

VIỆN KIỂM NGHIỆM THUỐC TRUNG ƯƠNG

ISSN 1859 - 0055

TẠP CHÍ

**KIỂM  
NGHIỆM  
thuốc**

JOURNAL OF DRUG QUALITY CONTROL

**SỐ 3.2022**

**TẬP 20-SỐ 77**

NATIONAL INSTITUTE OF DRUG QUALITY CONTROL

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

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

# TẠP CHÍ KIỂM NGHIỆM THUỐC SỐ 3/2022

JOURNAL OF DRUG QUALITY CONTROL N<sup>o</sup> 3/2022

XUẤT BẢN TỪ NĂM 2003

**Tổng biên tập:** TS. LÊ QUANG THẢO

**Thư ký biên tập:** ThS. BÙI VĂN TRUNG

**Trị sự:** ThS. BÙI VĂN TRUNG

## Hội đồng Biên tập:

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

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

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

In xong và nộp lưu chiểu tháng 10 năm 2022.

## PHÂN BIỆT DƯỢC LIỆU HẬU PHÁC VÀ DƯỢC LIỆU HẬU PHÁC NHẦM LẤN, GIẢ MẠO

VÕ THỊ HƯƠNG

*Trung tâm Kiểm nghiệm Dược phẩm, Mỹ phẩm Bình định*

THÁI NGUYỄN HÙNG THU

*Trường Đại học Dược Hà Nội*

NGUYỄN THỊ LIÊN✉

*Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương*

**Từ khóa:** *Mô tả, soi bột, sắc ký lớp mỏng, Hậu phác và Hậu phác giả mạo*

### 1. Đặt vấn đề

Hàng năm nước ta có nhu cầu từ 40.000 – 60.000 tấn dược liệu / năm trong đó 80 % - 85 % được nhập khẩu, hàng nhập lậu và không rõ nguồn gốc chiếm tới 80 % con số đó [1]. Với lượng lớn Dược liệu nhập vào nước ta như vậy thì vấn đề quản lý chất lượng dược liệu để đảm bảo tính an toàn và hiệu quả cho người bệnh, luôn là câu hỏi đặt ra cho Ngành. Dược liệu lưu thông trên thị trường không rõ nguồn gốc, kém chất lượng, dược liệu dễ bị nhầm lẫn, dược liệu giả mạo còn tồn tại.

Dược liệu Hậu phác là vỏ thân, vỏ rễ, vỏ cành phơi hay sấy khô của cây Hậu phác (*Magnolia officinalis* Rehd. et Wils.) hoặc cây Ao diệp hậu phác (*Magnolia officinalis* Rehd. et Wils. var. *biloba* Rehd. et Wils.), họ Ngọc lan (Magnoliaceae). Theo Y học Cổ truyền, Hậu phác là loại dược liệu có tính ôn, vị cay và hơi đắng, không độc dùng để chữa bệnh đầy bụng, ăn uống không tiêu, đau bụng, nôn mửa, đại tiện bí, táo [2]. Hiện nay trên thị trường bên cạnh dược liệu Hậu phác thật đã xuất hiện dược liệu Hậu phác giả mạo có nguồn gốc từ những cây khác có hình thức tương tự.

Đứng trước thực trạng như vậy, chúng tôi xin nêu ra một số kết quả phân tích bằng phương pháp mô tả cảm quan, soi bột và sắc ký lớp mỏng nhằm phân biệt dược liệu Hậu phác và dược liệu Hậu phác giả mạo nhằm góp phần tăng cường thêm công cụ cho công tác kiểm tra và quản lý chất lượng dược liệu Hậu phác tại Việt Nam.

### 2. Thực nghiệm

#### 2.1. Hóa chất, thiết bị

- Kính hiển vi MBL 2000 – T – PL – 30W, hãng KRUSS của Đức;
- Máy ảnh kỹ thuật số 16.1, hãng SONY của Nhật;
- Các dung môi, hóa chất, thuốc thử đạt tinh khiết phân tích và theo qui định của Dược điển Việt Nam V;
- Các thiết bị, dụng cụ thủy tinh cần thiết.

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

##### 2.2.1. Đối tượng nghiên cứu

- Dược liệu chuẩn Hậu phác, số lô: HO120064.01 của Viện Kiểm Nghiệm Thuốc Trung ương (C)
- Dược liệu Hậu phác giả mạo mẫu lấy trên thị trường (T)

##### 2.2.2. Phương pháp nghiên cứu

- Sử dụng các kỹ thuật phân tích sau để phân biệt dược liệu Hậu phác và dược liệu Hậu phác giả mạo
- Quan sát hình thái dược liệu đã cắt lát
  - Phương pháp soi bột dược liệu dưới kính hiển vi
  - Phương pháp sắc ký lớp mỏng.

### 3. Kết quả và bàn luận

#### 3.1. Hình thái dược liệu

Về cảm quan sơ bộ có thể thấy hình thái của mẫu Hậu phác chuẩn và mẫu Hậu phác lấy trên thị trường, có nghi ngờ tương đối giống nhau, tuy nhiên khi để gần nhau thì có sự khác biệt về màu sắc (Hình 1).

### Dược liệu Hậu phác [3]



Màu dược liệu nâu nhạt xám

A: *Magnolia officinalis* Rehd. et Wils.

B: *Magnolia officinalis* Rehd. et Wils var. *biloba* Rehd. et Wils.



### Dược liệu Hậu phác giả mạo



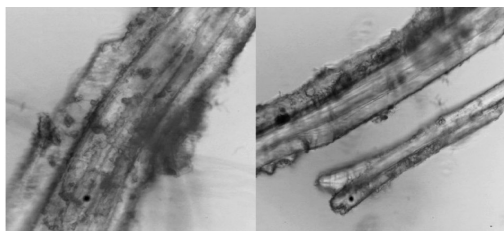
Màu dược liệu nâu đậm xám.

**Hình 1.** Hình ảnh dược liệu Hậu phác và dược liệu Hậu phác giả mạo

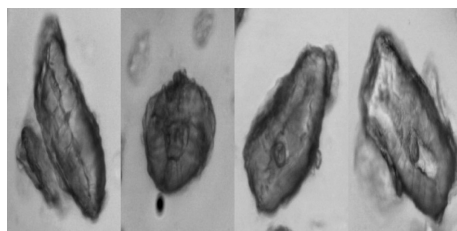
### 3.2. Phương pháp soi bột

Nghiền dược liệu thành bột mịn rây qua rây số 125  $\mu\text{m}$ , quan sát dưới kính hiển vi với độ phóng đại 40x (Hình 2).

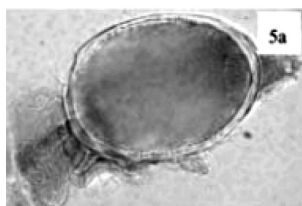
#### Dược liệu chuẩn Hậu phác



Có nhiều sợi, thành rất dày, đôi khi có hình lượn sóng hoặc hình răng cưa ở một cạnh, hóa gỗ, ống lỗ không rõ.

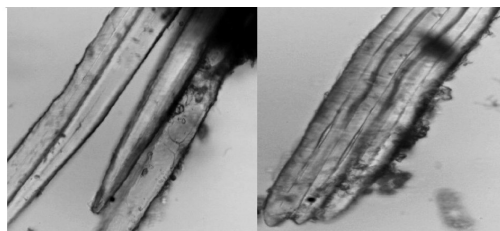


Tế bào mô cứng hình vuông, hình bầu dục, hình trứng hoặc dạng phân nhánh không đều, đôi khi có vân sọc rõ.

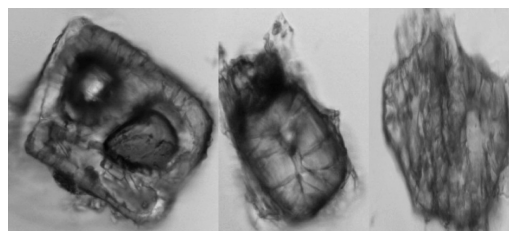


Tế bào dầu hình bầu dục hoặc hơi tròn, chứa chất dầu màu nâu vàng [3].

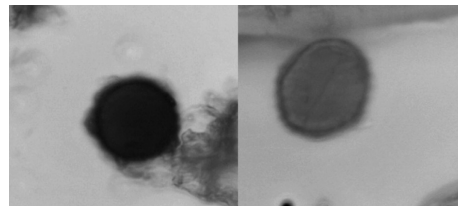
#### Dược liệu Hậu phác giả mạo



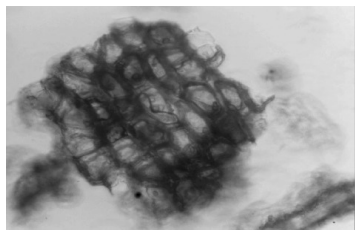
Có rất nhiều sợi, thành dày, nhẵn, khoang hẹp, mũi nhọn.



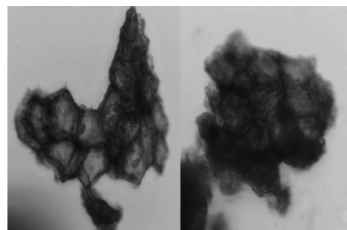
Tế bào mô cứng hình vuông, hình tam giác, hình bầu dục, có vân sọc rõ.



Tế bào dầu hình hơi tròn chứa chất dầu màu nâu hoặc đỏ cam.



Mảnh bản gồm những tế bào hình chữ nhật có thành dày.



Mảnh bản gồm những tế bào hình lục giác, có thành dày màu nâu đỏ.

**Hình 2.** Hình ảnh soi bột dược liệu chuẩn Hậu phác và dược liệu Hậu phác giả mạo

### 3.3. Sắc ký lớp mỏng

Tham khảo phương pháp định tính Hậu phác theo Dược điển Việt Nam V và Dược điển Trung Quốc 2015, so sánh dược liệu chuẩn Hậu phác của Viện Kiểm Nghiệm Thuốc Trung ương với dược liệu Hậu phác giả mạo thì sắc ký đồ của mẫu dược liệu Hậu phác giả mạo không cho vết cùng màu sắc và giá trị  $R_f$  với vết của dược liệu chuẩn Hậu phác (Hình 3).

Phương pháp sắc ký lớp mỏng định tính Hậu phác được tiến hành như sau:

- Bản mỏng Silicagel 60 F<sub>254</sub>
- Dung môi khai triển:

Hệ 1: Cyclohexan: ethyl acetate: aceton (9:1:0,5) [4]

Hệ 2: Toluene: methanol (17:1) [5]

- Dung dịch thử (T): Lấy 0,5 g bột dược liệu Hậu phác giả mạo, thêm 5 ml methanol (TT), lắc siêu âm trong 30 phút, lọc và sử dụng dịch lọc làm dung dịch chấm sắc ký.

- Dung dịch đối chiếu (C): Lấy 0,5 g bột dược liệu chuẩn Hậu phác, chiết như dung dịch thử.

- Cách tiến hành: Chấm riêng biệt lên bản mỏng 5 $\mu$ l mỗi dung dịch trên, dung môi đi được khoảng 8 – 10 cm, lấy bản mỏng ra, để khô bản mỏng trong không khí ở nhiệt độ phòng.

- Phun H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 10 % (TT) trong ethanol (TT), sấy bản mỏng ở 100 °C trong 10 phút, quan sát bản mỏng dưới ánh sáng thường.

- Phun dung dịch vanilin 1 % trong H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (TT), sấy ở 100 °C trong 10 phút, quan sát bản mỏng dưới ánh sáng thường.

Hệ dung môi/ Thuốc thử	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 10 % trong ethanol
Hệ 1 Cyclohexan: ethyl acetate: Aceton (9:1:0,5)[4]	
Hệ dung môi/thuốc thử	Vanilin 1 % trong H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
Hệ 2 Toluene: methanol (17:1)[5]	

**Hình 3.** Sắc ký đồ định tính của dược liệu chuẩn Hậu phác và dược liệu Hậu phác giả mạo

#### 4. Kết luận

Kết quả thực nghiệm cho thấy với quan sát cảm quan về hình thái lát cắt và soi bột dược liệu có thể sơ bộ nhận biết các đặc điểm khác nhau giữa dược liệu Hậu phác thật và dược liệu Hậu phác giả mạo. Đề khẳng định chắc chắn cần tiến hành định tính bằng phương pháp sắc ký lớp mỏng tham khảo Dược điển Việt Nam V và Dược điển Trung Quốc 2015 nhằm phân biệt rõ ràng dược liệu Hậu phác thật và giả.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

- 1.Cục Quản lý Y, Dược cổ truyền (2016), Báo cáo trong Hội nghị “Tăng cường kiểm soát nguồn gốc và chất lượng dược liệu”.
- 2.Đỗ Tất Lợi (2004), *Những cây thuốc và vị thuốc Việt Nam*, Nhà xuất bản Y học, 272 - 274
- 3.Hong Kong Chinese Materia Medica Standards (HKCMMS) Office, volume 2 : 21
- 4.Hội đồng Dược điển Việt Nam (2017), *Dược điển Việt Nam V*, Nhà xuất bản Y học; Tập 2, tr. 1183.
- 5.Chinese Pharmacopoeia Commission (2015), *Pharmacopoeia of People's Republic of China*, English version, Volume 1, pp. 208.

#### SUMMARY

*In this study, we use three methods including morphological description, powder microscopy and thin layer chromatography to distinguish between Cortex Magnoliae officinalis and counterfeit Cortex Magnoliae officinalis. Experimental results show that with morphological description and powder microscopy, it is possible to preliminarily distinguish the difference. To confirm, it is necessary to conduct qualitative analysis by thin layer chromatography refer to Vietnamese Pharmacopoeia V and Chinese Pharmacopoeia 2015 in order to clearly identify Cortex Magnoliae officinalis and counterfeit Cortex Magnoliae officinalis.*

(Ngày nhận bài: 08/03/2022 - Ngày phản biện: 25/4/2022 - Ngày duyệt đăng: 13/9/2022 )

## NGHIÊN CỨU XÂY DỰNG QUY TRÌNH XÁC ĐỊNH TIỂU PHÂN TRONG THUỐC TIÊM, THUỐC TIÊM TRUYỀN BẰNG KỸ THUẬT QUÉT BÁN TỰ ĐỘNG TRÊN HỆ THỐNG KÍNH HIỂN VI BX51M - OLYMPUS

TRẦN THỊ HỒNG ANH<sup>✉</sup>, LỤC THỊ VÂN, NGUYỄN THU PHƯƠNG,  
NGUYỄN VĂN LINH, NGUYỄN THỊ HỒNG HẠNH

*Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương*

*Từ khóa: Tiểu phân, kích thước tiểu phân, kính hiển vi, threshold*

#### 1. Đặt vấn đề

Giới hạn tiểu phân không nhìn thấy bằng mắt thường là một trong những chỉ tiêu chất lượng quan trọng của chế phẩm dùng đường tiêm/truyền. Các tiểu phân không tan trong thuốc tiêm/truyền có thể gây tắc ống thông tĩnh mạch trung tâm, tắc mạch, gây ra những tác dụng phụ nghiêm trọng, có thể dẫn đến tử vong. Để xác định giới hạn tiểu phân, các dược điển hiện hành sử dụng 2 phương pháp. Phương pháp 1 sử dụng thiết bị đếm tiểu phân hoạt động theo nguyên tắc cân ánh sáng, cho

phép tự động xác định kích thước tiểu phân và số lượng tiểu phân theo kích thước đã lựa chọn. Phương pháp này có ưu điểm tiến hành nhanh, đơn giản nhưng không áp dụng được với một số chế phẩm, không phân biệt được tiểu phân và bọt khí. Phương pháp 2 sử dụng kính hiển vi dùng khi kết quả đo bằng phương pháp 1 không đạt yêu cầu, hoặc đối với các dung dịch đục, có độ nhớt cao, dung dịch keo hay có chất hoạt động bề mặt hoặc có số tiểu phân vượt quá giới hạn đo của phương pháp 1. Ưu điểm của phương pháp dùng kính hiển vi là có thể quan

sát, đánh giá được hình dạng, màu sắc tiểu phân, đánh giá được nguyên nhân mẫu nhiễm tiểu phân và cho kết quả chính xác hơn. Như vậy, phương pháp 2 có thể coi là phương pháp “trọng tài” để kết luận chất lượng chỉ tiêu giới hạn tiểu phân không nhìn thấy trong thuốc tiêm, thuốc tiêm truyền.

Hệ thống kính hiển vi - BX51M do hãng OLYMPUS sản xuất là hệ thống đo kích thước tiểu phân bán tự động, lần đầu tiên được trang bị tại Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương, có khả năng đo được các hạt tiểu phân có kích thước từ 2  $\mu\text{m}$  đến 100  $\mu\text{m}$  [3]. Thiết bị này thích hợp dùng để **Xác định giới hạn tiểu phân không nhìn thấy bằng mắt thường** trong dung dịch thuốc tiêm/truyền theo phương pháp 2 – dùng kính hiển vi – theo Dược điển Việt nam V (PL 11.8A); Dược điển Mỹ (USP); Dược điển Anh (BP); [1], [2], [4].

Đây là thiết bị mới được đưa vào khai thác, việc sử dụng cần phải chú ý đến những yêu cầu nghiêm ngặt, thao tác vận hành nhiều và phức tạp, dễ làm sai lệch kết quả. Vì vậy, việc xây dựng các quy trình thao tác chuẩn để khai thác sử dụng thiết bị một cách hiệu quả là rất cần thiết.

