấp.

Tất cả các quy trình thực hiện trên động vật thí nghiệm đều được chuẩn hóa theo các quy định của GLP và ISO 17025 và tuân thủ các quy định đạo đức trong nghiên cứu y sinh học.

2.2.2. Đối tượng nghiên cứu

Thực phẩm chức năng “Viên nhuận tràng Hadiphar” do Công ty cổ phần Dược Hà Tĩnh sản xuất, số lô sản xuất: RD001, ngày sản xuất 01/01/2017, hạn dùng: 01/01/2020.

2.2.3. Phương pháp nghiên cứu

2.2.3.1. Thử độc tính cấp [1],[2],[3]

Chuột nhắt trắng được nuôi trong điều kiện chuồng thoáng mát, đảm bảo vệ sinh, chế độ ăn uống theo nhu cầu của chuột. Chuột được nhịn ăn 15 giờ trước khi thí nghiệm, nước uống theo nhu cầu. Kiểm tra cân nặng

trước khi thử nghiệm. Chuột đạt các yêu cầu về cân nặng được đưa vào thử nghiệm.

Đường dùng thuốc: Đường uống, cho chuột uống bằng cách dùng bơm tiêm kim cong đầu tù để đưa thẳng thuốc vào dạ dày chuột.

Chuẩn bị mẫu thử: Cân một lượng mẫu thử, trộn đều, thêm nước vừa đủ để tạo thành hỗn dịch thử có chứa 0,80 g mẫu thử/ml.

Chia chuột nhất trắng thành các lô, mỗi lô 10 con. Tiến hành thử nghiệm sơ bộ xác định mức liều LD_0 (không làm chết chuột) và LD_{100} (làm chết 100% số chuột thí nghiệm). Thử nghiệm chính thức được tiến hành trên 5 nhóm chuột với 3 liều trung gian thêm giữa LD_0 và LD_{100} . Tính liều LD_{50} theo phương pháp Behrens [2].

Theo dõi biểu hiện của chuột (về thể trạng, hành vi, vận động, tình trạng ăn, uống, phân, nước tiểu,...) sau khi uống trong 24 giờ đầu và theo dõi hoạt động của chuột trong thời gian 7 ngày sau khi uống.

2.2.3.2. Thử độc tính bán trường diễn [2],[5],[6]

Nghiên cứu độc tính bán trường diễn được tiến hành trên 3 nhóm thử gồm 1 nhóm chứng và 2 nhóm thử, mỗi nhóm 8 con. Hai nhóm thử được cho uống mẫu thử với liều 0,558 viên/kg thử (5 ml hỗn dịch B/kg thử) và liều 1,674 viên/kg thử (5 ml hỗn dịch A/kg thử). Nhóm chứng: cho uống nước. Cho thử uống bằng cách dùng xi lanh bơm thuốc qua ống thông (sonde) được luồn từ miệng vào thẳng dạ dày thử. Thời gian uống liên tục 28 ngày.

Mẫu thử: Chuẩn bị 2 hỗn dịch có nồng độ khác nhau. Hỗn dịch A (nồng độ 0,335 viên/ml): Nghiền bột thuốc

của 55 viên mẫu thử với nước vừa đủ 164,3 ml (hỗn dịch A). Hỗn dịch B (nồng độ 0,112 viên/ml): Pha loãng 40 ml hỗn dịch A với nước vừa đủ 120 ml (hỗn dịch B).

Thỏ được nuôi trong cùng điều kiện môi trường và cùng chế độ dinh dưỡng cân bằng, được cho ăn và uống nước đầy đủ trong suốt quá trình thử nghiệm.

Theo dõi thỏ hàng ngày về mức độ tiêu thụ thức ăn, khả năng hoạt động, tình trạng phân, lông. Trước thí nghiệm, xác định cân nặng của thỏ, các dấu hiệu toàn thân, lấy máu xét nghiệm đánh giá các chỉ số huyết học (số lượng hồng cầu, bạch cầu, tiểu cầu, hemoglobin, hematocrit), các chỉ số sinh hóa (AST, ALT, cholesterol, bilirubin, creatinin, urea, protein toàn phần). Theo dõi cân nặng của thỏ hàng tuần. Sau 14 và 28 ngày uống thuốc, lấy máu thỏ để làm các xét nghiệm nêu trên. So sánh kết quả của nhóm thử và nhóm chứng theo phương pháp thống kê. Quan sát đại thể và vi thể một số tổ chức (gan và thận) sau khi kết thúc thí nghiệm.

3. Kết quả và bàn luận

3.1. Độc tính cấp

Trước tiên chúng tôi tiến hành nghiên cứu sơ bộ để tìm mức liều không làm chết chuột thí nghiệm và mức liều làm chết 100% số chuột thí nghiệm. Qua thử nghiệm này, chúng tôi đã tìm được liều không gây chết chuột là 24,0 g mẫu thử/kg chuột, liều gây chết 100% số chuột thử nghiệm là 44,0 g mẫu thử/kg chuột.

Tiếp đó ở thử nghiệm chính thức, chúng tôi cho chuột uống với 6 mức liều tăng dần như ở Bảng 1.

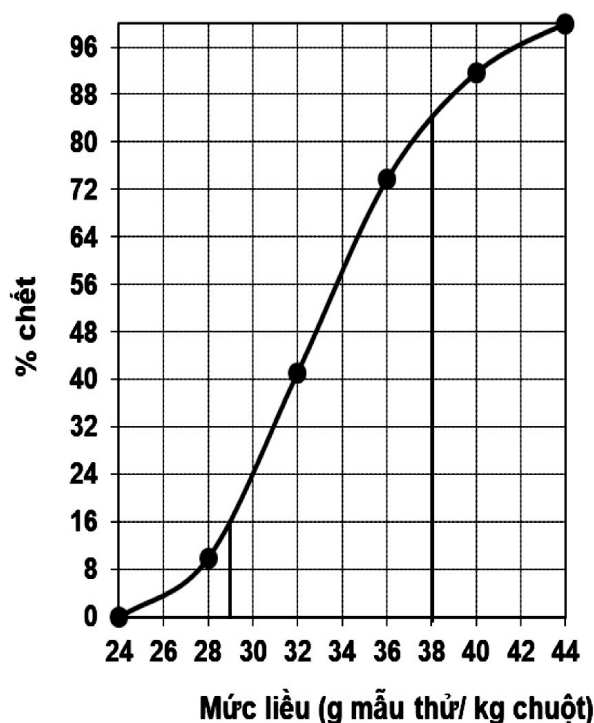
Bảng 1. Số liệu thử độc tính cấp viên nhuận tràng Hadiphar

Mức liều	Liều thử (g mẫu thử/kg chuột)	Số chuột chết/ sống thực tế	Số chuột chết/ sống kỳ vọng	% Chết
1	24,0	0/10	0/28	0
2	28,0	2/8	2/18	10,00
3	32,0	5/5	7/10	41,18
4	36,0	7/3	14/5	73,68
5	40,0	8/2	22/2	91,67
6	44,0	10/0	32/0	100,00

Sau khi uống thuốc, chuột có các biểu hiện ngộ độc tùy theo mức liều uống. Ở mức liều thấp (24,0 g/kg chuột) không nhận thấy có biểu hiện ngộ độc, chuột ăn uống, hoạt động bình thường tuy nhiên lượng phân bài tiết ra nhiều và ướt hơn so với nhóm chứng. Ở mức liều

2, 3, 4, 5 và 6, sau khi uống hỗn dịch thử, số chuột chết có biểu hiện nằm mê, giảm hoạt động (bài tiết ra nhiều phân ướt). Số chuột không chết ở các mức liều trên cũng có biểu hiện giảm hoạt động, mệt mỏi. Sau 24 giờ, số chuột không chết ăn uống hoạt động bình thường trở lại.

Đồ thị số liệu độc tính cấp thực nghiệm của viên nhuận tràng Hadiphar được trình bày ở Hình 1.



Hình 1. Đồ thị số liệu độc tính cấp

Tiếp đó chúng tôi tính sai số chuẩn theo công thức $(Es_{LD50})^2 = ksd/n$

Trong đó: k : Hệ số Behrens = 0,66

n : Số chuột trong mỗi nhóm,

s : Phân phối chuẩn có giá trị bằng $(LD_{84} - LD_{16})/2$

Với LD_{84} và LD_{16} là các mức liều gây chết 84% và 16% động vật thí nghiệm trên đồ thị số liệu độc tính cấp.

Theo đồ thị, ta có: $LD_{16} = 29,0$ g mẫu thử/kg chuột, $LD_{84} = 38,0$ g mẫu thử/kg chuột.

Giá trị $s = (38,0 - 29,0)/2 = 4,5$ g mẫu thử/kg chuột.

Sai số chuẩn: $(Es_{LD50})^2 = ksd/n = 0,66 \times 4,5 \times 4,0/10$ nên $S_{LD50} = 1,1$ g mẫu thử/kg chuột

Vậy $LD_{50} = (33,1 \pm 1,1)$ g mẫu thử/kg chuột.

3.2. Độc tính bán trường diễn

Trước tiên chúng tôi lựa chọn mức liều thử nghiệm cho nghiên cứu thử độc tính bán trường diễn của sản phẩm viên nhuận tràng Hadiphar dựa trên liều sử dụng

LD_{50} được tính theo phương pháp Behrens [2] theo công thức:

$$LD_{50} = A + (50 - a) \times d/(b - a)$$

Trong đó:

A : Liều gây chết a % ĐVTN

a : % ĐVTN chết sát dưới 50% sao cho $a < 50\%$

b : % ĐVTN chết sát trên 50% sao cho $b > 50\%$

d : khoảng cách giữa các liều (g)

Dựa trên bảng số liệu ta có:

$a = 41,18\%$

$b = 73,68\%$

$A = 32,0$ (g/kg chuột)

$d = 4,0$ (g/kg chuột)

Như vậy:

$$LD_{50} = 32,0 + (50 - 41,18) \times 4,0/(73,68 - 41,18)$$

$$LD_{50} = 33,1 \text{ g mẫu thử/kg chuột.}$$

tối đa trên người là 9 viên/người/ngày) và sử dụng hệ số chuyển đổi liều giữa thỏ và người là 3,1 [6] để lựa chọn 2 mức liều thử nghiệm là 0,56 viên/kg thỏ (tương ứng với mức liều dự kiến cho người là 9 viên/người 50 kg/ngày) và 1,67 viên/kg thỏ (cao gấp 3 lần liều dự kiến cho người).

3.2.1. Kết quả theo dõi cân nặng thỏ

Trong thời gian thí nghiệm, tất cả các thỏ đều hoạt động bình thường, ăn uống tốt, lông mượt. Không có biểu hiện bất thường về thể trạng, ăn uống cũng như vận động. Tuy nhiên thỏ ở 2 nhóm thử bài tiết nhiều phân ướt hơn so với nhóm chứng. Kết quả theo dõi cân nặng được trình bày ở Bảng 2. Thỏ tăng cân ở nhóm chứng và hai nhóm thử, có sự khác biệt khi so sánh với trước thử nghiệm trong mỗi nhóm ($P < 0,05$). Như vậy trước thử nghiệm và sau thử nghiệm cân nặng trung bình của thỏ ở các nhóm thử không có sự khác biệt so với nhóm chứng ($P_{\text{trước}}(T1-C)$ và $P_{\text{trước}}(T2-C) > 0,05$), ($P_{\text{sau}}(T1-C)$ và $P_{\text{sau}}(T2-C) > 0,05$).

Bảng 2. Số liệu cân nặng thô

Nhóm (n=8)	Kết quả cân nặng (kg)					P
	Trước TN (m ₀)	Sau 7 ngày (m ₁)	Sau 14 ngày (m ₂)	Sau 21 ngày (m ₃)	Sau 28 ngày (m ₄)	
Chứng (C)	2,12 ± 0,07	2,22 ± 0,10	2,30 ± 0,10	2,37 ± 0,10	2,45 ± 0,10	P _{trước-sau} < 0,001
% so với trước thử nghiệm		104,6%	108,4%	111,2%	114,6%	
Thử 1 (T1)	2,16 ± 0,11	2,26 ± 0,09	2,35 ± 0,10	2,39 ± 0,13	2,48 ± 0,15	P _{trước-sau} < 0,001
% so với trước thử nghiệm		104,6%	109,1%	110,7%	115,0%	P _{trước (T1-C)} > 0,05 P _{sau (T1-C)} > 0,05
Thử 2 (T2)	2,17 ± 0,08	2,27 ± 0,10	2,36 ± 0,09	2,33 ± 0,11	2,47 ± 0,14	P _{trước-sau} < 0,001
% so với trước thử nghiệm		104,7%	109,0%	107,3%	114,2%	P _{trước (T2-C)} > 0,05 P _{sau (T2-C)} > 0,05

3.2.2. Kết quả theo dõi các chỉ số huyết học

Trước, giữa và sau khi thử nghiệm, thô được kiểm tra các chỉ số về huyết học, số liệu được trình bày ở Bảng 3. Kết quả so sánh thống kê theo t-test cho thấy: trước, giữa và sau thí nghiệm không có sự khác biệt có ý nghĩa giữa nhóm chứng và 2 nhóm thí nghiệm (P_{C-T trước} > 0,05; P_{C-T giữa} > 0,05; P_{C-T sau} > 0,05) (Bảng 4).

Bảng 3. Kết quả theo dõi các chỉ số huyết học thô của các nhóm thử nghiệm

Nhóm \ Chỉ số		Hồng cầu (x 10 ¹² /lít)	Bạch cầu (x 10 ⁹ /lít)	Tiểu cầu (x 10 ⁹ /lít)	Hematocrit (%)	Hemoglobin (g/dl)
Chứng (n=8)	Trước TN	5,7 ± 0,4	9,0 ± 1,7	452,5 ± 86,4	38,8 ± 2,5	12,0 ± 0,8
	Giữa TN	5,6 ± 0,8	9,4 ± 1,2	401,6 ± 80,7	38,3 ± 2,6	11,2 ± 1,1
	Sau TN	5,5 ± 0,3	10,3 ± 2,0	345,9 ± 52,8	36,8 ± 1,8	12,1 ± 0,5
Thử 1 (n=8)	Trước TN	5,5 ± 0,5	8,6 ± 1,1	427,0 ± 86,0	37,2 ± 2,6	11,6 ± 0,9
	Giữa TN	5,5 ± 0,7	8,7 ± 0,9	437,8 ± 86,2	40,1 ± 4,3	11,3 ± 1,3
	Sau TN	5,7 ± 0,3	9,0 ± 1,4	342,4 ± 58,2	38,2 ± 1,8	12,4 ± 0,6
Thử 2 (n=8)	Trước TN	5,8 ± 0,5	8,4 ± 1,8	403,0 ± 88,3	38,5 ± 2,5	12,1 ± 0,9
	Giữa TN	5,2 ± 0,5	9,4 ± 2,1	397,3 ± 77,6	36,6 ± 5,7	11,7 ± 1,1
	Sau TN	5,8 ± 0,4	8,8 ± 1,4	381,1 ± 38,0	38,4 ± 2,1	12,6 ± 0,6

Bảng 4. Kết quả so sánh thống kê theo t-test các chỉ số huyết học thô của các nhóm thử nghiệm

Chỉ số P		Hồng cầu	Bạch cầu	Tiểu cầu	Hematocrit	Hemoglobin
Trước TN	P_{C-T1}	0,451	0,643	0,564	0,239	0,319
	P_{C-T2}	0,704	0,533	0,276	0,839	0,814
Giữa TN	P_{C-T1}	0,950	0,244	0,402	0,341	0,951
	P_{C-T2}	0,372	0,919	0,914	0,439	0,461
Sau TN	P_{C-T1}	0,234	0,160	0,902	0,147	0,286
	P_{C-T2}	0,112	0,105	0,148	0,115	0,083

3.2.3. Kết quả theo dõi các chỉ số sinh hóa (thuộc chức năng gan và thận)

Qua kết quả xét nghiệm chỉ số sinh hóa trước, giữa và sau thí nghiệm hầu hết các chỉ số đều không có sự khác biệt giữa nhóm chứng và 2 nhóm thử ($P_{C-T \text{ trước}} > 0,05$) (Bảng 5, 6).