Xuất phát từ nhu cầu thực tế, chúng tôi đã tiến hành khảo sát, nghiên cứu và xây dựng quy trình đo/đếm kích thước tiểu phân đang vận hành tại Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương trên đối tượng nghiên cứu là một số mẫu thuốc tiêm/truyền lưu hành trên thị trường để các đơn vị có thể tham khảo và tiến hành.

## 2. Hóa chất, thuốc thử, dụng cụ, trang thiết bị, đối tượng nghiên cứu

### 2.1. Hóa chất, thuốc thử, dụng cụ

- Nước RO, sản xuất tại Viện kiểm nghiệm thuốc TW.
- Nước cất không có tiểu phân (sản xuất tại công ty B.Braun)
- Bộ lọc chân không 01 phễu, 3 phễu nối tiếp.
- Màng lọc MCE (Mix cellulose esters) xám trơn, đường kính lỗ lọc 0,8  $\mu\text{m}$
- Màng Nylon 0,22  $\mu\text{m}$ ; lô d580232; NSX: Merck Millipore Ltd (màng lọc trắng để lọc nước RO, chuẩn bị nước không có tiểu phân).
- Dụng cụ thủy tinh: phễu lọc chân không, cốc có mỏ 100 ml, ống đong 50 ml, bình nón 100 ml, pipet pasteur...

### 2.2. Trang thiết bị [5]

- Hệ thống xác định kích thước tiểu phân bằng kính hiển vi bao gồm Kính hiển vi BX51M (hãng sản xuất: Olympus/ Nhật Bản), kết nối phần mềm phân tích tự

động Particle Inspector, độ phân giải 0,01  $\mu\text{m}$ , cỡ hạt phát hiện tối ưu: 2 – 100  $\mu\text{m}$  được đặt trong buồng thổi khí sạch ESCO; mã TB: VKN/HLII/22.03; hạn hiệu chuẩn: 12/2022.

### 2.3. Đối tượng nghiên cứu

Một số thuốc tiêm, thuốc tiêm truyền đang lưu hành trên thị trường.

## 3. Phương pháp nghiên cứu

*Phương pháp đo tiểu phân bằng kính hiển vi dựa trên nguyên tắc:* Các tiểu phân được thu thập, rửa, làm khô trên màng lọc trước khi xác định kích thước, số lượng dưới kính hiển vi.

Quy trình chuẩn bị mẫu phải được tiến hành trong buồng thổi khí sạch “Laminar flow cabinet ESCO” và bật quạt thổi gió để hạn chế tối đa ảnh hưởng của các hạt trong không khí.

Trong suốt quá trình vận hành sử dụng gắng tay và khăn không sinh bụi. Toàn bộ dụng cụ thủy tinh trước khi sử dụng đều phải được vệ sinh, tráng rửa bằng nước không có tiểu phân.

## 4. Kết quả và bàn luận

### 4.1. Khảo sát môi trường và các điều kiện tiến hành

#### 4.1.1. Khảo sát quy trình chuẩn bị nước không có tiểu phân

*Mục đích:* Chủ động chuẩn bị lượng nước không có tiểu phân đáp ứng nhu cầu sử dụng mỗi lần tiến hành phép thử.

Trước khi tiến hành khảo sát, tráng rửa các dụng cụ thủy tinh cần thiết bằng nước cất không có tiểu phân theo quy trình chuẩn bị dụng cụ trước khi xử lý mẫu. Lọc 50 ml nước cất không có tiểu phân qua màng lọc MCE, quét tiểu phân bán tự động bằng kính hiển vi BX51M, kết quả đạt yêu cầu như đối với mẫu trắng.

Dùng dụng cụ đã kiểm tra đạt yêu cầu để lấy nước RO. Chuẩn bị lần lượt các màng lọc MCE trơn như sau:

- Màng 1: Lọc 50 ml nước RO siêu sạch.
- Màng 2: Lọc 50 ml nước RO siêu sạch đã lọc 1 lần qua màng Nylon 0,22  $\mu\text{m}$ .
- Màng 3: Lọc 50 ml nước RO siêu sạch đã lọc 2 lần qua màng Nylon 0,22  $\mu\text{m}$ .
- Màng 4: Lọc 50 ml nước RO siêu sạch đã lọc 3 lần qua màng Nylon 0,22  $\mu\text{m}$ .

Để khô màng lọc trong hộp petri, hé nắp. Sau khi màng MCE khô tiến hành quét tiểu phân bằng kính hiển vi BX51M, kết quả thể hiện ở bảng 1.

**Bảng 1. Kết quả khảo sát quy trình chuẩn bị nước không có tiểu phân**

Loại TP	Số TP sau khi lọc				Yêu cầu (số TP/50 ml)
	Màng 1	Màng 2	Màng 3	Màng 4	
$\geq 10 \mu\text{m}$	151	36	26	16	$\leq 20$ TP
$\geq 25\mu\text{m}$	15	12	0	0	$\leq 5$ TP
Kết luận	Không đạt	Không đạt	Không đạt	Đạt	

*Nhận xét và kết luận:* Từ kết quả trên ta thấy phải lọc nước RO siêu sạch mới sản xuất ít nhất 03 lần để nước đạt yêu cầu của phép thử.

#### 4.1.2. Khảo sát số lần tráng rửa dụng cụ

Khảo sát trên một số dụng cụ thủy tinh hay sử dụng trong chuẩn bị mẫu cho phép thử: phễu thủy tinh (dc1), cốc có mỏ 100 ml (dc2), ống đong 25 ml (dc3), ống đong 50 ml (dc4), bình nón 100 ml (dc5), pipet pasteur (dc6).

- Tiến hành:

+ Dụng cụ thủy tinh sau khi sử dụng được rửa như mô tả trong Quy trình vệ sinh phòng thí nghiệm, thiết bị, dụng cụ (HLII/SOP/38). Tráng bên ngoài các dụng cụ từ trên xuống dưới bằng nước không có tiểu phân với

lượng bằng thể tích dụng cụ, loại bỏ dịch rửa.

+ Dùng 50 ml nước không có tiểu phân tráng bên trong lần lượt các dụng cụ dc1, dc2, dc3, dc4, dc5, dc6. Lọc dịch rửa thu được qua màng lọc MCE. Đặt màng lọc vào hộp đĩa petri, để kênh nắp trong bình hút ẩm. Tiếp tục thực hiện lần 2 và 3 như trên.

+ Sau khi màng khô tiến hành quét tiểu phân bằng kính hiển vi BX51M.

- *Yêu cầu:* Phép thử phải đạt yêu cầu như yêu cầu đối với mẫu trắng.

- *Kết quả* được trình bày trong bảng 2

**Bảng 2: Kết quả khảo sát số lần tráng rửa dụng cụ thủy tinh**

Loại tiểu phân	Số lần tráng			Yêu cầu (số tp trong 50 ml)
	Lần 1 (màng 1)	Lần 2 (màng 2)	Lần 3 (màng 3)	
Tiểu phân $\geq 10 \mu\text{m}$	110	54	05	$\leq 20$ tp
Tiểu phân $\geq 25 \mu\text{m}$	4	03	0	$\leq 5$ tp
Kết luận	Không đạt	Không đạt	Đạt	

- *Nhận xét và kết luận:* Từ kết quả trên ta thấy phải tráng rửa dụng cụ thủy tinh (sau khi đã làm sạch theo Quy trình vệ sinh phòng thí nghiệm, thiết bị, dụng cụ (HLII/SOP/38), ít nhất 03 lần để dụng cụ đủ sạch và đáp ứng yêu cầu của phép thử.

#### 4.2. Khảo sát phương pháp xử lý mẫu

Quy trình xử lý mẫu được xây dựng dựa vào phụ lục 11.8, Dược điển Việt Nam V. Chúng tôi tiến hành khảo sát hai yếu tố có ảnh hưởng đến phương pháp đo: lượng nước rửa màng chứa mẫu sau khi lọc và thời gian để khô màng sau khi lọc mẫu.

##### 4.2.1. Khảo sát thời gian để khô màng lọc sau khi lọc mẫu

- Tiến hành:

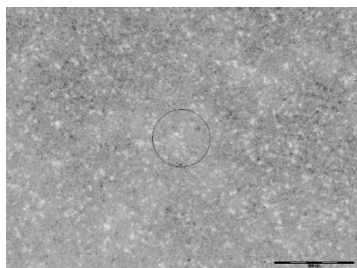
+ Chuẩn bị 03 mẫu thuốc bột pha tiêm, pha thành dung dịch theo hướng dẫn sử dụng đi kèm, lọc qua màng MCE tron. Tráng rửa bằng tia nước không có tiểu phân (25 ml x 2 lần).

+ Đặt màng lọc vào hộp đĩa petri kênh nắp trong bình hút ẩm. Tiến hành kiểm tra mức độ khô tại các thời điểm: 1 giờ, 2 giờ, 3 giờ, 4 giờ.

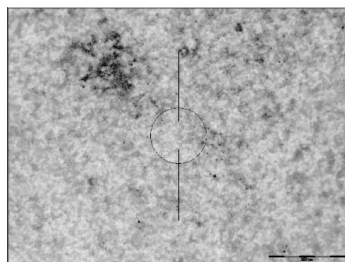
- *Yêu cầu:* Màng lọc không còn các mảng sẫm màu do ẩm.



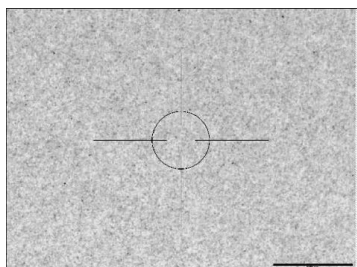
- *Kết quả:*



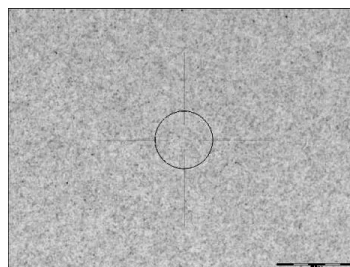
**Hình 1a:** Màng lọc để sau 1 giờ



**Hình 1b:** Màng lọc để sau 2 giờ



**Hình 1c:** Màng lọc để sau 3 giờ



**Hình 1d:** Màng lọc để sau 4 giờ

**Hình 1:** Màng lọc mẫu Solu Medrol 40 mg quan sát được qua camera tại các thời điểm nghiên cứu

- *Nhận xét và kết luận:* Ta thấy hình ảnh màng lọc Solu Medrol 40 mg trên kính hiển vi để sau 1 giờ có nhiều mảng đậm do ẩm nhất, màng lọc để sau 2 giờ vẫn có một số mảng đậm tuy nhiên ít hơn. Sau 3 giờ và 4 giờ, màng lọc không còn các mảng đậm do ẩm. Như vậy có thể thấy thời gian để màng lọc khô để có thể tiến hành thử nghiệm là ít nhất 3 giờ.

Tiến hành khảo sát tương tự với 2 mẫu còn lại cho cùng kết quả như trên.

#### 4.2.2. Khảo sát lượng nước rửa màng chứa mẫu sau khi lọc

- *Tiến hành*

+ Chuẩn bị 10 mẫu thuốc tiêm, bột pha tiêm (pha theo HDSD), thuốc tiêm truyền. Chuẩn bị 03 màng lọc cho mỗi mẫu. Dùng pipet pasteur và nước không có tiểu

phân để tráng rửa phễu lọc và màng lọc với các thể tích 10 ml (màng 1); 25 ml nước (màng 2); 25 ml nước x 2 lần (màng 3).

+ Đặt mỗi màng lọc vào một hộp lồng petri, để kênh nắp, để khô trong bình hút ẩm (3 giờ). Sau đó, quét tiêu phân bằng Kính hiển vi BX51M ở vật kính 10x.

- *Đánh giá kết quả:*

Đánh giá mức độ nhiễu của màng lọc gây ảnh hưởng đến việc quan sát bằng mắt thường của kiểm nghiệm viên và kết quả quét của camera theo 3 mức:

+ Mức 1 (>): nhiều nhiễu.

+ Mức 2 (+): có nhiễu.

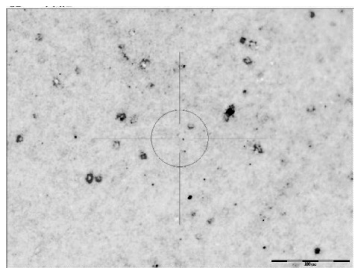
+ Mức 3 (-): màng lọc ít nhiễu.

- *Kết quả:* Kết quả quan sát bằng mắt thường của 03 màng lọc trên kính hiển vi ở vật kính 10X như bảng 3:

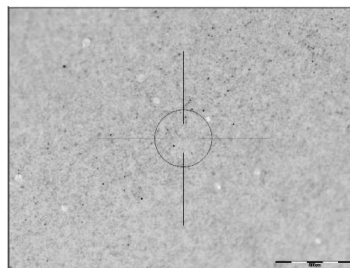
**Bảng 3.** Kết quả khảo sát lượng nước rửa màng chứa mẫu sau khi lọc

Đánh giá	Lượng nước sử dụng		
	10 ml	25 ml	25 ml x 2 lần
Số lượng mẫu đạt mức 1 (++)	07	02	0
Số lượng mẫu đạt mức 2 (+)	02	03	0
Số lượng mẫu đạt mức 3 (-)	01	05	10
Tổng mẫu	10	10	10

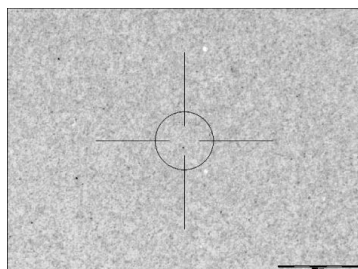
Một số hình ảnh màng lọc quan sát trên kính hiển vi ở vật kính 10x



**Hình 2a.** Màng lọc rửa với 10 ml nước



**Hình 2b.** Màng lọc rửa với 25 ml nước



**Hình 2c.** Màng lọc rửa với 25 ml nước x 2 lần

**Hình 2.** Hình ảnh màng lọc quan sát trên kính hiển vi sau khi rửa với các lượng nước khác nhau

- *Nhận xét và kết luận:* Kết quả trên cho thấy nếu tráng rửa màng lọc với lượng nước không đủ làm sạch, có thể hoạt chất hay tá dược tồn dư trên màng lọc sẽ ảnh hưởng đến kết quả đo. Hơn nữa, đối với một số chế phẩm dạng bột thuốc pha tiêm, nếu rửa màng lọc với một lượng ít nước thì giấy lọc dính chặt vào đĩa petri và khi để khô có xu hướng giòn, dễ vỡ, cong vênh. Nếu sử dụng quá nhiều nước để rửa, có thể làm thay đổi tính chất tiểu phân. Từ đó cho thấy lượng nước không có tiểu phân cần thiết dùng để tráng sạch phía bên trong phễu lọc và màng lọc là khoảng 50 ml.

### 4.3. Xây dựng quy trình đo mẫu bằng kỹ thuật quét bán tự động

#### 4.3.1. Khảo sát khoảng giới hạn threshold

Do hướng dẫn sử dụng phần mềm phân tích mẫu chưa có quy định cụ thể về việc thiết lập ngưỡng đo nên chúng tôi tiến hành khảo sát khoảng giới hạn ngưỡng (threshold). Threshold là khoảng giá trị mức xám được thiết lập để phân biệt tiểu phân quan tâm và nền. Trước khi tiến hành quét tiểu phân cần đặt ngưỡng phù hợp để camera có thể phát hiện được tối đa các hạt tiểu phân trên màng lọc. Ngưỡng được đặt theo nguyên tắc sau:

- Di chuyển màng lọc để tìm các hạt dễ quan sát trên vi trường, đặt ngưỡng để màu bao phủ phần lớn các hạt đó và ít nhiễu ở xung quanh. Kết quả:

+ Quét hạt có màu sẫm hơn màu nền, chọn ngưỡng ở khoảng thấp, từ 0 đến dưới 179 (màu xám của màng lọc ứng với mức 179).

+ Ngưỡng từ 0 đến 124: Phát hiện được các tiểu phân sẫm hơn nền, ít nhiễu (*Hình 4b*).

+ Ngưỡng từ 0 đến 145: Phát hiện được tiểu phân sẫm hơn nền nhưng có nhiều nhiễu ảnh hưởng (*Hình 4c*)

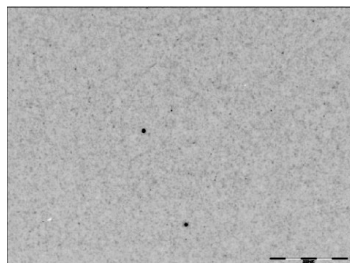
+ Ngưỡng từ 124 đến 179, không phát hiện được tiểu phân sẫm hơn nền, có quá nhiều nhiễu ảnh hưởng (*Hình 4d*).

+ Quét hạt có màu sáng hơn màu nền, đặt ngưỡng ở khoảng cao, từ trên 179 đến 255.

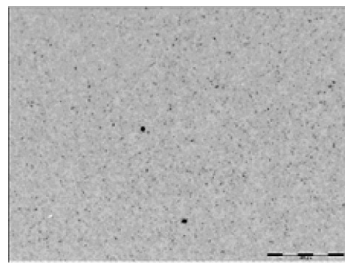
+ Ngưỡng từ 227 đến 255: Phát hiện được các tiểu phân sáng hơn nền, ít nhiễu (*Hình 4e*).

+ Ngưỡng từ 217 đến 255: Phát hiện được các tiểu phân sáng hơn nền, có nhiều nhiễu (*Hình 4f*).

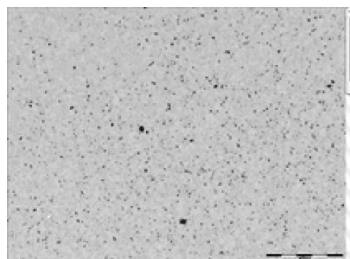
- *Nhận xét và kết luận:* Với ngưỡng từ 0 – 124 là tối ưu cho khảo sát hạt sẫm màu và ngưỡng từ 227 – 255 là tối ưu cho khảo sát hạt trắng ở các mẫu đã nghiên cứu. Khoảng ngưỡng 125 đến 226, cho độ tương phản thấp so với nền, sau khi quét sẽ cho kết quả màu nền là tiểu phân, gây sai số. Với mỗi mẫu chọn 2 mức threshold tương ứng với hạt sẫm và hạt trắng. Kết quả sẽ được tính là tổng số hạt đếm được từ cả hai mức threshold đã chọn (đã loại trừ các hạt bị trùng nhau nếu có).



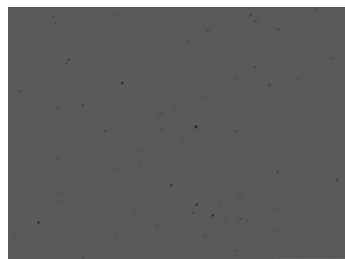
**Hình 4a.** Hình ảnh hạt quan sát trực tiếp trên KHV truyền qua camera



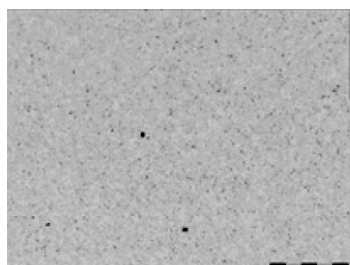
**Hình 4b.** Hình 4a sau khi đặt ngưỡng từ 0 đến 124.



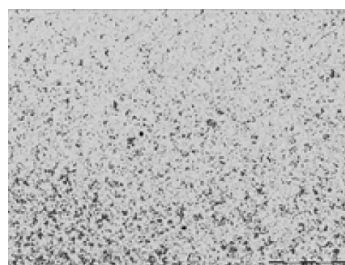
**Hình 4c.** Hình 4a sau khi đặt ngưỡng từ 0 đến 145



**Hình 4d.** Hình 4a sau khi đặt ngưỡng từ 124 đến 179



**Hình 4e.** Hình 4a sau khi đặt ngưỡng từ 227 đến 255



**Hình 4f.** Hình 4a sau khi đặt ngưỡng từ 217 đến 255.

**Hình 4.** Hình ảnh mẫu Bupivacain wpw spinal 0,5% heavy khi đặt các ngưỡng/threshold khác nhau

#### 4.3.2. Xây dựng quy trình quy trình đo mẫu

Quy trình quét tiêu phân bán tự động bằng kính hiển vi gồm các bước như sau:

**Bước 1:** Chuẩn bị mẫu đã xây dựng theo quy trình, đặt màng lọc sau khi đã khô lên bàn di mẫu của kính hiển vi, đưa vật kính về độ phóng đại 10x.

**Bước 2:** Xác định giới hạn di chuyển theo chiều ngang - dọc - trục thẳng đứng của bàn di mẫu.

**Bước 3:** Cài đặt vùng diện tích quét trên màng lọc. Đặt các thông số cần thiết.

**Bước 4:** Xác định ngưỡng: với mỗi mẫu, đặt hai khoảng như sau

- Đặt ngưỡng quét các hạt sẫm hơn nền trong khoảng từ 0 đến dưới 124.

- Đặt ngưỡng quét các hạt sáng hơn nền trong khoảng từ 227 đến 255.

**Bước 5:** Đặt tên mẫu, chọn tiêu chuẩn (VD: Blank hoặc USP 788), chọn vật kính 10x.

**Bước 6:** Quét xác định tiêu phân có mặt trên vùng diện tích đã xác định của màng lọc.

**Bước 7:** Xử lý dữ liệu thu được và báo cáo kết quả. Quan sát hình ảnh tiêu phân quan sát trực tiếp trên màng lọc, xử lý (cắt, ghép nếu cần).

## 5. Áp dụng quy trình đã xây dựng để xác định giới hạn tiêu phân không nhìn thấy bằng mắt thường trên một số mẫu thuốc tiêm, thuốc tiêm truyền

Quy trình xử lý mẫu đã xây dựng được áp dụng để xác định kích thước tiêu phân 12 mẫu thuốc đang lưu hành trên thị trường bằng hệ thống kính hiển vi bán tự động BX-51M. Song song tiến hành đo trên máy đếm tiêu phân PAMAS (Model: SVSS) để so sánh kết quả (Bảng 4).

**Bảng 4.** Kết quả xác định giới hạn tiêu phân không nhìn thấy bằng mắt thường trên 12 mẫu thuốc tiêm và thuốc tiêm truyền

STT	Dạng bào chế	Tên mẫu	Đo trên máy đếm tiêu phân PAMAS –SVSS (Phương pháp 1)		Đo trên kính hiển vi bán tự động BX-51M (Phương pháp 2)	
			TP ≥ 10µm	TP ≥ 25 µm	TP ≥ 10 µm	TP ≥ 25 µm
1	Thuốc tiêm	Cerebrolysin 10 ml; lô A7TH1A; NSX: 26/10/2016; HD: 30/9/2021	104	1	21	5
2		Bupivacain wpw spinal 0,5% heavy; lô 02DB052; NSX: 7/5/2020; HD: 7/5/2022	960	7	8	1
3		Diprosan 1 ml; lô T006334; NSX: 14/10/2019; HD: 14/10/2021	231	6	3	0
4		Diclofenac 75mg/ 3ml; lô 170721; NSX: 26/7/2021; HD: 26/7/2024	198	52	42	8
5		Davertyl; lô 020921; NSX: 27/9/2021; HD: 27/9/2024	206	2	57	7
6	Bột pha tiêm	SoluMedrol 40 mg; lô 011856, NSX: 31/12/2020; HD: 31/12/2022	360	86	3	1
7		Bivicode 2 g; lô 420001; NSX: 7/12/2020; HD: 6/12/2023	211	4	42	6
8		Cefin 1g; lô 21062; NSX: 6/2021; HD: 06/2023	172	11	35	3
9		Cefotaxime 2g; lô 012; NSX: 1/12/2020; HD: 1/12/2023	187	4	19	1
10		Traforan 1g; lô 011-250121; NSX: 25/01/2021; HD: 25/01/2024	381	16	30	3
11	Cemetajin; lô 21001; NSX: 27/04/2021; HD: 26/04/2023	594	59	43	3	
12	Dịch truyền	Moriheptamin 200 ml; lô 8M0238; NSX: 6/11/2018; HD: 6/11/2022	2	0	1	0

### Đánh giá kết quả:

Dạng chế phẩm	Yêu cầu của các Dược điển tham chiếu hiện hành	
	Phương pháp 1	Phương pháp 2
Thuốc tiêm, bột pha tiêm thể tích nhỏ ( $\leq 100$ ml)	$\leq 6000$ tp $\geq 10$ $\mu\text{m}$ /đơn vị đóng gói	$\leq 3000$ tp $\geq 10$ $\mu\text{m}$ / đơn vị đóng gói
	$\leq 600$ tp $\geq 25$ $\mu\text{m}$ đơn vị đóng gói	$\leq 300$ tp $\geq 25$ $\mu\text{m}$ / đơn vị đóng gói
Thuốc tiêm, bột pha tiêm thể tích lớn ( $>100$ ml)	$\leq 25$ tp $\geq 10$ $\mu\text{m}$ ml	$\leq 12$ tp $\geq 10$ $\mu\text{m}$ /ml
	$\leq 3$ tp $\geq 10$ $\mu\text{m}$ /ml	$\leq 2$ tp $\geq 10$ $\mu\text{m}$ /ml

\* **Nhận xét:** Kết quả thu được cho thấy tất cả 12 mẫu nghiên cứu đều đạt yêu cầu về giới hạn tiểu phân không nhìn thấy bằng mắt thường. Tuy nhiên trên cùng một mẫu, số lượng tiểu phân thu được khi dùng phương pháp 1 lớn hơn khi đo bằng phương pháp 2. Sự chênh lệch này phù hợp giữa lý thuyết và thực tế, vì đây là hai phương pháp đo dựa trên hai nguyên lý đo khác nhau: Phương pháp 1 dễ nhận biết các bọt khí (nếu còn) trong dung dịch thành tiểu phân, phương pháp 2 khi lọc mẫu sẽ loại được hết bọt khí nên lượng tiểu phân thực tế cũng giảm hơn so với phương pháp 1. Do vậy, phương pháp 2 cho kết quả thu được có độ chính xác cao hơn.

### 6. Kết luận

Như vậy, chúng tôi đã xây dựng được quy trình xử lý mẫu và xác định tiểu phân không nhìn thấy bằng mắt thường trên hệ thống kính hiển vi BX51M (hãng sản xuất Olympus) - kỹ thuật quét bán tự động với các điều kiện cụ thể như sau:

- Nước RO lọc qua màng lọc nylon 0,22  $\mu\text{m}$  ít nhất

03 lần đến khi đạt yêu cầu là nước không có tiểu phân.

- Dụng cụ thủy tinh sạch trước khi sử dụng phải tráng ít nhất 03 lần bằng nước không có tiểu phân.

- Sau khi lọc mẫu, dùng pipet pasteur rửa thành phễu và màng lọc bằng 50 ml nước không có tiểu phân. Để khô màng lọc trong hộp đĩa petri, hé nắp, đặt trong bình hút ẩm ít nhất 03 giờ.

- Thiết lập ngưỡng với mỗi mẫu, đặt hai khoảng: quét các hạt sẫm hơn nền trong khoảng từ 0 đến dưới 124; quét các hạt sáng hơn nền trong khoảng từ 227 đến 255.

Quy trình đã được áp dụng để xác định tiểu phân cho 12 chế phẩm thuốc tiêm, thuốc tiêm truyền đang lưu hành trên thị trường. Kết quả cho thấy quy trình đã xây dựng là hợp lý, quá trình thực hiện phép thử thuận lợi, tiến hành nhanh, tiết kiệm thời gian, công sức và năng lượng. Quy trình đã xây dựng có thể áp dụng cho các chế phẩm khác khi dùng phương pháp 1 cho kết quả nghi ngờ để đưa ra kết luận cuối cùng.

### Tài liệu tham khảo

1. Bộ Y tế (2019), *Dược điển Việt Nam*, lần xuất bản thứ năm, tái bản lần thứ hai, Nhà xuất bản Y học, Phụ lục 11.8: Xác định giới hạn tiểu phân.
2. The British medicines commission (2020), *British Pharmacopoeia*, Appendix XIII.a, particulate contamination subvisible particle.
3. The United States Pharmacopeial Convention (2020), *United States Pharmacopeia* 43 <788>, Particulate matter in injections.
4. The United States Pharmacopeial Convention (2020), *United States Pharmacopeia* 43.
5. Olympus Corporation, Instructions BX51M system metallurgical microscope.

### SUMMARY

*The system of the BX51M microscope is the first to be installed at the NIDQC for determining particle size in injections and infusions. This test should be carried out under precise conditions, according to the recommendation, to avoid the influence of free particles in the environment and in the glassware. The guidelines, on the other hand, do not go into detail about how to prepare particle-free water, how to clean the glassware, how do you rinse the membrane after filtration, or how long can you allow the filtered membrane to dry? These questions have been answered, and a detailed procedure for sample preparation and particle size determination has been established. Then, using the same procedure, we tested 12 samples collected from the market. The results demonstrated that all of the samples met the current pharmacopoeia's requirements, and the approach used was appropriate. Furthermore, it can also be used to confirm a result in the case of an out-of-specification sample.*

(Ngày nhận bài: 13/04/2022 - Ngày phản biện: 28/04/2022 - Ngày duyệt đăng: 13/09/2022)

# ĐỊNH DANH, SƠ BỘ XÁC ĐỊNH THÀNH PHẦN VÀ TÁC DỤNG CỦA LOÀI TRÀ HOA VÀNG (*CAMELLIA FLAVA*) TRỒNG TẠI TÂY NGUYÊN

TRƯƠNG MINH NHỰT, NGUYỄN HOÀNG THẢO MY, NGUYỄN HỮU LẠC THỦY<sup>✉</sup>

*Khoa Dược, Đại học Y Dược Thành phố Hồ Chí Minh*

**Từ khóa:** trà hoa vàng, polyphenol, flavonoid, tác dụng sinh học, Tây Nguyên

## 1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Trà hoa vàng (THV) là một loại dược liệu quý, phân bố trong tự nhiên ở một số nước châu Á, đặc biệt là Việt Nam với hơn 40 loài đã được tìm thấy và công bố [1]. Thành phần trong một số loài THV như polyphenol, flavonoid, tannin, ... có nhiều tác dụng sinh học như chống oxy hóa, hạ lipid máu, kháng khuẩn, kháng viêm, kháng ung thư ... [2]. Tây Nguyên là một vùng đất có điều kiện khí hậu, thổ nhưỡng thích hợp cho sự phát triển của THV, do đó, đã có nhiều loài THV được phát triển tại đây. Tuy nhiên, các loài THV chỉ được gọi tên và phân biệt theo tên địa phương. Để có cơ sở khoa học cho các nghiên cứu sâu hơn về hoá học và phát triển các sản phẩm từ nguồn dược liệu này, việc định danh và xác định hoạt tính sinh học của một trong số các loài THV được trồng tại Tây Nguyên được thực hiện.

## 2. THỰC NGHIỆM

### 2.1. Đối tượng nghiên cứu

Mẫu lá, hoa của loài THV tại xã Nghĩa Hưng, huyện Chư Păh, tỉnh Gia Lai vào tháng 01 và 06 năm 2022. Nguyên liệu sau khi thu hái được phơi khô và bảo quản trong túi nhựa chống ẩm. Mẫu tiêu bản có mã số L5.100222 được lưu mẫu tại bộ môn Phân tích – Kiểm nghiệm, khoa Dược, Đại học Y Dược Tp.HCM.

Mẫu cao lá và hoa: Lá bánh tẻ và hoa được sấy đến khô ở nhiệt độ 50 °C và xay thành bột thô. Chiết cao thử nghiệm bằng phương pháp ngâm với dung môi ethanol 70 %. Dịch chiết được thu hồi dung môi đến cao lá (TL, độ ẩm 18,6 %) và cao hoa (TH, độ ẩm 26,9 %). Các mẫu cao đã được kiểm soát chất lượng theo tiêu chuẩn cơ sở (cảm quan, tỷ trọng, mất khối lượng do làm khô, cặn không tan trong nước, tro toàn phần).

### 2.2. Dung môi, hóa chất, trang thiết bị nghiên cứu

Các dung môi, hóa chất và thuốc thử đạt tinh khiết phân tích mua từ hãng Merck (Đức), bao gồm: methanol, dung dịch son phen – lục iod, natri carbonat, nhôm clorid, natri acetat, dung dịch acid hydrocloric, hồ

tinh bột, thuốc thử iodin 0,1 N, dinatri hydrophosphat dodecahydrat, natri dihydrophosphat dihydrat, kali ferricyanid, sắt (III) chlorid, acid trichloroacetic (TCA), DPPH, ABTS, thuốc thử Folin-Ciocalteu, acarbose (Merck), enzym  $\alpha$ -amylase (Sigma Aldrich).

Các chất chuẩn sử dụng trong nghiên cứu gồm: aspirin (hàm lượng 99,5 %; số lô QT078110619), acid ascorbic (hàm lượng 99,5 %; số lô QT0160722), quercetin (hàm lượng 95,8 %; số lô QT104140520) (Viện Kiểm nghiệm thuốc Tp.HCM), acid gallic (hàm lượng 97,0 %) (Sigma Aldrich).

Chủng vi khuẩn: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923; *Klebsiella pneumoniae subsp. pneumoniae* ATCC 13883; *Moraxella catarrhalis* ATCC 25238; *Haemophilus influenzae* ATCC 49247.

Máy móc và thiết bị: kính hiển vi Carl Zeiss; tủ an toàn sinh học Telstar Bio II Advance Plus; nồi hấp diệt trùng Hirayama HV50; cân kỹ thuật Kenrn; cân phân tích Sartorius; máy đo quang Gene Quant 1300; máy quang phổ UV – Vis Shimadzu 1900i.

### 2.3. Phương pháp nghiên cứu

#### 2.3.1. Khảo sát đặc điểm thực vật

Mô tả đặc điểm hình thái, bao gồm đặc điểm cơ quan sinh dưỡng và cơ quan sinh sản theo phương pháp mô tả phân tích. Tên khoa học được được giám định bằng phương pháp so sánh hình thái với các chuyên khảo về chi *Camellia*.

Nghiên cứu cấu tạo giải phẫu thân, lá: cắt tiêu bản, nhuộm kép, quan sát trên kính hiển vi và chụp ảnh vi phẫu nghiên cứu; các đặc điểm vi phẫu của bột lá, hoa được quan sát và chụp ảnh.

#### 2.3.2. Giải trình tự gen

DNA từ mô lá được chiết tách sử dụng DNA Dneasy Plant Mini Kit theo hướng dẫn của Qiagen. DNA đã tách chiết, kiểm tra sự tinh khiết và khuếch đại bằng PCR. Sản phẩm PCR được kiểm tra tinh khiết bằng điện di, sau đó được giải trình tự và so sánh với dữ liệu trên NCBI.