Bảng 5. Kết quả theo dõi các chỉ số sinh hóa (gan, thận) của thử của các nhóm thử nghiệm

Chỉ số Nhóm		AST (U/lit)	ALT (U/lit)	Bilirubin toàn phần ($\mu\text{mol/lit}$)	Protein toàn phần (g/lit)	Cholesterol (mmol/l)	Urea (mmol/lit)	Creatinin ($\mu\text{mol/lit}$)
Chứng (n=8)	Trước TN	38,9 $\pm$ 12,1	63,8 $\pm$ 13,3	1,3 $\pm$ 0,9	60,0 $\pm$ 2,8	2,2 $\pm$ 1,0	4,0 $\pm$ 0,9	88,1 $\pm$ 4,9
	Giữa TN	39,6 $\pm$ 10,9	59,0 $\pm$ 14,1	2,4 $\pm$ 1,0	53,1 $\pm$ 8,0	2,6 $\pm$ 0,6	3,3 $\pm$ 0,5	95,5 $\pm$ 12,8
	Sau TN	38,9 $\pm$ 12,6	61,1 $\pm$ 19,9	1,4 $\pm$ 1,0	54,5 $\pm$ 4,6	1,9 $\pm$ 0,7	4,1 $\pm$ 0,7	101,8 $\pm$ 11,5
Thử 1 (n=8)	Trước TN	33,1 $\pm$ 13,5	59,6 $\pm$ 14,2	1,3 $\pm$ 0,8	59,8 $\pm$ 3,7	2,4 $\pm$ 1,1	4,4 $\pm$ 0,5	87,6 $\pm$ 14,4
	Giữa TN	33,3 $\pm$ 9,0	53,8 $\pm$ 10,6	2,0 $\pm$ 0,8	57,5 $\pm$ 7,1	2,6 $\pm$ 0,7	3,3 $\pm$ 0,8	86,7 $\pm$ 13,8
	Sau TN	50,6 $\pm$ 16,3	70,4 $\pm$ 19,1	1,6 $\pm$ 0,9	54,6 $\pm$ 3,5	2,2 $\pm$ 0,8	4,0 $\pm$ 0,7	112,6 $\pm$ 16,2
Thử 2 (n=8)	Trước TN	33,0 $\pm$ 13,8	62,5 $\pm$ 15,6	1,5 $\pm$ 0,9	60,0 $\pm$ 2,5	2,9 $\pm$ 1,6	4,5 $\pm$ 0,5	96,3 $\pm$ 11,4
	Giữa TN	35,9 $\pm$ 8,2	58,5 $\pm$ 11,6	2,1 $\pm$ 1,1	53,7 $\pm$ 7,4	2,2 $\pm$ 0,5	3,2 $\pm$ 0,9	96,2 $\pm$ 5,9
	Sau TN	53,8 $\pm$ 19,9	72,5 $\pm$ 13,2	1,5 $\pm$ 1,0	54,9 $\pm$ 3,3	1,9 $\pm$ 0,4	4,3 $\pm$ 0,8	109,6 $\pm$ 8,6

Bảng 6. Kết quả so sánh thống kê theo t-test các chỉ số sinh hóa thử của các nhóm thử nghiệm

Chỉ số P		AST	ALT	Bilirubin toàn phần	Protein toàn phần	Cholesterol	Urea	Creatinin
Trước TN	P_{C-T1}	0,381	0,551	0,921	0,935	0,841	0,321	0,928
	P_{C-T2}	0,373	0,860	0,672	1,000	0,335	0,222	0,095
Giữa TN	P_{C-T1}	0,225	0,416	0,397	0,259	0,951	0,953	0,207
	P_{C-T2}	0,449	0,932	0,654	0,869	0,135	0,908	0,896
Sau TN	P_{C-T1}	0,131	0,353	0,789	0,990	0,449	0,813	0,498
	P_{C-T2}	0,096	0,198	0,809	0,878	0,944	0,147	0,149

3.2.4. Kết quả theo dõi chỉ số glucose trong huyết tương

Qua kết quả xét nghiệm chỉ số glucose trong huyết tương trước, giữa và sau thí nghiệm hầu hết các chỉ số đều không có sự khác biệt giữa nhóm chứng và 2 nhóm thử ($P_{C-T \text{ trước}} > 0,05$) (Bảng 7).

3.2.5. Quan sát đại thể

Kết quả quan sát đại thể các cơ quan nội tạng của tất cả các thử nghiệm cho thấy: không có biểu hiện khác thường về hình dạng bên ngoài, màu sắc của các tổ chức tim, gan, thận, phổi, dạ dày, ruột của các thử nghiệm so với nhóm chứng sau thí nghiệm.

Bảng 7. Kết quả theo dõi chỉ số glucose trong huyết tương của thử của các nhóm thử nghiệm

Chỉ số		Glucose (mmol/lit)	P_{C-T}
Nhóm			
Chứng (n = 8)	Trước TN	$7,5 \pm 0,8$	-
	Giữa TN	$7,1 \pm 1,0$	-
	Sau TN	$6,1 \pm 0,7$	-
Thử 1 (n = 8)	Trước TN	$7,8 \pm 0,5$	0,429
	Giữa TN	$7,0 \pm 1,4$	0,966
	Sau TN	$6,5 \pm 0,8$	0,424
Thử 2 (n = 8)	Trước TN	$7,9 \pm 0,9$	0,372
	Giữa TN	$6,3 \pm 1,1$	0,181
	Sau TN	$6,3 \pm 0,3$	0,464

3.2.6. Quan sát vi thể

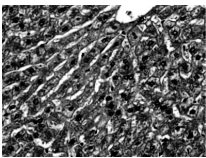
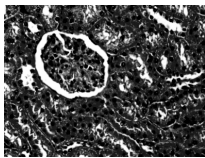
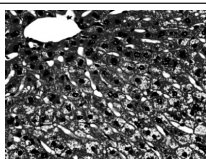
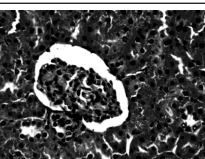
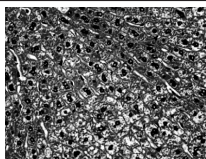
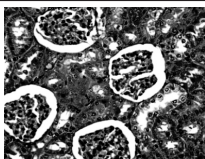
Lấy mẫu tiêu bản gan, thận trên 3 thử ngẫu nhiên trong từng nhóm thí nghiệm và nhóm chứng, tiêu bản quan sát vi thể. Tiêu bản gan và thận được cố định bằng Formalin 10%, nhuộm bằng dung dịch nhuộm Hematoxylin eosin (HE) và Perioric acid Schiff (PAS) và quan sát dưới kính hiển vi quang học độ phóng đại 100 và 400. Các thử nghiệm đều có gan và thận không bị tổn thương, hình ảnh cấu trúc trong giới hạn bình thường. Không có các triệu chứng bất thường liên quan đến mẫu thử với 2 mức liều khác nhau so với nhóm chứng.

Trên các mảnh cắt của mô gan cho thấy cấu trúc gan không bị đảo lộn, nhận rõ các tiểu thùy với tĩnh mạch trung tâm và các khoảng cửa. Tại các khoảng cửa không

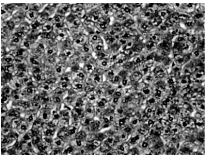
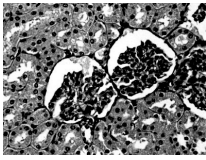
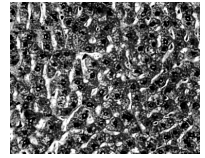
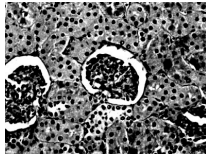
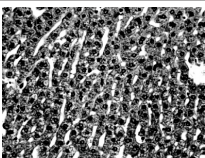
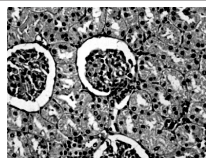
thấy tăng sinh xơ, không thấy tăng sinh ống mật và cũng không thấy xâm nhập viêm. Các tế bào gan có hình thái bình thường, tỷ lệ tế bào gan thoái hóa thấp (khoảng 1% và chủ yếu thoái hóa nước), một số tế bào lắng đọng glycogen mức độ nhẹ, không thấy hoại tử tế bào gan (Bảng 8 và 9).

Trên các mảnh cắt từ mô thận cho thấy các cầu thận, ống thận có hình thái bình thường. Trong các cầu thận nhận rõ khoang Bowman, không thấy tăng sinh tế bào cuộn mao mạch cầu thận, màng đáy cuộn mao mạch cầu thận không dày. Các ống thận có cấu trúc, hình thái trong giới hạn bình thường, mô đệm không thấy xâm nhập viêm, không xơ hóa. Các tế bào ống thận không lắng đọng glycogen, không thoái hóa, không hoại tử (Bảng 8 và 9).