### 2.3.3. Xác định hàm lượng polyphenol toàn phần

Quy trình xác định hàm lượng polyphenol toàn phần được thực hiện theo ISO 14502-1:2005 [3]. Pha loãng cao TL bằng methanol đến nồng độ xác định và cho phản ứng với thuốc thử Folin-Ciocalteu trong môi trường kiềm tạo thành sản phẩm có màu xanh lam và đo độ hấp thụ ở bước sóng 765 nm. Kết quả được biểu diễn bằng đơn vị mg GAE/g (số miligam acid gallic trên 1 g cao).

### 2.3.4. Xác định hàm lượng flavonoid toàn phần

Quy trình xác định hàm lượng flavonoid toàn phần được thực hiện theo nghiên cứu của Chatatikun và cộng sự (2013) [4]. Pha loãng cao TL bằng methanol đến nồng độ xác định và cho phản ứng với thuốc thử  $AlCl_3$  trong môi trường kiềm tạo thành sản phẩm có màu vàng và đo độ hấp thụ ở bước sóng 415 nm. Kết quả được biểu diễn bằng đơn vị mg QE/g (số miligam quercetin trên 1 g cao).

### 2.3.5. Đánh giá tác dụng chống oxy hóa

#### 2.3.5.1. Khả năng bắt gốc tự do DPPH

Quy trình đánh giá khả năng bắt gốc tự do DPPH được tiến hành theo nghiên cứu của Kedare và cộng sự [5]. Kết quả được thể hiện qua giá trị  $IC_{50}$  ( $\mu g/ml$ ) và so sánh với với mẫu chứng dương acid ascorbic.

#### 2.3.5.2. Khả năng bắt gốc tự do ABTS

Quy trình đánh giá khả năng bắt gốc tự do ABTS được tiến hành theo nghiên cứu của Roberta và cộng sự (1999) [6]. Kết quả được thể hiện qua giá trị  $IC_{50}$  ( $\mu g/ml$ ) và so sánh với với mẫu chứng dương acid ascorbic.

#### 2.3.5.3. Đánh giá tổng năng lực khử

Quy trình đánh giá tổng năng lực khử được tiến hành theo nghiên cứu của Ferreira và cộng sự (2007) [7]. Kết quả được thể hiện qua giá trị  $EC_{50}$  ( $\mu g/ml$ ) và so sánh với với mẫu chứng dương acid ascorbic.

### 2.3.6. Đánh giá tác dụng ức chế hoạt tính enzym $\alpha$ -amylase

Quy trình đánh giá tác dụng ức chế hoạt tính  $\alpha$ -amylase được thực hiện theo mô hình của Akkarachiyasit và cộng sự có hiệu chỉnh [8]. Kết quả được thể hiện qua giá trị  $IC_{50}$  (mg/ml) và so sánh với mẫu chứng dương acarbose.

### 2.3.7. Đánh giá tác dụng kháng khuẩn

#### 2.3.7.1. Định tính khả năng kháng khuẩn

Khả năng ức chế vi khuẩn của mẫu thử được thực hiện bằng phương pháp khuếch tán trên đĩa thạch [9]. Xác định đường kính của vòng kháng khuẩn (mm) của mẫu cao TL và TH và so sánh với mẫu chứng dương cefotaxim trên các dòng vi khuẩn khảo sát.

#### 2.3.7.2. Xác định nồng độ ức chế tối thiểu (MIC)

Quy trình xác định MIC được thực hiện theo hướng dẫn của Viện Tiêu chuẩn Lâm sàng và Xét nghiệm (CLSI) [9]. Xác định MIC (mg/ml) của mẫu cao TL, TH và so sánh với mẫu chứng dương cefotaxim trên các dòng vi khuẩn khảo sát.

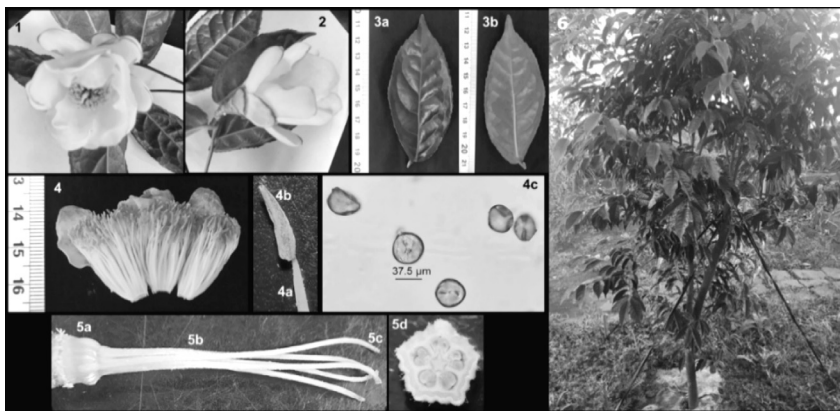
### 2.3.8. Đánh giá tác dụng kháng viêm

Thử nghiệm đánh giá tác dụng kháng viêm bằng mô hình ức chế proteinase được tiến hành theo phương pháp của Gunathilake và cộng sự (2018) [10]. Xác định  $IC_{50}$  (mg/ml) của mẫu cao TL, TH và so sánh với mẫu chứng dương aspirin.

## 3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

### 3.1. Kết quả đặc điểm thực vật

#### 3.1.1. Đặc điểm hình thái



**Hình 1.** Đặc điểm hình thái của loài nghiên cứu

(1: Hoa nở nhìn chính diện; 2: Hoa nở; 3a: Mặt trên của lá; 3b: Mặt dưới của lá; 4: Bộ nhị; 4a: Chi nhị; 4b: Bao phấn; 4c: Hạt phấn; 5a: Bầu noãn; 5b: Vòi nhụy; 5c: Đầu nhụy; 5d: Bầu noãn cắt ngang; 6: Toàn cây)

Cây gỗ nhỏ, màu xám, tiết diện thân gần tròn. Lá đơn, mọc cách, không có lá kèm. Phiến lá hình bầu dục đầu nhọn, dài 10 – 12 (cm), rộng 3 – 4 (cm), màu xanh lục mặt trên đậm hơn mặt dưới, nhẵn, bìa phiến có răng cưa cạn. Cuống lá màu xanh lục, hình trụ, mặt trên có rãnh cạn, dài 5 – 8 (mm). Gân lá hình lông chim nổi rõ ở mặt dưới, có 10 – 11 đôi gân phụ.

Hoa riêng lẻ mọc ở nách lá. Hoa gần đều, lưỡng tính. Cuống hoa hình trụ, màu xanh lục, nhẵn. Lá bắc giống lá bình thường. Lá bắc con 4 – 5, hình bầu dục, màu xanh lục, dài 1 – 3 (mm), rộng 3 – 5 (mm). Lá đài 5, gần đều, rời nhau, hình bầu dục, màu xanh lục, dài 4 – 6 (mm), rộng 5 – 9 (mm). Cánh hoa 10 – 13, gần đều, rời nhau, đỉnh thành 2 – 3 vòng, cánh hoa hình bầu dục, màu vàng, dài 2 – 3 cm, rộng 1,5 – 2,0 (cm).

Nhị rất nhiều, rời nhau, không đều, đỉnh trên để hoa thành nhiều vòng. Chỉ nhị dạng sợi màu vàng, dài 2,0 – 2,5 (cm), nhẵn. Bao phấn màu vàng, bầu dục thuôn dài, 2 ô, mở bằng đường nứt dọc, hướng trong, đỉnh đáy. Hạt rất nhiều, rời, hình cầu, đường kính 37,5 – 40,0 (µm) màu vàng, có 3 rãnh.

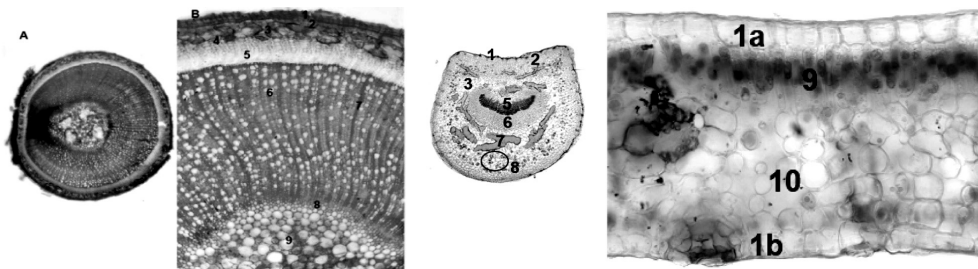
Lá noãn 5, dính nhau, tạo bầu trên, 5 ô, mỗi ô có 2 noãn, dính noãn trung trụ. Bầu noãn màu vàng, có 5 thùy, mặt ngoài có lông, cao 2 – 3 (mm). Vòi nhụy 5, hình sợi, dài 2,0 – 2,5 (cm), màu vàng. Đầu nhụy 5, hình điểm, màu vàng đậm.

### 3.1.2. Đặc điểm vi học

Vi phẫu thân gần tròn, bao gồm bần, nhu bì, mô cứng, libe 1, libe 2, mạch gỗ 1, mạch gỗ 2, mô mềm gỗ 1, mô mềm gỗ 2, tia tủy, mô mềm tủy và tinh bột.

Vi phẫu cuống lá có hai tai nhỏ và mặt dưới lõm tròn, bao gồm biểu bì, mô dày góc, mô mềm khuyết, hệ thống dẫn hình cung với gỗ ở trên và libe ở dưới, mạch gỗ, mô mềm gỗ, thể cứng và tinh thể calci oxalat.

Vi phẫu thịt lá có biểu bì trên, biểu bì dưới, lỗ khí tập trung nhiều ở biểu bì dưới, mô mềm giậu, mô mềm xốp và tinh thể calci oxalat hình cầu gai và hình khối rải rác trong mô mềm.

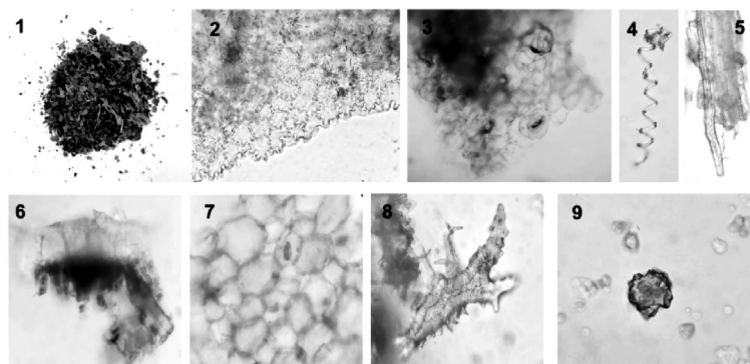


**Hình 2.** Đặc điểm vi phẫu loài nghiên cứu

(A: vi phẫu thân; B: một phần vi phẫu thân; 1: bần (a: trên; b: dưới); 2: lục bì; 3: mô cứng; 4: libe 1; 5: libe 2; 6: gỗ 2; 7: tia tủy; 8: gỗ 1; 9: mô mềm tủy 10: mô mềm xốp)

### 3.1.3. Đặc điểm bột dược liệu

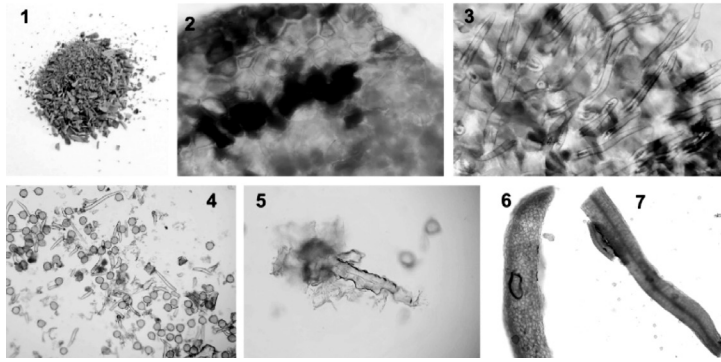
Bột lá màu xanh; bột hoa màu vàng, không mùi. Dưới kính hiển vi quang học quan sát thấy 8 cấu tử trong bột lá và 6 cấu tử trong bột hoa



**Hình 3.** Đặc điểm bột lá loài nghiên cứu

1. Bột lá, 2. Mảnh biểu bì trên, 3. Mảnh biểu bì dưới có lỗ khí, 4. Mạch xoắn, 5. Bó sợi, 6. Mảnh mô mềm giậu, 7. Mảnh mô mềm, 8. Thể cứng, 9. Calci oxalat





**Hình 4.** Đặc điểm bột hoa loài nghiên cứu

1. Bột hoa, 2. Mảnh biểu bì lá đài, 3. Mảnh biểu bì cánh hoa có lông che chở đơn bào, 4. Hạt phấn và lông che chở đơn bào thẳng, 5. Thể cứng, 6. Mảnh bao phấn, 7. Mảnh chỉ nhị

**Nhận xét:** Việc xác định tên khoa học của THV tại Gia Lai, Tây Nguyên dựa trên quá trình so sánh, đối chiếu với một số tài liệu và công trình nghiên cứu. Hiện nay, chưa có công trình nghiên cứu nào công bố về đặc điểm vi học và hình ảnh bột được liệu của các loài THV. Hơn nữa, các dữ liệu về đặc điểm hình thái của các loài THV không đầy đủ và chi tiết, cần so sánh với nhiều tài liệu tham khảo trước khi dự đoán tên khoa học của loài THV đang nghiên cứu.

Các đặc điểm hình thái của loài nghiên cứu có nhiều điểm tương đồng với hai loài là *Camellia cucphuongensis* Ninh & Rosmann và loài *Camellia flava* (Pitard) Sealy khi so sánh với các tài liệu tham khảo [1,11]. Thực tế cho thấy đặc điểm hình thái của 2 loài này rất giống nhau và chỉ có thể phân biệt qua đặc điểm số lượng noãn trong ô. *Camellia flava* chỉ có 1 noãn trong 1 ô, loài

*Camellia cucphuongensis* có đến 8 – 9 noãn trong 1 ô [1]. Năm 2019, nghiên cứu của Zhao và cộng sự đã kết luận loài *Camellia cucphuongensis* là một heterotype của loài *Camellia flava* [12]. Vì thế có thể dự đoán tên khoa học của loài nghiên cứu là *Camellia flava* (Pitard) Sealy.

### 3.2. Kết quả giải trình tự gen

Thử nghiệm giải trình tự gen được tiến hành nhằm khẳng định dự đoán tên khoa học từ đặc điểm hình thái. Mẫu lá được chiết tách DNA và khuếch đại một phần vùng gen *rbcL*. Sau khi giải trình tự gen, kết quả được BLAST đối chiếu với ngân hàng gen NCBI. Kết quả giải trình tự gen được trình bày ở hình 5. Kết quả giải trình tự gen cho thấy đoạn gen *rbcL* phân lập được từ mẫu nghiên cứu có chiều dài 730 bp.

```
TTAAGATTACAAATTGACTTATTATACTCCTGACTATGAAACCAAAGATACTGATATCT
TGGCAGCATTCCGAGTAACTCCGCAACCTGGAGTTCACCTGAAGAAGCAGGGGCCGC
GGTAGCTGCCGAATCTTCTACTGGTACATGGACAACCTGTGTGGACCGATGGACTTACTA
GCCTTGATCGTTACAAAGGGCGATGCTACCACATCGAGCCCGTTGCTGGAGAAGAAAG
TCAATTTATTGCTTATGTAGCGTATCCTTTAGACCTTTTTGAAGAAGGTTCTGTTACTAA
CATGTTTACTTCCATTGTGGGTAATGTATTTGGGTTCAAAGCCCTGCGCGCTCTACGTCT
GGAAGATCTGCGAATCCCTACTGCGTATGTTAAAACCTTCCAAGGACCGCCTCATGGC
ATCCAAGTTGAAAGAGATAAATTGAACAAGTATGGTCGTCCTGTTGGGATGTACTA
TTAAACCTAAATTGGGGTTATCTGCTAAAACTACGGAAGAGCAGTTTATGAATGTCTC
CGCGGTGGACTTGATTTTACA
```

**Hình 5.** Kết quả giải trình tự gen của loài nghiên cứu

Kết quả so sánh đoạn *rbcL* của mẫu thử loài nghiên cứu với mẫu đối chứng loài *Camellia flava* (Pitard) Sealy [mã số KX394697.1, 2017] được công bố trên Genbank cho thấy mức độ tương đồng là 100 %. Từ kết quả khảo sát thực vật học và giải trình tự DNA, loài THV nghiên cứu được xác định tên khoa học đầy đủ là *Camellia flava* (Pitard) Sealy, thuộc họ trà Theaceae.

### 3.3. Hàm lượng polyphenol toàn phần

Polyphenol toàn phần được xác định bằng phản ứng của mẫu thử với thuốc thử Folin-Ciocalteu. Acid gallic được sử dụng làm chất đối chiếu, trong khoảng nồng độ 10 đến 50  $\mu\text{g/ml}$ . Phép định lượng có phương trình hồi quy là:  $y = 0,0107x + 0,0301$ , và  $R^2 = 0,9994$ ; trong đó  $y$  là hàm lượng polyphenol toàn phần (mg GAE/g),  $x$  là nồng độ mẫu thử ( $\mu\text{g/ml}$ ). Mẫu cao thử được pha đến nồng độ thử là 200  $\mu\text{g/ml}$ . Polyphenol toàn phần có trong cao lá loài nghiên cứu được xác định là 104,36  $\pm$  0,03 mg GAE/g (giá trị trung bình  $\pm$  sd).