Bảng 8. Hình ảnh giải phẫu mô bệnh học gan và thận (nhuộm HE, độ phóng đại 400 lần)

STT	Nhóm	Hình ảnh mô gan	Hình ảnh mô thận
1	Chứng	 Nhu mô gan có cấu trúc hình thái trong giới hạn bình thường.	 Các cầu thận và ống thận có hình thái bình thường
2	Thử 1 (liều thấp)	 Nhu mô gan có cấu trúc hình thái trong giới hạn bình thường.	 Các cầu thận và ống thận có hình thái bình thường
3	Thử 2 (liều cao)	 Mô gan không hoại tử, không xơ hóa.	 Các cầu thận và ống thận có hình thái bình thường

Bảng 9. Hình ảnh giải phẫu mô bệnh học gan và thận (nhuộm PAS, độ phóng đại 400 lần)

STT	Nhóm	Hình ảnh mô gan	Hình ảnh mô thận
1	Chứng	 Mô thận bình thường, không thấy tổn thương	 Màng đáy cầu thận và ống thận không dày.
2	Thử 1 (liều thấp)	 Mô thận bình thường, không thấy tổn thương	 Cuộn mao mạch cầu thận, màng đáy cầu thận và ống thận không dày
3	Thử 2 (liều cao)	 Mô thận bình thường, không thấy tổn thương	 Cuộn mao mạch cầu thận, màng đáy cầu thận và ống thận không dày

4. Kết luận

Kết quả thu được trong nghiên cứu này cho thấy mẫu thử viên nhuận tràng Hadiphar có $LD_{50} = (33,1 \pm 1,1)$ g mẫu thử/kg chuột. Theo phân loại độc tính của GHS [4], mẫu thử viên nhuận tràng Hadiphar có độc tính thấp dưới ngưỡng phân loại.

Khi cho thỏ uống mẫu thử với 2 mức liều là 0,56 viên/kg thỏ/ngày (tương ứng với mức liều tối đa dùng cho người là 9 viên/người/ngày) và mức liều 1,67 viên/kg thỏ/ngày (cao gấp 3 lần so với liều tối đa dùng cho người), trong 28 ngày không thấy có ảnh hưởng có ý nghĩa thống kê đến thể trạng, chức năng tạo máu và mô bệnh học gan thận trong suốt quá trình uống.

Không nhận thấy sự bất thường và khác nhau về hình dạng bên ngoài, màu sắc của các tổ chức tim, gan, thận, phổi và hệ tiêu hóa khi quan sát đại thể cũng như cấu trúc của gan, thận khi quan sát vi thể của thỏ giữa nhóm chứng và 2 nhóm thử.

Các kết quả thực nghiệm ban đầu cho thấy viên nhuận tràng Hadiphar có độc tính thấp trên chuột nhắt trắng và không ảnh hưởng có hại với thỏ khi dùng thuốc liên tục trong 28 ngày.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Đỗ Trung Đàm (2014), *Phương pháp xác định độc tính cấp của thuốc*, Nhà xuất bản Y học, Hà Nội.
2. Bộ Y tế (2015), *Hướng dẫn thử nghiệm tiền lâm sàng thuốc Đông y, thuốc từ dược liệu* (Ban hành kèm theo Quyết định số 141/QĐ-K2ĐT ngày 27/10/2015 của Bộ Y tế).
3. Behrens B. and Kaber G. (1983), *Mathematics for Naturalists and Agriculturalists*, PWN, Warszawa, p.218.
4. GHS 8th Edition (2019), *Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS)*, United Nations.
5. OECD guidelines for testing of chemical (2008), *Repeated dose 28 - days Oral Toxicity study in Rodents*, OECD 407.
6. Sharma V. and McNeill J. H. (2009), "To scale or not to scale: The principles of dose extrapolation", *British Journal of Pharmacology*, 157, 907–921.

SUMMARY

"Viên nhuận tràng Hadiphar" capsules manufactured by Ha Tinh Pharmaceutical Company, was evaluated for acute and subchronic toxicity in mice and rabbits, respectively. The acute toxicity results indicated that LD_{50} of "Viên nhuận tràng Hadiphar" in mice according to the method of Behrens is (33.1 ± 1.1) g/kg body weight for single dose oral administration (equivalent to 269.0 capsules/50 kg body weight human/day). In the repeated - dose toxicity study, rabbits were administrated "Viên nhuận tràng Hadiphar" with the doses of 0.56 and 1.67 capsules/kg/day for 28 days (equivalent to the dose using on human and the dose of 3 times more than one using on human). Blood sample were taken

on day 0, day 14 and day 28 of experiment for hematological, biochemical exams. Liver and kidney samples were taken on day 28 for histopathological determinations. The repeated dose toxicity results revealed that there were no significant differences in hematological and serum biochemical values between control and treatment animals. Furthermore, no histopathological changes in the liver and kidney of rabbits treated with “Viên nhuan trang Hadiphar” were observed.

(Ngày nhận bài: 31/11/2019; Ngày phản biện: 06/02/2020; Ngày duyệt đăng: 16/12/2020)

NGHIÊN CỨU XÂY DỰNG QUI TRÌNH ĐỊNH TÍNH, ĐỊNH LƯỢNG 2',4'-DIHYDROXY-6'-METHOXY-3',5'-DIMETHYLCHALCON TRONG NỤ VÀ LÁ VỎI (*CLEISTOCALYX OPERCULATUS*)

PHƯƠNG THIÊN THƯƠNG

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

NGUYỄN THỊ PHƯƠNG THẢO*, NGUYỄN THỊ HẰNG

Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương

Từ khóa: Vối, *Cleistocalyx operculatus*; 2',4'-dihydroxy-6'-methoxy-3',5'-dimethylchalcon;

1. Đặt vấn đề

Cây Vối [*Cleistocalyx operculatus* (Roxb.) Merr. et Perry] thuộc họ Sim – Myrtaceae được coi là một vị thuốc quý. Lá Vối và nụ Vối được nhân dân sử dụng với cách chế biến đơn giản tạo thành loại trà nấu hay hãm lấy nước uống hàng ngày vừa có tác dụng thanh nhiệt vừa có tác dụng kiện tỳ, tiêu thực, hạ đường huyết [1]. Về tác dụng sinh học, Vối có tác dụng chống viêm, chống oxy hóa, chống ung thư, kháng bệnh Alzheimer's, kháng virus, làm giảm đường huyết [5]. Hợp chất là 2',4'-dihydroxy-6'-methoxy-3',5'-dimethylchalcon ($C_{18}H_{18}O_4$ - ký hiệu là CO1) đã được chứng minh là thành phần chính của Vối nụ và Vối lá [3]. CO1 cũng đã được chứng minh có tác dụng chống viêm [5], phục hồi tế bào gan bị tổn thương [6], hạ đường huyết [4], ức chế sự phát triển của tế bào ung thư [7] nên phù hợp với các tác dụng kể trên và công dụng thanh nhiệt, chống viêm, hạ đường huyết của dược liệu Vối nụ trong Dược điển Việt Nam V [1].

Nụ Vối và lá Vối được dùng trong dân gian, trong y học cổ truyền và đến nay đã có nhiều sản phẩm trà được sản xuất từ dược liệu này. Vối lá và Vối nụ đã được đưa vào Dược điển Việt Nam [1] nhưng chưa thấy có trong các Dược điển các nước khác. Theo Dược điển Việt

Nam V, Vối lá và Vối nụ được định tính bằng phương pháp hóa học và phương pháp sắc ký lớp mỏng (so sánh với dược liệu đối chiếu), định lượng bằng xác định chất chiết trong dược liệu bằng phương pháp chiết nóng với ethanol 70%. Tuy nhiên, Dược điển Việt Nam chưa quy định sử dụng chất đánh dấu để định tính và định lượng [1].

Trong đề tài cấp cơ sở của Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương “Nghiên cứu chiết xuất, phân lập và tinh chế 2',4'-dihydroxy-6'-methoxy-3',5'-dimethylchalcon từ nụ Vối (*Flos Cleistocalysis operculati*) để thiết lập chất chuẩn” chúng tôi đã chiết xuất, tinh chế và thiết lập chất chuẩn CO1 [2].

Hiện nay, mới có tác giả C-L Ye và cộng sự công bố quy trình sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) định lượng đồng thời CO1 và acid ursolic trong nụ Vối (dung môi pha động methanol – acid H_3PO_4 0,2% (93:7), detector UV 220 nm, tốc độ dòng 1ml/phút). Trong đó, đã công bố kết quả thẩm định phương pháp chưa đầy đủ gồm độ tuyến tính (2 – 60 $\mu\text{g/ml}$), LOD = 0,2 $\mu\text{g/ml}$, độ đúng tại một mức nồng độ (97,5% với RSD = 4,8%) [9]. Bài báo này chúng tôi trình bày kết quả nghiên cứu xây dựng và thẩm định qui trình định tính và định lượng chất CO1 trong nụ Vối và lá Vối bằng phương pháp HPLC.

2. Phương pháp nghiên cứu

2.1. Thiết bị, hóa chất

2.1.1. *Thiết bị, dụng cụ*: Các thiết bị, dụng cụ của Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương (đã được hiệu chuẩn theo yêu cầu của ISO/IEC 17025 và GLP), gồm:

- Máy HPLC SHIMADZU LC20A, detector DAD;
- Cân phân tích METTLER TOLEDO XPE-26; độ phân giải 0,001 mg
- Bộ dụng cụ sinh hàn, pipet chính xác...

2.1.2. Hóa chất, dung môi

- Methanol (HPLC; Merck); Acetonitril (HPLC; Merck); Ethanol 96% (PA; Việt Nam); Toluene (PA, Merck); Acid formic (PA, Merck); Silica gel (63-200 μ m; Merck).
- Chất chuẩn 2',4'-dihydroxy-6'-methoxy-3',5'-dimethylchalcon (Sản phẩm đề tài cơ sở của Viện Kiểm nghiệm thuốc trung ương), SKS: E0120358.01

2.2. Đối tượng nghiên cứu

Nụ Vôi (*Flos Cleistocalyx operculati*) và Lá Vôi (*Folium Cleistocalyx operculati*): thu hái ở thành phố Thanh Hóa vào tháng 5 năm 2019, sấy ở 40 - 45°C trong 24 giờ, xay nhỏ, độ ẩm tương ứng là 8,41% và 6,44%.

2.3. Phương pháp nghiên cứu

2.3.1. Xây dựng quy trình chuẩn bị mẫu:

- Mẫu thử được chiết bằng 4 quy trình khác nhau để lựa chọn quy trình phù hợp

+ *Quy trình 1*: Cân chính xác khoảng 1 g bột dược liệu, thêm khoảng 50 ml methanol (mẫu nụ Vôi)/ 25 ml methanol (mẫu lá Vôi), siêu âm ở 40 - 50 °C trong 30 phút, gạn lấy dịch chiết. Tiến hành như trên thêm 3 - 4 lần nữa. Dừng khi dịch chiết đem kiểm tra không còn cho phản ứng tạo màu xanh đen với dung dịch sắt (III) clorid 5%.

+ *Quy trình 2*: Cân chính xác khoảng 1 g bột dược liệu, thêm khoảng 50 ml methanol (mẫu nụ Vôi)/ 25 ml methanol (mẫu lá Vôi), đun hồi lưu cách thủy ở 70 °C trong 30 phút, gạn lấy dịch chiết. Tiến hành như trên thêm 3 - 4 lần nữa. Dừng khi dịch chiết đem kiểm tra không còn cho phản ứng tạo màu xanh đen với dung dịch sắt (III) clorid 5%.

+ *Quy trình 3*: Cân chính xác khoảng 1 g bột dược liệu, thêm khoảng 50 ml ethyl acetat (mẫu nụ Vôi)/ 25 ml ethyl acetat (mẫu lá Vôi), lắc siêu âm ở 40 - 50 °C trong 30 phút, gạn lấy dịch chiết. Tiến hành như trên thêm 3 - 4 lần nữa. Dừng khi dịch chiết đem kiểm tra không còn cho phản ứng tạo màu xanh đen với dung dịch sắt (III) clorid 5%.

+ *Quy trình 4*: Cân chính xác khoảng 1 g bột dược liệu, thêm khoảng 50 ml ethyl acetat (mẫu nụ Vôi)/ 25 ml ethyl acetat (mẫu lá Vôi), đun hồi lưu cách thủy ở 80 °C trong 30 phút, gạn lấy dịch chiết. Tiến hành như trên thêm 3 - 4 lần nữa. Dừng khi dịch chiết đem kiểm tra không còn cho phản ứng tạo màu xanh đen với dung dịch sắt (III) clorid 5%.

2.3.2. Quy trình phân tích

Chúng tôi đã khảo sát, xây dựng và lựa chọn quy trình phân tích như sau:

- *Dung dịch chuẩn*: Dung dịch chuẩn CO1 nồng độ khoảng 0,01 mg/ml trong methanol. Lọc qua màng lọc 0,45 μ m.

- *Dung dịch thử*: lựa chọn quy trình chiết xuất từ 04 quy trình chiết đã khảo sát

- *Điều kiện HPLC [2]*:

- Cột sắc ký Gemini NX - RP 18, 5 μ m (25cm x 4,6 mm).

- Detector diode array với bước sóng phát hiện 220 nm

- Pha động: Pha A: Methanol; Pha B: Nước; Pha C: Acetonit

<i>Thời gian (phút)</i>	<i>Pha A (% tt/tt)</i>	<i>Pha B (% tt/tt)</i>	<i>Pha C (% tt/tt)</i>
0	40	50	10
40	80	10	10
60	40	50	10

- Tốc độ dòng: 1,0 ml/phút

- Thể tích tiêm: 50 μ l

Quy trình phân tích định tính, định lượng CO1 trong nụ Vôi và lá Vôi bằng sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) được thẩm định theo hướng dẫn chung của ICH Q2(R1) [4] và AOAC [10] về thẩm định phương pháp phân tích.

3. Kết quả và bàn luận

3.1. Lựa chọn cách chuẩn bị mẫu

- Kiểm tra khả năng chiết hoạt chất của dung môi: Dịch chiết sau lần chiết thứ 4 của quy trình 3 và quy trình 4 không cho phản ứng tạo màu xanh đen với dung dịch sắt (III) clorid. Dịch chiết sau lần chiết thứ 3 của quy trình 1 và quy trình 2 không cho phản ứng tạo màu xanh đen với dung dịch sắt (III) clorid. Lựa chọn quy trình 1 là quy trình chiết do thời gian chiết nhanh, phương pháp đơn giản, dung môi thông dụng, ít độc hại, cụ thể như sau:

+ Dung dịch thử nụ Vối: Cân chính xác khoảng 1 g bột nụ Vối đã nghiền mịn cho vào bình nón 100 ml, thêm 50 ml methanol và lắc siêu âm ở 50 °C trong 30 phút. Gạn dịch chiết vào bình định mức 200 ml. Tiến hành lặp lại quy trình chiết thêm 2 lần nữa. Sau đó thêm vừa đủ đến vạch với cùng dung môi, lắc đều, lọc, bỏ khoảng 10 ml dịch lọc đầu. Hút chính xác 5,0 ml dịch lọc cho vào bình định mức 20 ml và thêm dung môi pha mẫu vừa đủ đến vạch, lắc đều. Lọc qua màng lọc 0,45 µm.

+ Dung dịch thử lá Vối: Cân chính xác khoảng 1 g bột lá Vối đã nghiền mịn cho vào bình nón 100 ml, thêm 25 ml methanol và lắc siêu âm ở 50 °C trong 30 phút. Gạn dịch chiết vào bình định mức 100 ml. Tiến hành lặp lại quy trình chiết thêm 2 lần nữa. Sau đó thêm vừa đủ đến vạch với cùng dung môi, lắc đều, lọc, bỏ khoảng 10 ml dịch lọc đầu. Hút chính xác 3,0 ml dịch lọc cho vào bình định mức 10 ml và thêm dung môi pha mẫu vừa đủ đến vạch, lắc đều. Lọc qua màng lọc 0,45 µm.

3.2. Thẩm định quy trình định tính, định lượng COI bằng HPLC

3.2.1. Độ đặc hiệu

- Trên sắc ký đồ của dung dịch chuẩn và dung dịch mẫu thử nụ vối, lá vối: Thời gian lưu của pic COI là 30,9 phút; Sắc ký đồ dung dịch mẫu trắng không xuất hiện pic ở thời gian lưu 30,9 phút. Phổ UV của pic chính trên sắc ký đồ của dung dịch thử nụ vối và lá vối tương ứng với phổ UV của pic chính trên sắc ký đồ dung dịch chuẩn. Hệ số tương đồng phổ đạt 0,999.

- Độ tinh khiết sắc ký của pic trên sắc ký đồ của dung dịch chuẩn, dung dịch thử đều bằng 1,000.

- Các dung dịch mẫu thử nụ Vối và lá Vối phân hủy trong UV 254 nm (24 giờ); trong nhiệt độ (100 °C/8 giờ), môi trường acid (HCl 10%, 2 giờ), và môi trường oxy hóa (H₂O₂ 3%, 2 giờ), đều không xuất hiện thêm các tạp phân hủy. Dung dịch mẫu nụ Vối phân hủy trong môi trường kiềm (NaOH 10%, 2 giờ), xuất hiện các tạp trong khoảng 10 phút đến 20 phút và tạp ở 43,5 phút, đều tách hoàn toàn khỏi pic COI. Dung dịch mẫu lá Vối phân hủy trong môi trường kiềm (NaOH), xuất hiện các tạp trong khoảng 10 phút đến 15 phút, tách hoàn toàn khỏi pic COI. Hệ số tinh khiết pic COI đều bằng 0,9999 (**Hình 1**).