*Nhận xét:* Chưa có công trình nghiên cứu về hàm lượng polyphenol toàn phần của loài *Camellia flava*. So sánh kết quả nghiên cứu với công trình của Song và cộng sự (2011) trên 6 loài trà hoa vàng thu hái tại Trung Quốc vào tháng 1 năm 2008 với kết quả hàm lượng polyphenol toàn phần của cao lá cao nhất là 80,91 mg GAE/g ở loài *Camellia impressinervis* và thấp nhất là 11,43 mg GAE/g ở loài *Camellia tunghinensis* [2], hàm lượng polyphenol toàn phần trong loài *Camellia flava* cao hơn đáng kể (104,36 mg GAE/g).

### 3.4. Kết quả xác định hàm lượng flavonoid toàn phần

Hàm lượng flavonoid toàn phần được xác định bằng

phản ứng với thuốc thử  $\text{AlCl}_3$ . Quercetin được sử dụng làm chất đối chiếu, với nồng độ sử dụng trong khoảng từ 3,125 đến 100,000  $\mu\text{l}$ , phép định lượng có phương trình hồi quy là:  $y = 0,0048x - 0,0168$  và  $R^2 = 0,9948$ . Trong đó  $y$  là hàm lượng flavonoid toàn phần (mg QE/g),  $x$  là nồng độ mẫu thử ( $\mu\text{g/ml}$ ).

Mẫu cao thử có nồng độ là 10 mg/ml trong methanol. Flavonoid toàn phần có trong cao lá loài nghiên cứu được tính toán được là  $14,49 \pm 0,28$  mg QE/g (giá trị trung bình  $\pm$  sd).

*Nhận xét:* Chưa có công trình nghiên cứu về hàm lượng flavonoid toàn phần của loài *Camellia flava*. So sánh với công trình của Song và cộng sự (2011) với kết quả hàm lượng flavonoid toàn phần của cao lá cao nhất là 7,90 mg QE/g ở loài *Camellia impressinervis* [2], flavonoid ở loài *Camellia flava* cao hơn gần 2 lần (14,49 mg QE/g).

### 3.5. Tác dụng chống oxy hóa

Tác dụng chống oxy hóa của mẫu thử cao lá được xác định dựa vào giá trị  $\text{IC}_{50}$  hoặc  $\text{EC}_{50}$ . Mẫu thử được chuẩn bị bằng cách hòa tan cao TL trong methanol thành dãy dung dịch có nồng độ thích hợp. Bảng 1 trình bày giá trị  $\text{IC}_{50}$  và  $\text{EC}_{50}$  của mẫu cao lá và acid ascorbic trên 3 mô hình thử nghiệm.

**Bảng 1.** Kết quả đánh giá tác dụng chống oxy hóa của cao lá và của chứng dương acid ascorbic

	$\text{IC}_{50}$ DPPH ( $\mu\text{g/ml}$ )	$\text{IC}_{50}$ ABTS ( $\mu\text{g/ml}$ )	$\text{EC}_{50}$ ( $\mu\text{g/ml}$ )
Acid ascorbic	8,12	57,54	279,25
Cao lá	37,74	460,20	90,54

*Nhận xét:* So sánh với công trình nghiên cứu sàng lọc hoạt tính chống oxy hóa bằng mô hình bắt gốc tự do DPPH trên lá loài *Camellia nitidissima* của tác giả Ning và cộng sự năm 2010 [13], kết quả  $\text{IC}_{50}$  của cao lá loài *Camellia flava* thấp hơn rất nhiều lần so với kết quả của nghiên cứu đã công bố ( $\text{IC}_{50} = 410 \mu\text{g/ml}$ ).

Chưa có những công bố về tác dụng chống oxy hóa của các loài THV trên mô hình đánh bắt gốc tự do ABTS và đo tổng năng lực khử. Kết quả thử nghiệm cho thấy mẫu cao lá đánh bắt gốc tự do ABTS kém hơn chứng dương acid ascorbic, nhưng có khả năng khử các chất oxy hóa cao hơn chứng dương. Từ đó có thể kết luận loài *Camellia flava* có tác dụng chống oxy hóa.

### 3.6. Tác dụng ức chế hoạt tính enzym $\alpha$ -amylase

Tác dụng ức chế hoạt tính enzym  $\alpha$ -amylase của cao lá, cao hoa và acarbose được xác định dựa vào sự giảm độ hấp thụ quang của phức chất tinh bột – iod. Giá trị  $\text{IC}_{50}$  được xác định từ phương trình hồi quy tuyến tính cho thấy tác dụng ức chế hoạt tính enzym  $\alpha$ -amylase của mẫu chứng dương acarbose, cao lá và cao hoa với giá trị  $\text{IC}_{50}$  lần lượt là 0,06; 0,69 và 2,68 mg/ml.

*Nhận xét:* Kết quả đánh giá tác dụng ức chế enzym  $\alpha$ -amylase cho thấy mẫu TL có  $\text{IC}_{50}$  thấp hơn TH 4 lần.  $\text{IC}_{50}$  của cao lá và hoa đều cao hơn chứng dương acarbose.

### 3.7. Tác dụng kháng khuẩn

Kết quả định tính khả năng kháng khuẩn và xác định MIC của cao lá và cao hoa được trình bày ở bảng 2.

**Bảng 2.** Định tính khả năng kháng khuẩn (đường kính vòng kháng khuẩn, mm)

Chủng thử nghiệm	TL	TH	Cefotaxim
<i>Staphylococcus aureus</i> (+)	15	15	25
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (-)	-	-	28
<i>Moraxella catarrhalis</i> (-)	26	20	36
<i>Haemophilus influenzae</i> (-)	13,5	9,9	15

Kết quả định tính khả năng kháng khuẩn và xác định MIC của cao lá và cao hoa được trình bày ở bảng 3.

**Bảng 3.** MIC của các mẫu thử nghiệm

Chủng thử nghiệm	TL (mg/ml)	TH (mg/ml)	Cefotaxim (µg/ml)
<i>Staphylococcus aureus</i>	5	5	1
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	-	0,0625
<i>Moraxella catarrhalis</i>	0,312	1,250	< 0,0156
<i>Haemophilus influenzae</i>	5	> 5	8

**Nhận xét:** Kết quả định tính khả năng kháng khuẩn của cao lá và cao hoa *Camellia flava* cho thấy có tác dụng ức chế trên vi khuẩn gram dương (*Staphylococcus aureus*) và một số gram âm thử nghiệm (*Moraxella catarrhalis*, *Haemophilus influenzae*). Thử nghiệm cho kết quả vòng kháng khuẩn lớn nhất trên *Moraxella catarrhalis* và không có tác dụng trên *Klebsiella pneumoniae*.

Kết quả MIC cho thấy mẫu TL có nồng độ ức chế tối thiểu thấp hơn mẫu TH trên các chủng vi khuẩn, trong đó MIC trên *Moraxella catarrhalis* ghi nhận giá trị là 0,312 mg/ml với mẫu TL và 1,250 mg/ml với mẫu TH khi đối chứng cùng chứng dương cefotaxim với mức dưới 0,0156 µg/ml. MIC trên mẫu cao lá và cao hoa là tương đồng khi thử nghiệm trên *Staphylococcus aureus*.

### 3.8. Tác dụng kháng viêm

Hiệu quả kháng viêm của cao lá, cao hoa và aspirin được xác định dựa vào phần trăm ức chế hoạt tính enzym proteinase. Giá trị IC<sub>50</sub> được xác định từ phương trình hồi quy tuyến tính cho thấy tác dụng kháng viêm của mẫu TL và TH với giá trị IC<sub>50</sub> lần lượt là 3,35 và 3,72 mg/ml, trong khi đó IC<sub>50</sub> của mẫu chứng dương aspirin là 3,25 mg/ml.

**Nhận xét:** Kết quả đánh giá tác dụng kháng viêm cho thấy giá trị IC<sub>50</sub> của mẫu TL và mẫu TH tương đương với chứng dương aspirin. Kết hợp với khả năng kháng khuẩn, đặc biệt là chủng tụ cầu khuẩn cho thấy tiềm năng phát triển thành các sản phẩm bảo vệ đường hô hấp của lá và hoa loài *Camellia flava*.

## 4. KẾT LUẬN

Mẫu trà hoa vàng tại Tây Nguyên của nghiên cứu đã được xác định tên khoa học là *Camellia flava* theo các tài liệu đối chứng. Hàm lượng polyphenol và flavonoid toàn phần trong mẫu lá lần lượt là 104,36 ± 0,03 mg GAE/g dược liệu và 14,49 ± 0,28 mg QE/g dược liệu. Kết quả nghiên cứu ghi nhận mẫu thử cao lá có tác dụng chống oxy hóa và ức chế hoạt tính α-amylase. Ngoài ra, cao lá và cao hoa có tác dụng kháng khuẩn với nồng độ ức chế tối thiểu lần lượt đạt giá trị thấp nhất là 0,312 và 1,250 mg/ml trên chủng *Moraxella catarrhalis* và 5,0 mg/ml trên chủng *Staphylococcus aureus*. Hoạt tính kháng viêm ghi nhận trên cả mẫu cao lá và cao hoa (IC<sub>50</sub> lần lượt là 3,35 và 3,72 mg/ml) tương tự khi so với chứng dương aspirin, kết hợp với hoạt tính kháng một số dòng vi khuẩn cho thấy tiềm năng phát triển thành các sản phẩm bảo vệ đường hô hấp của loài dược liệu này.

## LỜI CẢM ƠN

Nhóm tác giả xin chân thành cảm ơn Công ty Cổ Phần Dược phẩm Tâm Phúc Minh và Công ty Trường Dương đã tài trợ nguyên liệu Trà Hoa Vàng và kinh phí cho nghiên cứu.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Lê Nguyệt Hải Ninh. (2018). *Nghiên cứu phân loại chi Trà (Camellia L.) thuộc họ Chè (Theaceae D. Don) ở Việt Nam*, Luận án TS Sinh học, Trường ĐH KHTN.
- Song L., Wang X., Zheng X. et al. (2010), "Polyphenolic antioxidant profiles of yellow camellia", *Food Chem*, 129(2), pp.351-357.
- ISO.14502-1: 2005, Determination of Substances Characteristic of Green and Black Tea—Part 1: Content of Total Polyphenols in Tea-Colorimetric Method Using Folin-Ciocalteu Reagent. *International Organization for Standardization: Geneva, Switzerland*.
- Chatatikun M., Chiabchalard A (2013), "Phytochemical screening and free radical scavenging activities of orange baby carrot and carrot (*Daucus carota* Linn.) root crude extracts", *J Chem Pharm*, 5(4), pp.97-102.
- Kedare S. B., Singh R. (2011), "Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay", *J Food Sci Tech*. 48(4), pp.412-422.
- Re R., Pellegrini N., Proteggente A. et al. (1999), "Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay", *Free Radic Biol Med*, 26(9-10), pp.1231-1237.
- Ferreira I. C., Baptista P., Vilas-Boas M. et al. (2007), "Free-radical scavenging capacity and reducing power of wild edible mushrooms from northeast Portugal:

- Individual cap and stipe activity”, *Food Chem*, 100(4), pp.1511-1516.
8. Akkarachiyasit S., Charoenlertkul P., Yibchok-Anun S. et al. (2010), “Inhibitory activities of cyanidin and its glycosides and synergistic effect with acarbose against intestinal  $\alpha$ -glucosidase and pancreatic  $\alpha$ -amylase”, *Int J Mol Sci*, 11(9), pp.3387-3396.
  9. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (2021), *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing*, 31th Edition, M100-ed31.
  10. Gunathilake K, Ranaweera K, Rupasinghe H. (2018), “*In vitro* anti-inflammatory properties of selected green leafy vegetables”, *Biomedicines*, 6(4), pp.107.
  11. Hakoda N, Ninh T. (2011), “Plate 426. *Camellia flava*”, *Curtis’s Bot Mag*, 18(4), pp.190-193.
  12. Zhao D. (2019), “New synonyms in *Camellia* (Theaceae): *C. cucphuongensis*, *C. cylindracea* and *C. vidalii*”, *Phytotaxa*, 419(1), pp.100-104.
  13. Ning EC W. L., Qin XM, Zeng YZ. (2010), “Study on the antioxidant activity of polyphenols from *Camellia nitidissima*”, *Food Sci Technol.* (35), pp.108-111.

### SUMMARY

*Camellia flava* in Tay Nguyen province was described in detail morphological and anatomical characteristics. Total phenolic and flavonoid contents in leaves were  $104.36 \pm 0.03$  mg GAE and  $14.49 \pm 0.28$  mg QE, respectively. The ethanol extracts of leaves performed the antioxidant and amylase inhibition activities. Moreover, the extracts of leaves and flowers from this species showed antimicrobial effects on *Staphylococcus aureus*, *Moraxella catarrhalis* and *Haemophilus influenzae* by agar diffusion method and minimum inhibitory concentration (MIC) had determined to compare with cefotaxime antibiotic, combined with the anti-inflammatory, illustrated by the similarity  $IC_{50}$  with aspirin, may develop respiratory protective products.

(Ngày nhận bài: 15/08/2022 - Ngày phản biện: 17/08/2022 - Ngày duyệt đăng: 15/09/2022)

## NGHIÊN CỨU XÁC ĐỊNH ĐỒNG THỜI KETAMIN VÀ NORKETAMIN TRONG MÁU BẰNG SẮC KÝ KHÍ KHỐI PHỔ

PHẠM THỊ QUỲNH

PHẠM THỊ NGỌC MAI

PHẠM THỊ THU HÀ,

PHẠM QUỐC CHINH✉

Trung tâm Chống độc,  
Bệnh viện Bạch Mai

Trường đại học Khoa học Tự nhiên,  
Đại học Quốc gia Hà Nội

Viện Pháp y Quốc gia

**Từ khóa:** Ketamin, Norketamin, máu, GC-MS

### 1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Ketamin (KET) là một chất giảm đau, gây nghiện và được tổng hợp lần đầu tiên vào năm 1962. Đây là một chất gây hoang tưởng rất mạnh, làm rối loạn thị giác khiến cho người dùng mất định hướng về không gian và thời gian. Trong vài năm gần đây, KET bị thu giữ ngày càng nhiều ở nước ta [2]. Ngày 16/11/2013, Chính phủ đã ban hành Nghị định số 133/2003/NĐ-CP bổ sung KET vào danh mục các chất được kiểm soát [1]. KET được chuyển hóa ở gan và tạo ra hợp chất chuyển hóa là norketamin (NorKET) [4]. Mặc dù thời gian bán hủy ngắn nhưng KET có thể được phát hiện trong máu

tới hai tuần. Vì vậy, để hỗ trợ cho quá trình điều trị lâm sàng cũng như giám định pháp y, việc xác định đồng thời KET và NorKET trong mẫu máu là vô cùng cần thiết. Hiện nay, trên thế giới đã có một số nghiên cứu thành công khi kết hợp giữa chiết pha rắn (SPE), chiết lỏng – lỏng (LLE) với các phương pháp sắc ký khí khối phổ (GC-MS) và sắc ký lỏng khối phổ (LC-MS) để xác định hai hợp chất trên [5-8]. Trong nghiên cứu này, một phương pháp phân tích đồng thời KET và NorKET trong mẫu máu bằng cách kết hợp giữa LLE và phân tích bằng GC-MS đã được thực hiện nhằm phục vụ y học lâm sàng và pháp y.

## 2. THỰC NGHIỆM

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

#### 2.1.1. Thiết bị, dụng cụ

Hệ thống sắc ký khí khối phổ Agilent Technologies 6980N, detector MS 5975C, máy lắc rung, hệ thống thổi khí nitơ, các micropipette dung tích 20 – 1000  $\mu$ L, các dụng cụ thủy tinh có độ chính xác phù hợp.

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

#### 2.1.2. Hóa chất, chất chuẩn

##### - Chất chuẩn

+ Ketamin 1,0 mg/mL MeOH, lot: FE05091304, USDEA Exempt/TK#61-498 (Cerilliant, Mỹ).

+ Norketamin 1,0 mg/mL MeOH, lot: FN04301404, USDEA Exempt/TK#61-757 (Cerilliant, Mỹ).

+ Ketamin-d4 100  $\mu$ g/mL MeOH, lot: FE04141401, USDEA Exempt/TK#61-500 (Cerilliant, Mỹ).

- Dung môi, hóa chất: Methanol HPLC, ethyl acetat HPLC, acetonitril HPLC, natrihydroxyt, nước cất... dùng cho phân tích.

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

#### 2.2.1. Mẫu nghiên cứu

- Mẫu máu trắng không nhiễm NorKET và KET của Khoa Độc chất – Viện Pháp y Quốc gia.

- Mẫu máu của người nghi ngờ sử dụng KET từ các bệnh viện, người dân gửi đến giám định tại Viện Pháp y Quốc gia và các bệnh nhân điều trị KET tại Trung tâm Chống độc, Bệnh viện Bạch Mai.

#### 2.2.2. Phương pháp nghiên cứu

##### 2.2.2.1. Điều kiện sắc ký

Cột sắc ký khí HP5-MS (30 m x 250  $\mu$ m x 0,25  $\mu$ m). Chương trình nhiệt độ cột: 100 °C giữ 1 phút, tăng 15 °C/phút đến 250 °C giữ 2 phút, tiếp tục tăng 30 °C/phút đến 290 °C và giữ trong 8 phút. Khí mang: Heli, tốc độ dòng 1,0 mL/phút. Thể tích tiêm mẫu: 1  $\mu$ L, chế độ

không chia dòng. Nhiệt độ buồng tiêm mẫu, nguồn ion và tứ cực lần lượt là 200, 230 và 150 °C. Nguồn ion hóa bằng va chạm điện tử (Electron impact, EI) với năng lượng 70 eV.