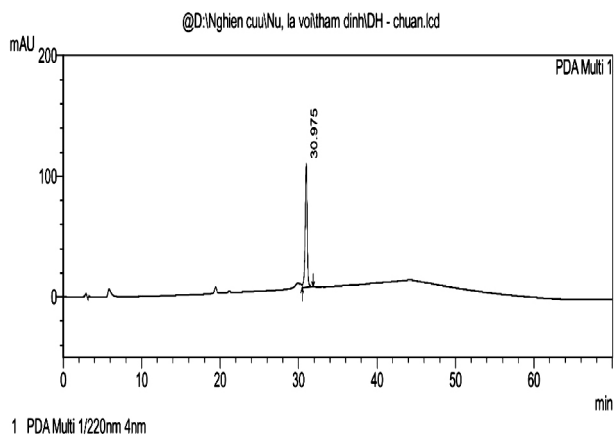
Như vậy chương trình sắc ký đã chọn đáp ứng yêu cầu về độ đặc hiệu.

3.2.2. Tính thích hợp hệ thống

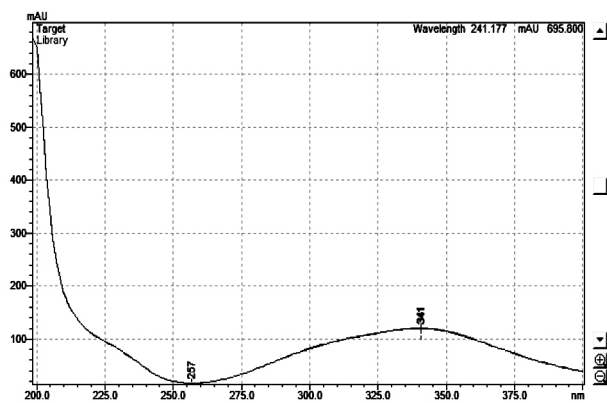
Chuẩn bị dung dịch chuẩn 1 có nồng độ 9,95027 µg/ml COI, tiêm lặp lại 06 lần. Kết quả thu được sau quá trình sắc ký cho thời gian lưu của pic COI ở khoảng 31,1 phút với độ lặp lại tương đối RSD là 0,61% (< 1,0%); diện tích pic trung bình là 1852950 mAU.S với độ lặp lại là 0,58% (< 1,0%); pic ra cân xứng với hệ số kéo đuôi T khoảng 0,95 và hiệu lực rửa giải tốt với số đĩa lý thuyết hơn 10000. Chuẩn bị thêm dung dịch chuẩn 2 có nồng độ là 10,08977 µg/ml, tiêm lặp lại 03 lần. Diện tích pic trung bình thu được là 1891544,7 mAU.s với độ lặp lại RSD là 0,21%. So sánh đáp ứng diện tích pic và nồng độ thu được của hai lần chuẩn bị mẫu chuẩn cho kết quả hệ số tương đồng đạt 1,007 (nằm trong khoảng từ 0,98 đến 1,02). Như vậy quy trình HPLC đã xây dựng đạt yêu cầu về độ thích hợp hệ thống.

3.2.3. Độ tuyến tính

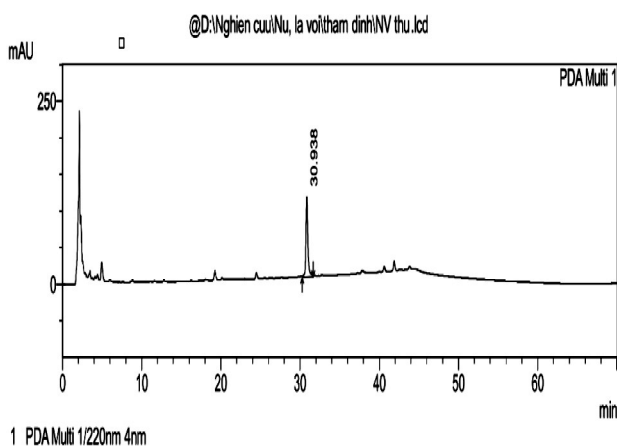
- Tiến hành sắc ký với một dãy 07 dung dịch chuẩn trong methanol có nồng độ 20%; 50%; 80%; 100%, 120%; 150% và 200 % so với nồng độ định lượng. Xác định phương trình hồi qui, hệ số tương quan tuyến tính giữa nồng độ chất chuẩn có trong các dung dịch và đáp ứng pic thu được trên các sắc ký đồ bằng phương pháp bình phương tối thiểu. Kết quả thu được ở **Bảng 1**.



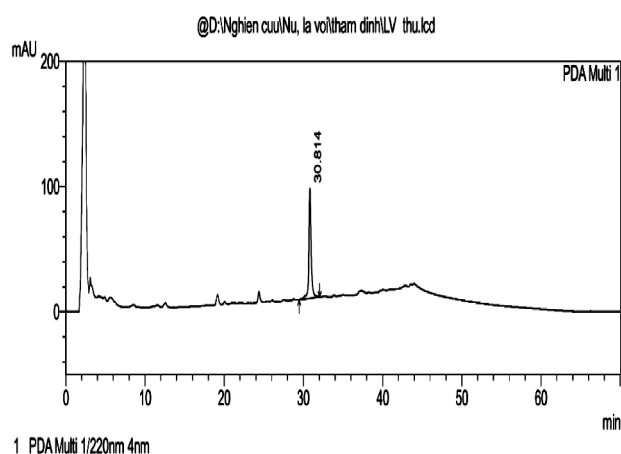
Dung dịch chuẩn



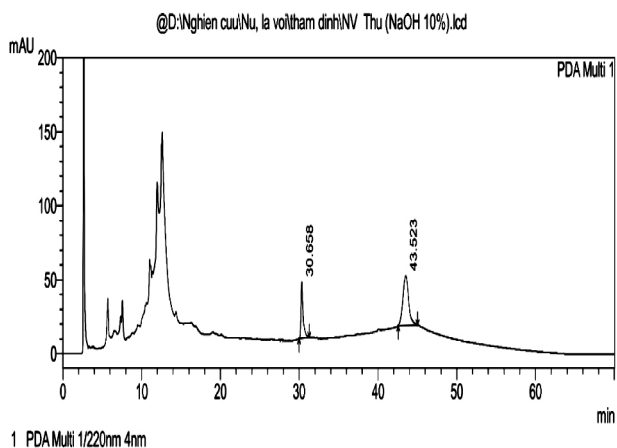
Kết quả chồng phổ UV mẫu thử và chuẩn NV



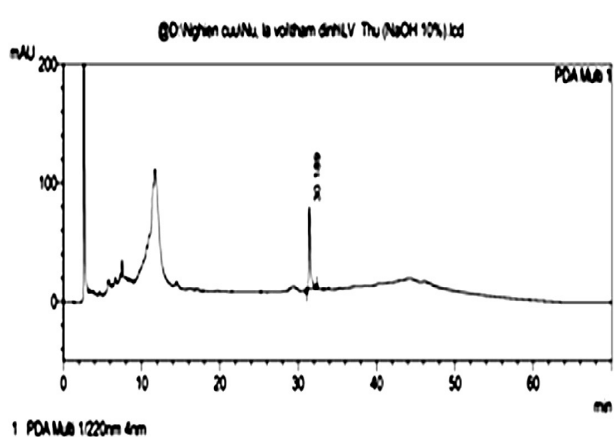
Dung dịch thử nụ Vối (NV)



Dung dịch thử lá Vối (LV)



Mẫu thử NV phân hủy trong NaOH 10%



Mẫu thử LV phân hủy trong NaOH 10%

Hình 1. Sắc ký đồ của các dung dịch thử nụ Vối và lá Vối phân hủy ở điều kiện khắc nghiệt

Bảng 1. Kết quả khảo sát độ tuyến tính

Stt	% so với nồng độ định lượng	Nồng độ ($\mu\text{g/ml}$)	Diện tích pic (mAU.s)
1	20 %	1,9901	377542
2	50 %	4,9751	928956
3	80 %	7,9602	1487116
4	100 %	9,9503	1844175
5	120 %	11,9403	2221104
6	150 %	14,9254	2782265
7	200 %	19,9005	3655522
Phương trình hồi qui		$y = 183683x + 19613$	
Hệ số tương quan		0,9999 > 0,998	
Hệ số chắn (intercept)		19613	
% Y		1,06 % < 2,0%	

Phương pháp nghiên cứu đạt độ tuyến tính trong khoảng nồng độ CO1 là 1,99 $\mu\text{g/ml}$ – 19,9 $\mu\text{g/ml}$

3.2.4. Độ đúng

Xác định độ đúng của phương pháp bằng cách tiến hành thực nghiệm trên các mẫu tự tạo.

- Chuẩn bị 03 loại mẫu tự tạo ở 3 mức nồng độ 75%, 100% và 200% so với nồng độ định lượng bằng cách thêm chính xác một lượng chất chuẩn CO1 vào nền mẫu là dược liệu nụ Vôi và lá Vôi có hàm lượng CO1 bằng khoảng 50% so với nồng độ định lượng. Tại mỗi mức nồng độ, thực hiện 03 mẫu độc lập. Tiến hành chuẩn bị mẫu và sắc ký theo quy trình và điều kiện đã chọn. Tính lượng CO1 có sẵn trong nền mẫu dựa vào kết quả ở mục 3.2.6. *Độ chính xác trung gian*. Tính tỷ lệ lượng hoạt chất thu hồi lại được so với lượng thêm vào để xác độ đúng của phương pháp.

- Chuẩn bị dung dịch chuẩn: Sử dụng dung dịch chuẩn 1 ở phần 3.2.2. *Tính thích hợp hệ thống* (9,95027 $\mu\text{g/ml}$)

Kết quả tỷ lệ thu hồi (%) của nụ Vôi và lá Vôi ở **Bảng 2, Bảng 3**

Bảng 2. Kết quả đánh giá độ đúng với mẫu thử nụ Vôi

% nồng độ định lượng	Lượng cân mẫu thử (g)	Lượng có sẵn ($\mu\text{g/ml}$)	Lượng thêm vào ($\mu\text{g/ml}$)	Diện tích pic (mAU.s)	Lượng tìm lại ($\mu\text{g/ml}$)	Thu hồi (%)
75%	0,49928	5,10451	2,48757	1418270	7,61608	100,32
75%	0,49867	5,09827	2,48757	1414342	7,59498	100,12
75%	0,50232	5,13559	2,48757	1419298	7,62160	99,98
Trung bình						100,14
RSD%						0,17
100%	0,49578	5,06872	4,97514	1877272	10,08091	100,37
100%	0,50185	5,13078	4,97514	1872026	10,05274	99,47
100%	0,49276	5,03785	4,97514	1875838	10,07321	100,60
Trung bình						100,15
RSD%						0,59
200%	0,51052	5,21942	14,92541	3757014	20,17508	100,15
200%	0,50737	5,18722	14,92541	3741409	20,09128	99,89
200%	0,49769	5,08825	14,92541	3738115	20,07359	100,30
Trung bình						100,11
RSD%						0,20
Trung bình (n=9)						100,13
RSD% (n=9)						0,33

Bảng 3. Kết quả đánh giá độ đúng với mẫu thử lá Vối

% nồng độ định lượng	Lượng cân mẫu thử (g)	Lượng có sẵn ($\mu\text{g/ml}$)	Lượng thêm vào ($\mu\text{g/ml}$)	Diện tích pic (mAU.s)	Lượng tìm lại ($\mu\text{g/ml}$)	Thu hồi (%)
75%	0,40122	3,84015	2,98508	1259237	6,76207	99,07
75%	0,40032	3,83154	2,98508	1254968	6,73915	98,86
75%	0,40076	3,83575	2,98508	1257279	6,75156	98,98
Trung bình						98,97
RSD%						0,11
100%	0,34875	3,33795	5,97016	1727250	9,27529	99,65
100%	0,34072	3,26110	5,97016	1720800	9,24066	100,10
100%	0,34452	3,29747	5,97016	1725280	9,26471	99,97
Trung bình						99,91
RSD%						0,23
200%	0,45976	4,40045	14,92541	3597390	19,31790	99,96
200%	0,46077	4,41012	14,92541	3605395	19,36089	100,13
200%	0,45913	4,39442	14,92541	3589425	19,27513	99,77
Trung bình						99,95
RSD%						0,18
Trung bình (n=9)						99,61
RSD% (n=9)						0,51

Phương pháp nghiên cứu đạt yêu cầu về độ đúng trên mẫu dược liệu nụ Vối và lá Vối.

3.2.5. Độ lặp lại

Tiến hành định lượng 06 mẫu thử được chuẩn bị độc lập theo qui trình phân tích. Sử dụng dung dịch chuẩn 1 ở phần thẩm định độ thích hợp hệ thống ở mục 3.2.2. Kết quả thu được ở **Bảng 4**.

Bảng 4: Kết quả khảo sát độ lặp lại trên mẫu nụ Vối và lá Vối

Stt	Nụ Với			Lá Với			
	Lượng cân mẫu thử (g)	Diện tích pic (mAu.s)	Hàm lượng (mg/g)	Lượng cân mẫu thử (g)	Diện tích pic (mAu.s)	Hàm lượng (mg/g)	
1	0,989741	1888474	8,95	0,99275	1764062	3,40	
2	0,99547	1892320	8,92	0,98042	1751000	3,42	
3	0,98756	1873626	8,90	0,99176	1773203	3,42	
4	0,99782	1905924	8,96	0,99721	1767265	3,39	
5	1,02061	1949519	8,96	0,97478	1723673	3,38	
6	0,99649	1902610	8,96	0,98986	1761228	3,40	
Trung bình			8,94	Trung bình			3,40
RSD (%)			0,29 < 2,0%	RSD (%)			0,43 < 2,0%

Phương pháp phân tích đáp ứng yêu cầu về độ lặp lại

3.2.6. Độ chính xác trung gian

Kiểm nghiệm viên 2 thực hiện định lượng CO1 trong nụ Vôi và lá Vôi theo quy trình phân tích đã xây dựng, trên thiết bị HPLC khác với Kiểm nghiệm viên 1. Chuẩn bị dung dịch chuẩn có nồng độ 9,72915 µg/ml, diện tích pic trung bình của 6 lần tiêm chuẩn là 2.061.608 mAu.s (RSD% = 0,08). Kết quả định lượng của Kiểm nghiệm viên 2 và kết quả định lượng tính trên 2 Kiểm nghiệm viên (n=12) được thể hiện ở **Bảng 5**

Bảng 5: Kết quả khảo sát độ chính xác trung gian trên mẫu nụ Vôi và lá Vôi

Stt	Nụ Vối			Lá Vối		
	Lượng cân mẫu thử (g)	Diện tích pic (mAu.s)	Hàm lượng (mg/g)	Lượng cân mẫu thử (g)	Diện tích pic (mAu.s)	Hàm lượng (mg/g)
1	1,02126	2205905	8,90	1,05157	2134873	3,41
2	0,97537	2111331	8,92	1,05564	2127057	3,39
3	0,97849	2114782	8,91	1,05228	2120584	3,39
4	1,02273	2228120	8,98	1,06461	2166610	3,42
5	1,02566	2230234	8,96	1,04398	2133156	3,44
6	1,01389	2189949	8,90	1,03863	2106917	3,41
Trung bình			8,93	Trung bình		3,41
RSD (%)			0,37	RSD (%)		0,55
Trung bình 2 kiểm nghiệm viên (n=12)			8,93	Trung bình 2 kiểm nghiệm viên (n=12)		3,41
RSD% (n=12)			0,32 < 2,0%	RSD% (n=12)		0,48 < 2,0%

Phương pháp phân tích đáp ứng yêu cầu về độ chính xác trung gian.

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

Từ kết quả phần 3.2.3. *Độ tuyến tính*, tiến hành phân tích thống kê trên phần mềm Excel để xác định độ lệch chuẩn số dư (= Standard error), ngoại suy ước tính LOD = 0,2 µg/ml, LOQ = 0,6 µg/ml. Pha loãng dung dịch thử nụ Vôi và lá Vôi đến các nồng độ LOD, LOQ như ước tính, kết quả thẩm định thực nghiệm giá trị LOD, LOQ được thể hiện ở **Bảng 6**.