##### 2.2.2.2. Chuẩn bị mẫu

- Các dung dịch chuẩn gốc

+ Các dung dịch chuẩn gốc có nồng độ 10  $\mu$ g/mL và 1,0  $\mu$ g/mL trong methanol được pha từ dung dịch chuẩn NorKET và KET nồng độ 1 mg/mL ban đầu.

+ Dung dịch chuẩn nội gốc có nồng độ 1,0  $\mu$ g/mL trong methanol được pha từ dung dịch chuẩn KET-d4 nồng độ 100  $\mu$ g/mL ban đầu.

- *Mẫu chuẩn*: Thêm các dung dịch chuẩn gốc vào mẫu máu trắng để được các mẫu có nồng độ NorKET và KET trong khoảng 10 – 500 ng/mL và chuẩn nội KET-d4 100 ng/mL.

- *Mẫu thử*: Thêm 100 ng/mL dung dịch nội chuẩn KET-d4 vào các mẫu máu nghi chứa KET và NorKET.

- *Chuẩn bị mẫu chiết*: Hút chính xác 1,0 mL mẫu máu nghi chứa KET và NorKET vào ống nghiệm, thêm 50  $\mu$ L NaOH 1 M và 100  $\mu$ L dung dịch chuẩn nội nồng độ 1,0  $\mu$ g/mL. Thêm tiếp 3 mL ethyl acetat (x 2 lần) lắc xoay 5 phút. Quay ly tâm 5000 vòng/phút trong 5 phút, lấy lớp dung dịch phía trên. Dịch chiết được làm khô bằng dòng khí nitơ tới cạn. Hòa tan cân bằng 100  $\mu$ L ethyl acetat để tiến hành sắc ký.

## 3. KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN

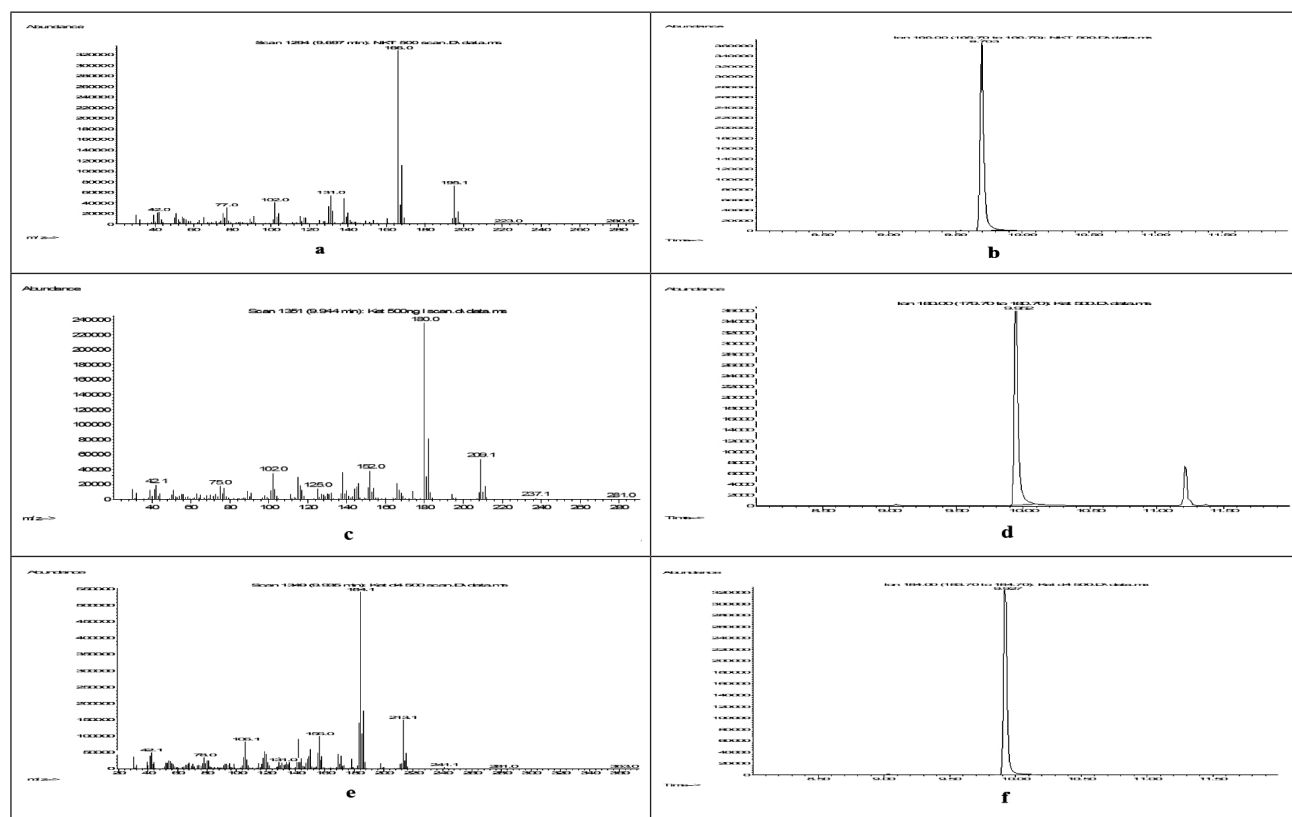
### 3.1. Khảo sát khối phổ của KET, NorKET và KET-d4

Phân tích chất chuẩn và nội chuẩn ở chế độ Scan, đã xác định được thời gian lưu, diện tích pic và các mảnh phổ cần phân tích. Từ kết quả phân tích Scan, chọn ra được một số mảnh phổ có tính chất đặc trưng, mảnh phổ có tín hiệu mạnh; các mảnh phổ này dùng để phân tích chế độ SIM nhằm tăng độ nhạy của phép phân tích. Thời gian lưu và các mảnh phổ dùng để phân tích ở chế độ SIM được thể hiện ở Bảng 1.

**Bảng 1.** Thời gian lưu và các ion thành phần của các chất phân tích được lựa chọn cho chế độ SIM

Chất phân tích	Thời gian lưu (phút)	Ion mẹ (m/z)	Ion định lượng(m/z)	Ion định tính (m/z)
KET	9,95	237	180	209 152
NorKET	9,71	233	166	195 131
KET-d4	9,93	241	184	213

Khối phổ của KET, NorKET và KET-d4 rõ ràng, riêng biệt. Dựa vào tính đặc trưng và mức tín hiệu, chọn các mảnh  $m/z = 166$  cho NorKET,  $m/z = 180$  cho KET và  $m/z = 184$  cho KET-d4 để tiến hành định lượng theo chế độ chọn lọc ion – (Selected ion monitoring – SIM) như Hình 1



**Hình 1.** Phổ khối và sắc ký đồ của NorKET, KET và KET-d4

a, c, e. Phổ khối của NorKET, KET và KET-d4

b. Sắc đồ NorKET ( $m/z = 166$ ), d. Sắc đồ KET ( $m/z = 180$ ), f. Sắc đồ KET-d4 ( $m/z = 184$ )

### 3.2. Đánh giá phương pháp

#### 3.2.1. Độ phù hợp của hệ thống GC-MS

Tiêm lặp lại 6 lần dung dịch mẫu chuẩn. Ghi lại thời gian lưu và diện tích pic. Kết quả thể hiện ở Bảng 2.

**Bảng 2.** Độ phù hợp của hệ thống GC-MS

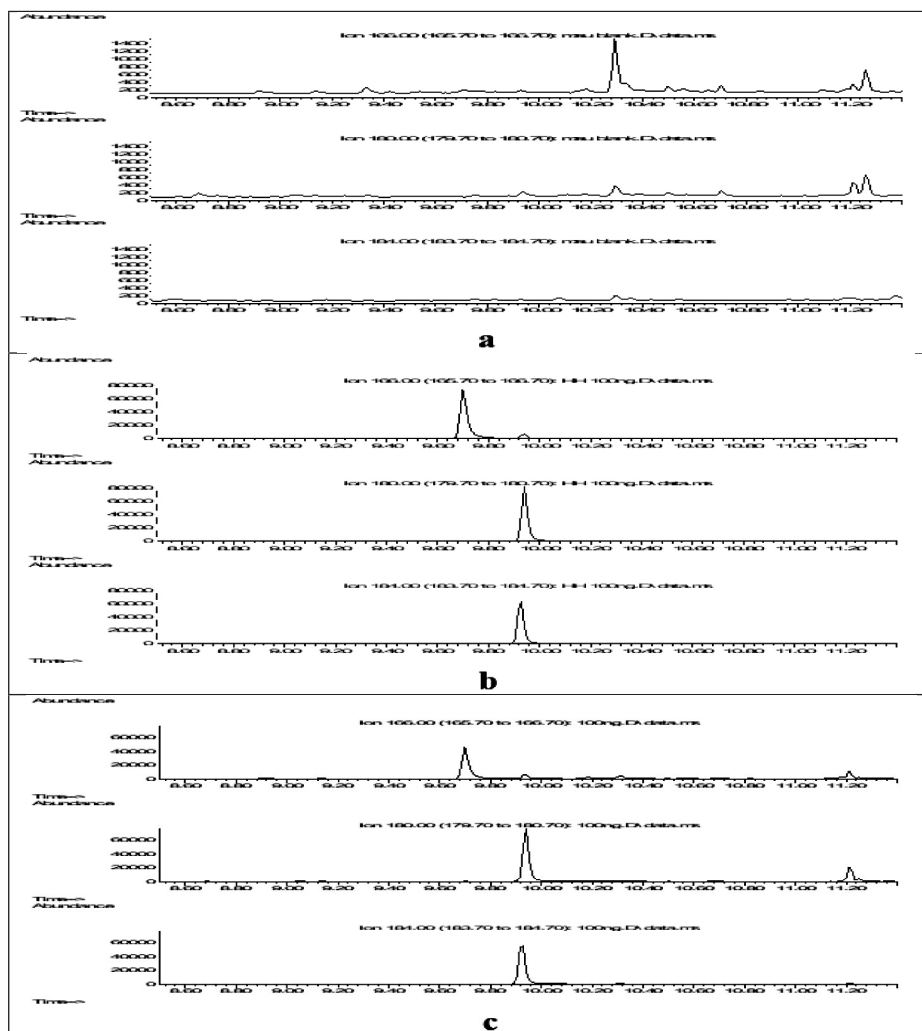
STT	NorKET		KET	
	Thời gian lưu (phút)	Diện tích pic (Abu.s)	Thời gian lưu (phút)	Diện tích pic (Abu.s)
1	9,707	1537823	9,947	1420415
2	9,692	1549536	9,945	1439094
3	9,709	1592651	9,939	1431024
4	9,711	1568874	9,948	1418921
5	9,708	1556923	9,953	1442025
6	9,697	1587159	9,956	1395982
<b>TB</b>	9,704	1565494	9,948	1424577
SD	0,008	21504	0,006	16874
RSD (%)	0,08	1,37	0,06	1,18

Kết quả ở Bảng 2 cho thấy NorKET và KET có thời gian lưu trung bình lần lượt là 9,704 và 9,948 phút. Độ lệch chuẩn tương đối (RSD) của diện tích pic là 1,37 % với NorKET và 1,18 % với KET, đáp ứng yêu cầu ứng dụng phương pháp khối phổ ( $\leq 5\%$ ). Bên cạnh đó, RSD của thời gian lưu với cả hai chất đều rất thấp ( $\leq 0,8\%$ )

cho thấy thiết bị có độ ổn định tốt.

### 3.2.2. Độ đặc hiệu

Chuẩn bị 6 mẫu máu trắng, 6 mẫu chuẩn và 6 mẫu máu trắng thêm hỗn hợp chuẩn và chuẩn nội ở nồng độ 100 ng/mL. Xử lý mẫu và tiến hành phân tích với điều kiện đã xây dựng. Sắc ký đồ của mẫu trắng, mẫu chuẩn và mẫu thêm chuẩn được thể hiện trong Hình 2.



Hình 2. Sắc ký đồ của mẫu trắng (a), mẫu chuẩn (b) và mẫu trắng thêm chuẩn (c)

Sắc đồ của mẫu trắng thêm chuẩn có các pic xuất hiện ở khoảng 9,7; 9,95 và 9,93 phút, phù hợp với giá trị thời gian lưu của chuẩn 3 chất đã khảo sát. Trong khi đó, trên sắc ký đồ của mẫu trắng không xuất hiện pic trong khoảng thời gian lưu tương ứng như trên. Do đó, phương pháp là đặc hiệu và chọn lọc đối với NorKET và KET.

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

Tỷ số tín hiệu trên nhiễu (S/N) được sử dụng để đánh giá LOD và LOQ. LOD được xác định tại hàm lượng có S/N khoảng bằng 3 và khi S/N khoảng bằng 10 ta thu được LOQ. Từ kết quả thực nghiệm, giá trị LOD và LOQ của NorKET và KET trong máu được trình bày ở Bảng 3.

**Bảng 3.** Giới hạn phát hiện và giới hạn định lượng của 2 chất phân tích

Chất phân tích	NorKET (ng/mL)	KET (ng/mL)
LOD	1,92	1,30
LOQ	6,41	4,34

Giới hạn phát hiện của NorKET và KET trong mẫu lần lượt là 1,92 ng/mL và 1,3 ng/mL. Giới hạn định

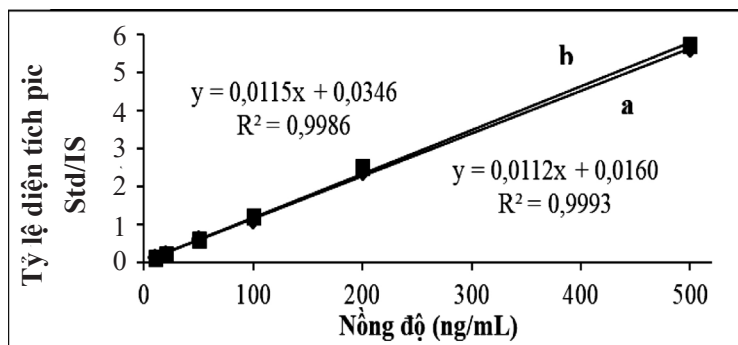
lượng thấp từ 4,34 đến 6,41 ng/mL cho thấy phương pháp có độ nhạy cao, đáp ứng được yêu cầu phân tích lượng vết.

### 3.3.4. Đường chuẩn và khoảng tuyến tính

Đường chuẩn được chuẩn bị trên nền mẫu để loại trừ ảnh hưởng của nền. Hỗn hợp chuẩn được thêm vào mẫu máu trắng tạo thành các nồng độ từ 10 – 500 ng/mL. Nồng độ chuẩn nội giữ cố định ở 100 ng/mL. Tiến hành chiết xuất, phân tích các chất theo quy trình đã xây dựng. Kết quả thể hiện ở Bảng 4 và Hình 3.

**Bảng 4.** Khoảng tuyến tính, đường chuẩn của NorKET và KET trong máu

Chất phân tích	Khoảng tuyến tính (ng/mL)	Đường chuẩn	Hệ số R <sup>2</sup>
NorKET	10 – 500	$y = 0,0112x - 0,0160$	R <sup>2</sup> = 0,9993
KET	10 – 500	$y = 0,0115x + 0,0346$	R <sup>2</sup> = 0,9986



**Hình 3.** Đường chuẩn của NorKET và KET trong máu  
a. Đường chuẩn của NorKET, b. Đường chuẩn của KET

Kết quả thu được cho thấy trong nền mẫu máu, có sự tương quan tuyến tính giữa tỉ lệ diện tích pic của chất chuẩn chia nội chuẩn với nồng độ NorKET và KET từ 10 – 500 ng/mL và hệ số tương quan R<sup>2</sup> > 0,99.

### 3.3.5. Độ đúng và độ lặp lại của phương pháp

Độ đúng và độ lặp lại của phương pháp được đánh giá bằng cách phân tích các mẫu máu trắng thêm chuẩn

ở ba mức nồng độ 10, 100 và 500 ng/mL, mỗi nồng độ thực hiện 5 lần. Xác định nồng độ NorKET và KET trong mẫu bằng phương pháp đường chuẩn. Độ đúng là tỷ lệ phần % giữa nồng độ xác định được từ đường chuẩn so với nồng độ lý thuyết. Độ lặp lại được đánh giá thông qua độ lệch chuẩn tương đối của các kết quả phân tích. Kết quả trình bày ở Bảng 5.

**Bảng 5.** Kết quả khảo sát độ đúng và độ lặp lại của phương pháp

Chất phân tích	Lượng thêm chuẩn (ng/mL)	Lượng tính được (ng/mL)	Độ đúng (%)	Độ lặp lại (RSD %)
NorKET	10	9,86	98,62	3,88
	100	100,02	100,02	2,80
	500	506,19	101,24	3,05
KET	10	9,92	99,22	4,35
	100	101,57	101,57	3,03
	500	98,78	98,78	2,95



Kết quả cho thấy phương pháp có độ đúng dao động trong khoảng từ 98,62 đến 101,57 % và độ lặp lại tốt với RSD từ 2,80 đến 4,35 %. Vậy phương pháp đã xây dựng đáp ứng được các yêu cầu về độ đúng và độ lặp lại của phương pháp phân tích KET và NorKET trong máu.

### 3.3.6. Độ ổn định

Độ ổn định của hoạt chất trong nền mẫu máu được đánh giá trên hai lô các mẫu máu trắng thêm chuẩn ở ba mức nồng độ 10, 100 và 500 ng/mL. Một lô phân tích ngay khi mẫu được chuẩn bị xong và một lô được bảo quản trong tủ lạnh 3 ngày ở nhiệt độ 2 – 4 °C. Kết quả khảo sát độ ổn định được trình bày trong Bảng 6.

**Bảng 6.** Độ ổn định của hoạt chất trong máu

Chất phân tích	Ban đầu		Sau 3 ngày		Sai khác (%)
	Lượng tính được (ng/mL)	RSD (%)	Lượng tính được (ng/mL)	RSD (%)	
NorKET	9,97	5,34	9,74	3,29	-2,31
	98,57	4,05	97,25	4,10	-1,34
	500,53	3,40	497,88	3,52	-0,53
KET	9,94	3,66	9,88	4,13	-0,60
	100,32	4,30	98,91	4,20	-1,41
	493,17	3,02	490,60	3,37	-0,52

Kết quả nghiên cứu cho thấy, nồng độ NorKET và KET trong các mẫu máu được phân tích ngay sau khi chuẩn bị so với trong các mẫu máu được bảo quản sau 3 ngày có sự khác biệt rất nhỏ ( $\leq -2,31$  %) và các giá trị RSD  $\leq 5,34$  %. Như vậy NorKET và KET trong máu ổn định trong ba ngày nếu được bảo quản lạnh ở nhiệt độ 2 - 4 °C.

### 3.3. Phân tích mẫu nghi ngờ chứa NorKET và KET

Áp dụng quy trình đã xây dựng để định lượng một số mẫu máu của bệnh nhân nghi ngờ sử dụng KET. Mỗi mẫu được tiến hành đo lặp lại ba lần và kết quả trung bình thể hiện ở Bảng 7.

**Bảng 7.** Kết quả phân tích mẫu thực

STT	Họ tên	Tuổi	Nồng độ (ng/mL)	
			NorKET	KET
1	Hoàng Thế T	60	118,18 ± 6,75	15,21 ± 0,91
2	Nguyễn Văn Th	32	175,68 ± 6,10	35,79 ± 0,76
3	Lê Hoàng M	29	23,32 ± 1,05	12,44 ± 0,26
4	Ngô Văn Ch	27	166,50 ± 5,25	21,88 ± 1,46
5	Nguyễn Văn Th	27	157,17 ± 3,58	21,30 ± 0,80
6	Nguyễn Đức L	68	478,07 ± 15,23	171,90 ± 5,31

Từ kết quả phân tích cho thấy, cả 6 mẫu đều dương tính với KET và NorKET. Nồng độ KET nằm trong khoảng 12,44 – 171,90 ng/mL và NorKET trong khoảng 23,32 – 478,07 ng/mL.

## 4. KẾT LUẬN

Nghiên cứu đã phát triển thành công một phương pháp để phát hiện, định lượng KET và chất chuyển hóa của nó NorKET trong máu bằng LLE và sắc ký khí khối phổ. LLE nhanh, đơn giản và rẻ tiền hơn so với SPE nên

được lựa chọn để xử lý mẫu. Chương trình nhiệt độ tối ưu cũng đã được xác định. Kết quả thẩm định cho thấy phương pháp có độ nhạy tốt, độ tin cậy cao và khả năng phát hiện được hai chất đến nồng độ ng/mL. Phương pháp đã được áp dụng để phân tích 6 mẫu máu của người nghi ngờ sử dụng KET. Kết quả cho thấy phương pháp phù hợp cho nghiên cứu xác định KET và NorKET trong máu, quy trình này có thể ứng dụng để hỗ trợ cho quá trình điều trị lâm sàng cũng như giám định pháp y.

### Tài liệu tham khảo

1. Nghị định số 133/2003/NĐ-CP (2003), “Nghị định bổ sung một số chất vào danh mục các chất ma túy và tiền chất ban hành kèm theo Nghị định số 67/2001/NĐ-CP ngày 01 tháng 10 năm 2001 của Chính phủ (06/11/2003)”.
2. Cơ quan Phòng chống Ma túy và Tội phạm của Liên hợp quốc (2012), “Các chất kích thích dạng amphetamin ở Việt Nam – Một đánh giá về mức độ có sẵn, sử dụng và tác động đối với sức khỏe và an toàn xã hội ở Việt Nam”.
3. Eylem Funda Göktaş and Filiz Arıöz (2018), “A review of chromatographic methods for ketamine and its metabolites norketamine and dehydronorketamine”, *Biomedical Chromatography*. 32(1), e4014.
4. Randall C. Baselt (2020), *Disposition of Toxic Drugs and Chemicals in Man*, ed. 12th, Biomedical Publications, Seal Beach, CA.
5. Ju-seon Lee Eun-mi Kim, Sang-kil Choi, Mi-ae Lim and Hee-sun Chung (2008), “Analysis of ketamine and norketamine in urine by automatic solid-phase extraction (SPE) and positive ion chemical ionization-gas chromatography-mass spectrometry (PCI-GC-MS)”, *Forensic Science International*. 174(2-3), pp. 197-202.
6. Huei Ru Lin and Ahai Chang Lua (2006), “Simultaneous Determination of Amphetamines and Ketamines in Urine by Gas Chromatography/Mass Spectrometry”, *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. 20(11), pp. 1724-1730.
7. Mo-Hsiung Yang Su-Lien Chou, Yongchien Ling, Yongchien Ling, Yun-Seng Giang and Yun-Seng Giang (2004), “Gas chromatography-isotope dilution mass spectrometry preceded by liquid-liquid extraction and chemical derivatization for the determination of ketamine and norketamine in urine”, *Journal of chromatography B*. 799(1), pp. 37-50.
8. Lena Danyeli Lisa Kurzweil, Zümrüt Duygu Şen, Anna Fejtova, Martin Walter and Sabrina Gensberger-Reigl (2020), “Targeted mass spectrometry of ketamine and its metabolites cis-6-hydroxynorketamine and norketamine in human blood serum”, *Journal of Chromatography B*. 1152, p. 122-214.

### SUMMARY

*Ketamine (KET) is widely abused for hallucination and is being seized more and more in Vietnam in recent years. An analytical method using gas chromatography – mass spectrometry with liquid – liquid extraction (LLE) was studied for determination of KET and its major metabolite, norketamine (NorKET), in whole blood. This was a very specific and sensitive method with the high accuracy, precision. The low limites of detection (LOD) were 1,30 and 1,92 ng/mL for KET and NorKET, respectively. This method was applied to analyze six ketamine suspected whole blood sampes as well.*

(Ngày nhận bài: 14/06/2022 - Ngày phản biện: 16/08/2022 - Ngày duyệt đăng: 23/08/2022 )

## ĐỊNH TÍNH VÀ ĐỊNH LƯỢNG CHẤT CHỐNG NẮNG OCTYL TRIAZON TRONG MỸ PHẨM DẠNG KEM BẰNG PHƯƠNG PHÁP HPLC

NGÔ THỊ DUYÊN, LÊ THỊ HƯỜNG HOA, TRẦN ĐỨC LAI,  
PHÙNG THỊ HỒNG, NGUYỄN VĂN HÀ✉

*Viện Kiểm nghiệm Thuốc Trung Ương*

**Từ khóa:** *Octyl triazon, Ethylhexel, chất chống nắng, kem chống nắng*

### 1. Đặt vấn đề

Octyl triazon là một chất chống nắng tan trong dầu và được sử dụng trong mỹ phẩm với hàm lượng tối đa là 5 % [1] [2]. Do không hòa tan trong nước và có ái lực cao với keratin của da, octyl triazon phù hợp với các sản

phẩm có khả năng chống thấm nước [3]. Đặc biệt, octyl triazon có khả năng hấp thụ cao bức xạ UV nên thường được sử dụng trong các sản phẩm có yêu cầu cao về chỉ số chống nắng (SPF) [3]. Hiện nay, trên thế giới một số kỹ thuật đã được phát triển để xác định hàm lượng

octyl triazon trong mỹ phẩm như kỹ thuật HPTLC [3] hay HPLC [4]. Tuy nhiên, ở Việt Nam chưa có phương pháp để xác định hàm lượng chất chống nắng này trong mỹ phẩm.

Xuất phát từ thực tế trên, chúng tôi đã tiến hành thực hiện nghiên cứu “**Xây dựng phương pháp định tính, định lượng chất chống nắng Octyl triazon trong mẫu mỹ phẩm dạng kem bằng phương pháp HPLC**” để góp phần phục vụ cho công tác kiểm tra chất lượng mỹ phẩm ở Việt Nam.

## 2. Thực nghiệm

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

#### 2.1.1. Thiết bị, dụng cụ

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

#### 2.1.2. Hóa chất, chất chuẩn

- Chất đối chiếu: Octyl triazon (Nguồn gốc: HPC Standards GmbH, Đức; Lô: 798177; Hàm lượng: 99,4 %, nguyên trạng).

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

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

#### 2.2.1. Đối tượng nghiên cứu

- *Mẫu placebo*: là mẫu kem chống nắng không chứa Octyl triazon, được cung cấp bởi Công ty Cổ phần Dược phẩm Gia Nguyễn.

- *Mẫu tự tạo*: là mẫu placebo có chứa Octyl triazon ở các nồng độ khác nhau.

- *Mẫu thử*: 2 mẫu mỹ phẩm trên thị trường (Bảng 1):

**Bảng 1.** Danh mục mẫu mỹ phẩm

STT	Mã hóa	Hạn dùng
1	Kem chống nắng M1	15/04/2024
2	Kem chống nắng M2	22/12/2023

### 2.2.2. Phương pháp nghiên cứu

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

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

## 3. Kết quả và bàn luận

### 3.1. Xây dựng quy trình phân tích

#### 3.1.1. Khảo sát các điều kiện sắc ký

- Khảo sát lựa chọn cột:

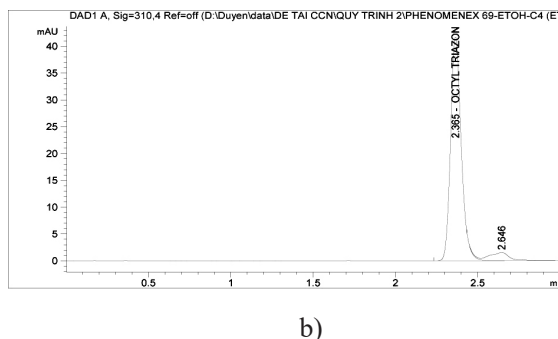
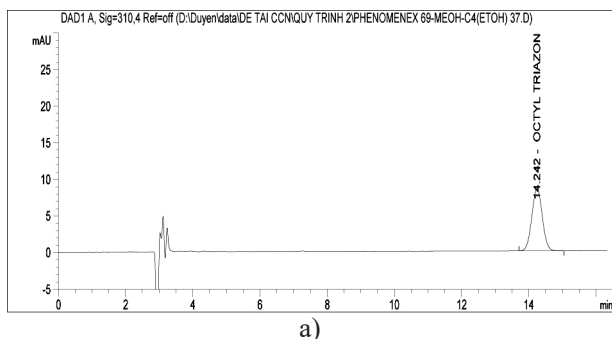
Khảo sát trên các cột Thermo betasil C18 (125 x 4 mm, 5 µm), Waters Symmetry (250 x 4,6 mm; 5 µm), Phenomenex C18 hoặc C8 (250 mm x 4,6 mm; 5 µm và 150 x 4,6 mm; 5 µm) nhận thấy: cột Phenomenex C18 (250 mm x 4,6 mm; 5 µm) cho pic cân đối và đáp ứng pic cao hơn so với các cột còn lại. Như vậy, cột Phenomenex Gemini C18 (250 mm x 4,6 mm; 5 µm) được lựa chọn để tiếp tục nghiên cứu.

- Khảo sát pha động:

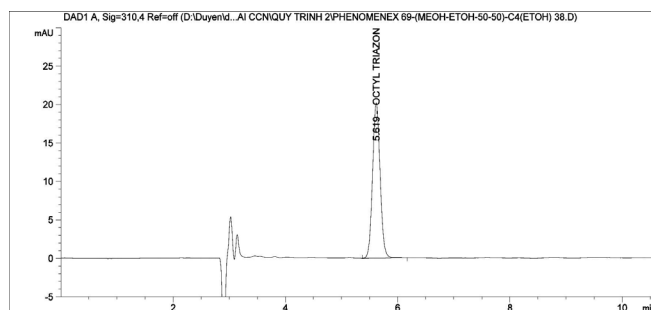
Dựa trên tính chất lý hóa của Octyl triazon (là chất chống nắng không phân cực [3]), tham khảo các tài liệu, tiến hành khảo sát trên hệ các hệ pha động là MeOH hoặc EtOH hoặc hỗn hợp MeOH : EtOH ở các tỷ lệ khác nhau. Kết quả cho thấy khi sử dụng pha động gồm MeOH và EtOH tỷ lệ (50:50) pic thu được có Hình dáng cân đối, đáp ứng pic cao và thời gian phân tích phù hợp hơn so với các hệ còn lại (Hình 1a và Hình 1b). Như vậy, pha động gồm MeOH và EtOH tỷ lệ (50:50) được lựa chọn để tiếp tục nghiên cứu.

- Khảo sát lựa chọn tốc độ dòng và bước sóng phân tích:

Tham khảo tài liệu, chúng tôi lựa chọn tốc độ dòng là 1 ml/phút và bước sóng phân tích là 310 nm [5] cho quy trình phân tích Octyl triazon.



**Hình 1.** Sắc ký đồ mẫu chuẩn khi sử dụng pha động là MeOH (a) và EtOH (b)



**Hình 2.** Sắc ký đồ mẫu chuẩn khi sử dụng pha động là MeOH : EtOH (1:1)

### 3.1.2. Khảo sát quy trình xử lý mẫu

Dựa trên các đặc điểm lý hóa của Octyl triazon (không tan trong nước, tan trong dầu [3]), đặc điểm của nền mẫu mỹ phẩm và tham khảo các tài liệu, tiến hành khảo sát lựa chọn dung môi và quy trình xử lý mẫu như sau:

Sử dụng mẫu placebo với các kỹ thuật phân tán mẫu như lắc xoáy, lắc siêu âm hay đặt trên cách thủy ở khoảng 60 °C với các dung môi như MeOH và EtOH, kết quả cho thấy: Khi phân tán mẫu bằng cách đặt trên cách thủy ở khoảng 60 °C, tá dược rã hết và phân tán đều. Với dung môi chiết mẫu là EtOH, mẫu phân tán tốt, pic Octyl triazon thu được có hình dáng cân đối, cho tỷ lệ thu hồi hoạt chất cao và ổn định. Như vậy, kỹ thuật phân tán mẫu bằng cách đặt trên cách thủy ở 60 °C với dung môi chiết mẫu là EtOH được lựa chọn để tiếp tục nghiên cứu.

Sau khi phân tán mẫu, tiếp tục khảo sát các bước làm trong dung dịch trước khi tiêm vào hệ thống sắc ký như: lọc trực tiếp, ngâm trong nước đá rồi ly tâm và lọc, kết quả cho thấy, sau khi ngâm trong nước đá và ly tâm ở 10000 vòng trong 10 phút, tá dược lắng xuống hoàn toàn, lọc qua màng lọc 0,45 µm, dịch lọc dễ dàng qua màng.

### 3.1.3. Kết quả xây dựng quy trình

Qua quá trình khảo sát trên, chúng tôi đã xây dựng được quy trình phân tích Octyl triazon (OT) trong mỹ phẩm dạng kem như sau:

\* Điều kiện sắc ký:

- Cột sắc ký: Phenomenex Gemini-C18; (250 x 4,6 mm; 5 µm)
- Nhiệt độ cột: 40 °C
- Tốc độ dòng: 1,0 ml/phút
- Pha động : Methanol : Ethanol (50 : 50)
- Thể tích tiêm: 20 µl
- Bước sóng phát hiện: 310 nm

\* Chuẩn bị mẫu:

- Dung dịch chuẩn:
  - + *Dung dịch chuẩn gốc:* Cân chính xác khoảng 10 ml chất chuẩn OT vào bình định mức 100 ml. Hòa tan và thêm vừa đủ đến vạch bằng ethanol.

+ *Dãy dung dịch chuẩn:* Từ *dung dịch chuẩn gốc*, sử dụng dung môi pha mẫu là ethanol, tiến hành pha dãy dung dịch chuẩn có nồng độ lần lượt là 1, 2, 5, 10, 20, 30 µg/ml.

- Dung dịch thử:

Cân chính xác khoảng 0,2 g mẫu kem vào cốc có mỏ 50 ml, thêm khoảng 20 ml ethanol, dùng đũa thủy tinh phân tán đều kem trong cốc. Đặt trên cách thủy ở 60 °C trong 10 phút, thỉnh thoảng khuấy, lắc siêu âm 5 phút. Chuyển hỗn hợp vào bình định mức 50 ml, tráng rửa cốc 3 lần với ethanol, mỗi lần 5 ml. Để nguội, thêm ethanol vừa đủ đến vạch, lắc đều. Để trong nước đá 30 phút, ly

tâm (ở nhiệt độ phòng) ở 10000 vòng trong 10 phút. Lọc lớp dịch trong qua màng lọc 0,45  $\mu\text{m}$ .

### 3.2. Thẩm định quy trình phân tích

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

Tiến hành tiêm lặp lại 6 lần dung dịch chuẩn có nồng độ 2  $\mu\text{g/ml}$  vào hệ thống sắc ký, ghi lại sắc ký đồ.

Kết quả đánh giá độ phù hợp của hệ thống sắc ký được trình bày trong bảng 2.