Bảng 6: Kết quả thẩm định giá trị LOD, LOQ trên mẫu nụ Vôi và lá Vôi

Stt.	Nụ Vôi		Lá Vôi	
	Diện tích pic (mAU.s) dung dịch LOD	Diện tích pic (mAU.s) dung dịch LOQ	Diện tích pic (mAU.s) dung dịch LOD	Diện tích pic (mAU.s) dung dịch LOQ
1	34597	112432	36511	114318
2	34905	113016	37146	117641
3	34978	112053	36638	117706
4		113932		115847
5		113515		116416
6		113604		115594
TB	34826,67	113092,00	36765,00	116253,67
RSD (%)	0,58 %	0,65 %	0,91 %	1,12 %
S/N	6,2	10,5	4,8	10,1

Vậy phương pháp nghiên cứu có LOD = 0,2 µg/ml, LOQ = 0,6 µg/ml

4. Kết luận

Bài báo đã đưa ra được phương pháp định lượng 2',4'-dihydroxy-6'-methoxy-3',5'-dimethylchalcon trong nụ Vối và lá Vối bằng phương pháp HPLC với cách chuẩn bị mẫu và qui trình phân tích đơn giản, dễ thực hiện. Phương pháp có khoảng tuyến tính từ 2 – 20 µg/ml với $R^2 = 0,9999$, độ chính xác $\leq 0,55\%$ RSD, độ đúng 98,86 - 100,13 %, giới hạn định tính và giới hạn định lượng tương ứng là 0,2 µg/ml và 0,6 µg/ml đáp ứng các yêu cầu của AOAC [10], phù hợp để xác định hàm lượng 2',4'-dihydroxy-6'-methoxy-3',5'-dimethylchalcon trong mẫu trong mẫu nụ Vối và lá Vối với nhiều thành phần phức tạp và lượng hoạt chất thay đổi theo từng mẫu. Hàm lượng 2',4'-dihydroxy-6'-methoxy-3',5'-dimethylchalcon tìm thấy trong mẫu nghiên cứu nụ Vối là 8,9 mg/g và lá Vối là 3,4 mg/g.

Tài liệu tham khảo

1. Bộ Y tế (2017), *Dược điển Việt Nam V*, NXB Y học: Hà Nội. Tập 2, tr. 1371-1374.
2. Nguyễn Thị Phương Thảo, Lê Thị Thu và cs (2020), “Nghiên cứu chiết xuất, phân lập và tinh chế 2',4'-dihydroxy-6'-methoxy-3',5'-dimethylchalcon từ nụ Vối (*Flos Cleistocalyx operculati*) để thiết lập chất chuẩn”, *Đề tài cấp cơ sở Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương* tr. 41,
3. Phương Thiện Thương, Nguyễn Thị Hà Ly, Nguyễn Thị Phương, Nguyễn Thị Bích Thu (2018), “Lựa chọn chất đối chiếu trong kiểm nghiệm chất lượng Dược liệu và sản phẩm từ Dược liệu: Một số đóng góp từ nghiên cứu khoa học”. *Hội thảo nâng cao năng lực nghiên cứu, kiểm tra giám sát chất lượng dược liệu và thuốc từ dược liệu trong thời kỳ hội nhập*. Đà Nẵng: Viện Kiểm nghiệm thuốc thành phố Hồ Chí Minh.
4. ICH Q2(R1) (2005), *Validation of Analytical Procedures: Text and methodology*, ICH Harmonised Tripartite Guideline.
5. JW Choi, Kim M, Song H, Lee CS, Oh WK, Mook-Jung I, Chung SS, Park KS (2016), “DMC (2',4'-dihydroxy-6'-methoxy-3',5'-dimethylchalcone) improves glucose tolerance as a potent AMPK activator”. *Metabolism*, 65(4): p 533-542.
6. Liu WJ (2018), “A new aurone with anti-inflammatory activity from *Cleistocalyx operculatus* flower buds”. *China Journal of Chinese materia medica*, 43(7): p 1467-1470.
7. WG Yu, Qian J, Lu YH. (2011), “Hepato protective effects of 2',4'-dihydroxy-6'-methoxy-3',5'-dimethylchalcone on CCl₄-induced acute liver injury in mice”. *Journal of agricultural and food chemistry*, 59: p. 12821-12829
8. Ye Chun-Lin, Jian-Wen Liu, Dong-Zhi Wei, Yan-Hua Lu, Feng Qian (2005), “In vivo antitumor activity by 2',4'-dihydroxy-6'-methoxy-3',5'-dimethylchalcone in a solid human carcinoma xenograft model”. *Cancer Chemother Pharmacol*, 56: p 70-74.
9. C-L Ye và cộng sự (2005), “HPLC analysis of a bioactive chalcone and triterpene in the buds of *Cleistocalyx operculatus*”, *South African Journal of Botany*, 71(3&4): p 312–315
10. AOAC (2012), *Guidelines for Single Laboratory Validation of Chemical Methods for Dietary Supplements and Botanicals*.

SUMMARY

2',4'-dihydroxy-6'-methoxy-3',5'-dimethylchalcone (CO1) is the main composition in *Flos Cleistocalyx operculati* and *Folium Cleistocalyx operculati* with different important activities. A simple and available quantitative method was developed and validated to determine the content of CO1 in these mentioned herbal materials. A suitable amount of methanol was used to extract CO1 from powder of *Flos Cleistocalyx operculati* or *Folium Cleistocalyx operculati* by sonicating at 50 °C. To quantify CO1, 20 µl of total extracted solution then applied to reverse phase HPLC system with C18 column and gradient mobile phase program at different rates of methanol and acetonitrile in water, CO1 signal was detected by DAD detector at 220 nm. The method validation was performed according to the AOAC guidelines, and the method was specific, linear ($R^2 = 0.9999$ for 2 - 20 µg/ml), precise ($\leq 0.55\%$ RSD), and accurate (98.86 - 100.13 %). The limits of detection and quantification were 0.2 and 0.6 µg/ml, respectively.

Ngày nhận: 22/04/2021; Ngày phản biện: 28/09/2021; Ngày duyệt đăng: 30/9/2021

MỤC LỤC

Trang

● Nghiên cứu khoa học

- Nghiên cứu xây dựng qui trình định lượng Nebivolol trong huyết tương người bằng phương pháp LC-MS/MS.
KHUẤT VĂN MẠNH, HOÀNG VĂN ĐỨC, TRỊNH NAM TRUNG, 1
*TẠ MẠNH HÙNG, PHAN THỊ NGHĨA**
- Xây dựng phương pháp định tính và định lượng Erlotinib trong viên nén bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao
NGUYỄN VĂN BÌNH, NGUYỄN THỊ MINH TÂM, NGUYỄN HỮU THẢO, TRẦN THỊ HỒNG ANH 6
- Nghiên cứu phân lập, tinh chế acid Salvianolic B từ rễ Đan sâm.
BẠCH THỊ THẨM, VŨ TRỌNG KHOA, NGUYỄN TUẤN ANH, 11
*ĐOÀN CAO SƠN, TRẦN THỊ THU TRANG**
- Đánh giá độc tính cấp và bán trường diễn của “Viên nhuận tràng Hadiphar”.
NÔNG THỊ VÂN, NGUYỄN THỊ LIÊN 17*
- Nghiên cứu xây dựng qui trình định tính, định lượng 2',4'-Dihydroxy-6'-methoxy-3',5'-dimethylchalcon trong nụ vối và lá vối (*Cleistocalyx operculatus*)
NGUYỄN THỊ PHƯƠNG THẢO, NGUYỄN THỊ HẰNG, PHƯƠNG THIÊN THƯƠNG 24*

CONTENTS

Page

● Scientific researches

- Study on development of an analytical procedure for quantification of Nebivolol in human plasma by LC-MS/MS method.
KHUAT VAN MANH, HOANG VAN DUC, TRINH NAM TRUNG, 1
*TA MANH HUNG, PHAN THI NGHIA**
- Development of an analytical procedure for identification and quantification of Erlotinib in Alvoceva film coated tablets by HPLC method.
NGUYEN VAN BINH, NGUYEN THI MINH TAM, 6
NGUYEN HUU THAO, TRAN THI HONG ANH
- Isolation and purification of salvianolic acid B from the root of *Salvia miltiorrhiza* Bunge
BACH THI THAM, VU TRONG KHOA, NGUYEN TUAN ANH, 11
*DOAN CAO SON, TRAN THI THU TRANG**
- Acute and sub-chronic toxicity assessment of “Vien nhuan trang Hadiphar”.
NONG THI VAN, NGUYEN THI LIEN 17*
- Study on development of an analytical procedure for identification and quantitation of 2',4'-dihydroxy-6'-methoxy-3',5'-dimethylchalcon in *Flos Cleistocalyx operculati* and *Folium Cleistocalyx operculati*
NGUYEN THI PHUONG THAO, NGUYEN THI HANG, PHUONG THIEN THUONG 24*