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

STT	$T_R$ (phút)	$S_{\text{pic}}$ (mAu*s)	T
1	5,474	366,810	1,1
2	5,474	367,903	1,0
3	5,475	368,231	1,1
4	5,474	368,334	1,1
5	5,474	368,069	1,1
6	5,477	369,314	1,0
<b>Trung bình</b>	<b>5,475</b>	<b>368,110</b>	<b>1,1</b>
<b>RSD (%)</b>	<b>0,1</b>	<b>0,2</b>	

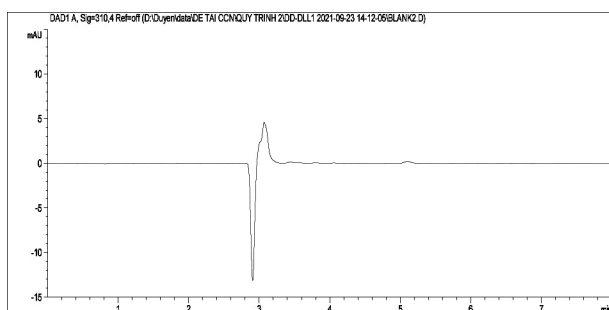
Kết quả cho thấy: Các giá trị thời gian lưu và diện tích pic của OT đều lặp lại tốt ( $RSD_{t_R} < 1\%$ ;  $RSD_{S_{\text{pic}}} < 2\%$ ), pic cân đối (hệ số kéo đuôi là 1,0 - 1,1). Như vậy, hệ thống ổn định và phù hợp để định tính, định lượng OT trong mẫu nghiên cứu.

#### 3.2.2. Độ đặc hiệu

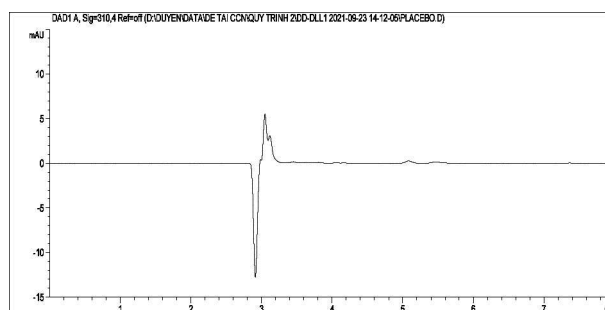
Tiến hành phân tích mẫu trắng, mẫu placebo, mẫu chuẩn và mẫu tự tạo theo quy trình phân tích. Kết quả cho thấy:

- Trên sắc ký đồ của mẫu trắng (Hình 3a) và mẫu placebo (Hình 3b) không xuất hiện pic có thời gian lưu tương ứng với thời gian lưu của pic OT thu được từ sắc ký đồ mẫu chuẩn và mẫu tự tạo.

- Trên sắc ký đồ của mẫu tự tạo (Hình 4b), pic OT được nhận diện rõ ràng và có thời gian lưu tương ứng với thời gian lưu của pic OT thu được từ sắc ký đồ mẫu chuẩn (Hình 4a) ( $t_{R \text{ chuẩn}} \approx t_{R \text{ tự tạo}} \approx 5,5$  phút).

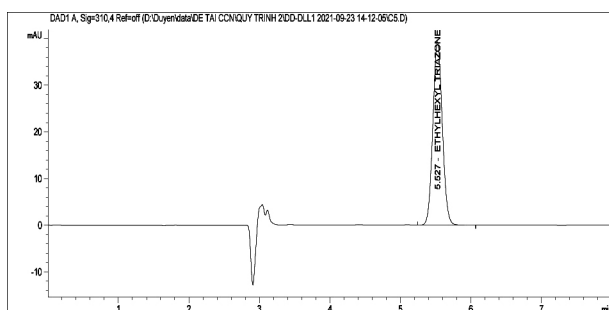


a)

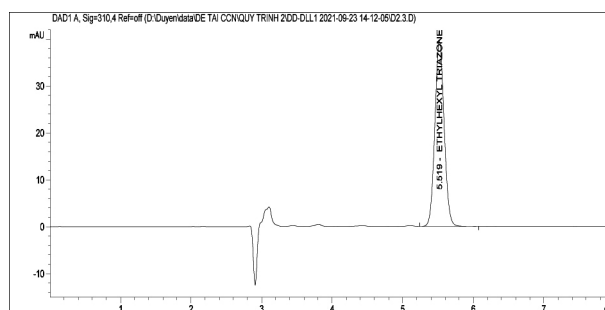


b)

**Hình 3.** Sắc ký đồ mẫu trắng (a) và mẫu placebo (b)



a)



b)

**Hình 4.** Sắc ký đồ mẫu chuẩn (a) và mẫu tự tạo (b)

- Độ tinh khiết của pic OT ở mẫu tự tạo và mẫu chuẩn đều đạt gần 100 %.
- So sánh phổ hấp thụ UV của OT ở mẫu tự tạo với mẫu chuẩn, kết quả cho hệ số tương đồng là 999,9987. Như vậy, phương pháp đạt yêu cầu về độ đặc hiệu.

### 3.2.3. Giới hạn phát hiện, giới hạn định lượng

#### 3.2.3.1. Xác định LOD, LOQ

Tiến hành phân tích mẫu chuẩn được pha trong ethanol với các nồng độ thấp dần. Giá trị LOD được xác định tại nồng độ có tỷ lệ giữa tín hiệu chiều cao pic và cường độ nhiễu nền tại lân cận pic ít nhất bằng 3. Giá trị LOQ được xác định tại nồng độ có tỷ lệ giữa tín hiệu chiều cao pic và cường độ nhiễu nền tại lân cận pic ít nhất bằng 10.

Kết quả thực nghiệm thu được giá trị giới hạn phát hiện và giới hạn định lượng của OT là: LOD = 0,04 µg/ml và LOQ = 0,10 µg/ml.

#### 3.2.3.2. Thực nghiệm xác nhận sự phù hợp của giá trị LOD, LOQ

Tiến hành phân tích các mẫu tự tạo ở nồng độ LOD, LOQ bằng cách thêm một thể tích dung dịch chuẩn gốc vào mẫu placebo và xử lý mẫu theo quy trình phân tích.

Kết quả cho thấy:

Trên SKĐ mẫu ở nồng độ LOD, pic OT được nhận diện rõ ràng và có thời gian lưu tương ứng với thời gian

lưu thu của pic OT được từ dung dịch chuẩn.

Với mẫu ở nồng độ LOQ, sử dụng đường chuẩn trong mục 3.2.4. Xây dựng đường chuẩn và khoảng tuyến tính để tính phần trăm thu hồi hoạt chất. Kết quả cho thấy: độ thu hồi trung bình là 104,6 %, độ lặp lại với giá trị RSD = 3,9 %, đạt yêu cầu quy định của USFDA [6] (Kết quả chi tiết được trình bày trong mục 3.2.5. Độ đúng, độ lặp lại của phương pháp).

Từ các kết quả thực nghiệm, xác định được giới hạn phát hiện và giới hạn định lượng của phương pháp là: LOD = 10,3 µg/g và LOQ = 25,9 µg/g.

#### 3.2.4. Xây dựng đường chuẩn và khoảng tuyến tính

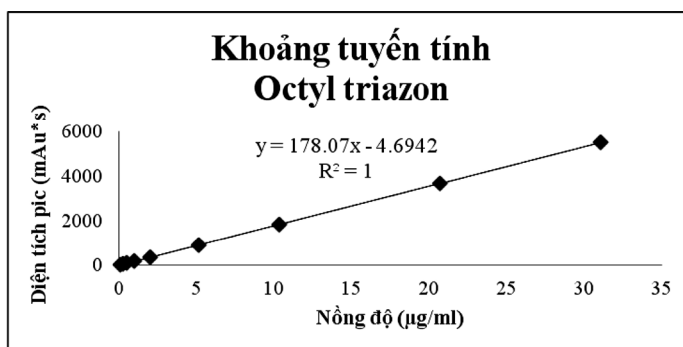
Chuẩn bị dung dịch chuẩn gốc: Cân 10,41 mg chuẩn Octyl triazon vào bình định mức 100 ml, hòa tan và thêm vừa đủ đến vạch bằng ethanol.

Từ dung dịch chuẩn gốc tiến hành pha dãy dung dịch chuẩn trong ethanol có nồng độ lần lượt là 0,10; 0,31; 0,52; 1,03; 2,07; 5,17; 10,35; 20,70; 31,04 µg/ml.

Kết quả xác định mối tương quan tuyến tính được thể hiện trong bảng 3 và hình 5.

**Bảng 3.** Kết quả khảo sát đường chuẩn của OT

STT	S <sub>pic</sub> (mAu*s)	C <sub>tim lại</sub> (µg/ml)	Độ đúng (%)
S1	16,706	0,12	116,1
S2	55,120	0,34	108,2
S3	91,807	0,54	104,7
S4	185,782	1,07	103,4
S5	368,073	2,09	101,2
S6	905,084	5,11	98,7
S7	1824,387	10,27	99,3
S8	3671,097	20,64	99,7
S9	5535,133	31,11	100,2
<b>Y = ax+b</b>	<b>y = 178,07 x - 4,6942</b>		
<b>r</b>	<b>1,0000</b>		



**Hình 5.** Đồ thị biểu diễn tương quan tuyến tính giữa diện tích pic OT và nồng độ

Kết quả thực nghiệm cho thấy, hệ số tương quan của OT lớn hơn 0,995 và nồng độ xác định lại từ đường chuẩn so với giá trị lý thuyết đều nằm trong giới hạn cho phép (98,7 % - 116,1 %) [7]. Như vậy, có sự tương quan tuyến tính giữa diện tích pic của OT và nồng độ trong khoảng nồng độ khảo sát.

### 3.2.5. Độ đúng, độ lặp lại của phương pháp

Đánh giá độ đúng, độ lặp lại của phương pháp trên

các mẫu tự tạo được chuẩn bị bằng cách thêm chính xác một thể tích dung dịch chuẩn gốc có nồng độ 104,97 µg/ml vào các mẫu placebo để thu được dung dịch các mẫu tự tạo ở 3 mức nồng độ: nồng độ thấp (LOQ), nồng độ trung bình (nồng độ khoảng 2 µg/ml) và nồng độ cao (nồng độ khoảng 30 µg/ml). Các mẫu tự tạo được xử lý theo quy trình phân tích. Tại mỗi mức nồng độ, tiến hành phân tích 6 mẫu độc lập. Kết quả được thể hiện trong bảng 4.

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

Mẫu	$m_{\text{thêm vào}}$ (µg)	$S_{\text{pic}}$ (mAU*s)	$m_{\text{tìm lại}}$ (µg)	Độ thu hồi (%)	Số liệu thống kê (n=6) (%)
LOQ	5,25	15,661	5,72	108,9	TB = 104,6 RSD = 3,9
		15,261	5,60	106,8	
		14,523	5,40	102,8	
		14,220	5,31	101,2	
		15,626	5,71	108,7	
		13,853	5,21	99,2	
MQC	104,97	356,542	101,43	96,6	TB = 99,0 RSD = 2,1
		367,615	104,54	99,6	
		362,541	103,12	98,2	
		358,210	101,90	97,1	
		374,103	106,36	101,3	
		373,722	106,25	101,2	
HQC	1574,50	5452,022	1532,18	97,3	TB = 98,8 RSD = 0,9
		5592,995	1571,76	99,8	
		5527,839	1553,47	98,7	
		5563,614	1563,51	99,3	
		5542,067	1557,46	98,9	
		5546,867	1558,81	99,0	

Kết quả ở Bảng 4 cho thấy ở các khoảng nồng độ LOQ, trung bình và cao của các mẫu tự tạo, phương pháp có độ đúng nằm trong khoảng cho phép, độ lặp lại cũng đạt yêu cầu quy định của USFDA [6]. Như vậy, phương pháp đạt yêu cầu về độ đúng, độ lặp lại.

### 3.2.6. Độ chính xác

Độ chính xác của phương pháp gồm độ lặp lại và độ chính xác trung gian. Độ chính xác trung gian được đánh

giá trên các mẫu tự tạo tương tự độ lặp lại trên cùng thiết bị nhưng khác ngày và khác kiểm nghiệm viên. Chuẩn bị các mẫu tự tạo bằng cách thêm chính xác một thể tích dung dịch chuẩn gốc có nồng độ 104,47 µg/ml vào các mẫu placebo để thu được dung dịch các mẫu tự tạo ở 3 mức nồng độ tương tự như mục 3.2.5. *Độ đúng - Độ lặp lại của phương pháp.* Kết quả độ chính xác của phương pháp được thể hiện trong bảng 5.

**Bảng 5. Kết quả độ chính xác của phương pháp**

Mẫu	m <sub>thêm vào</sub> (µg)	S <sub>pic</sub> (mAU*s)	m <sub>tìm lại</sub> (µg)	Độ thu hồi (%)	Số liệu thống kê (n=12)* (%)
LOQ	5,22	16,312	5,77	110,4	TB = 104,8 RSD = 3,8
		15,524	5,54	106,2	
		14,576	5,28	101,0	
		14,209	5,18	99,1	
		15,600	5,57	106,6	
		15,721	5,60	107,2	
MQC	104,47	355,91	101,24	96,9	TB = 99,2 RSD = 1,9
		367,047	104,37	99,9	
		361,124	102,71	98,3	
		360,643	102,57	98,2	
		373,380	106,15	101,6	
		373,079	106,07	101,5	
HQC	1567,04	5443,146	1531,49	97,7	TB = 99,1 RSD = 0,9
		5580,951	1570,23	100,2	
		5523,305	1554,03	99,2	
		5564,596	1565,63	99,9	
		5527,844	1555,30	99,3	
		5550,687	1561,72	99,7	

\*: Bao gồm kết quả ở bảng 4 và bảng 5.

Kết quả ở Bảng 5 cho thấy ở các khoảng nồng độ thấp, trung bình và cao của các mẫu tự tạo, phương pháp có độ đúng nằm trong khoảng cho phép, độ chính xác đạt yêu cầu quy định của USFDA về thẩm định phương pháp. Như vậy, phương pháp đạt yêu cầu về độ chính xác.

### 3.2.7. Độ ổn định của dung dịch

Tiến hành nghiên cứu độ ổn định của dung dịch mẫu

chuẩn hỗn hợp gốc được chuẩn bị theo quy trình phân tích có nồng độ 104,67 µg/ml và các mẫu tự tạo ở mức nồng độ trung bình được bảo quản ở 2 – 8 °C sau những khoảng thời gian khác nhau (sau khi pha 1 ngày, 2 ngày và 7 ngày). Độ ổn định của các dung dịch này được đánh giá dựa trên độ lệch về phần trăm thu hồi của các mẫu ở mỗi thời điểm so với thời điểm mới pha. Kết quả được thể hiện ở bảng 6.

**Bảng 6. Độ ổn định của dung dịch chuẩn gốc**

Thời điểm	Độ thu hồi (%) (TB ± SD) (n = 3)	Độ lệch (%)
<b>Dung dịch chuẩn gốc</b>		
Mới pha	99,9 ± 0,2	-
Sau 1 ngày	99,3 ± 0,1	-0,6
Sau 2 ngày	99,8 ± 0,1	-0,1
Sau 7 ngày	99,8 ± 0,1	-0,1
<b>Dung dịch mẫu tự tạo</b>		
Mới pha	98,7 ± 0,8	-
Sau 1 ngày	99,6 ± 0,6	0,9
Sau 2 ngày	99,2 ± 0,5	0,6
Sau 7 ngày	99,2 ± 0,5	0,6



Kết quả thực nghiệm cho thấy, phần trăm thu hồi của OT trong dung dịch chuẩn gốc và dung dịch mẫu tự tạo bảo quản ở nhiệt độ 2 – 8 °C sau 1 ngày, 2 ngày và 7 ngày nằm trong giới hạn cho phép (95 - 105 %) với giá trị RSD < 3 % và chênh lệch so với nồng độ mới pha không quá 3 %. Như vậy, dung dịch chuẩn gốc và dung dịch mẫu tự tạo ổn định ở điều kiện bảo quản 2 °C – 8 °C trong thời gian 7 ngày.

### 3.3. Ứng dụng

Áp dụng phương pháp vừa xây dựng được để xác định hàm lượng của các chất chống nắng trong 2 mẫu mỹ phẩm dạng kem trên thị trường. Các mẫu được xử lý theo quy trình phân tích. Kết quả cho thấy, hàm lượng của OT trong các mẫu là 1,42 %, RSD = 1,3 % (mẫu M1) và 2,89 %, RSD = 0,9 % (Mẫu M2).

### 4. Kết luận

Qua quá trình thực nghiệm, đề tài đã khảo sát và lựa chọn được điều kiện sắc ký phù hợp cho phép định tính, định lượng Octyl triazon trong nền mẫu mỹ phẩm dạng kem. Đồng thời lựa chọn được quy trình xử lý mẫu đơn giản, chiết được hoạt chất với tỷ lệ thu hồi cao. Phương pháp đã được thẩm định đầy đủ về độ đặc hiệu, giới hạn phát hiện, giới hạn định lượng, khoảng tuyến tính-đường chuẩn, độ đúng – độ lặp lại, độ chính xác trung gian và độ ổn định dung dịch. Kết quả thẩm định các chỉ tiêu đạt yêu cầu của thẩm định phương pháp phân tích hóa học nói chung [7] và thẩm định phương pháp phân tích trong nền mẫu mỹ phẩm nói riêng [6]. Phương

pháp đã được áp dụng để phân tích 02 mẫu thực tế trên thị trường. Kết quả cho hàm lượng Octyl triazon đạt yêu cầu về giới hạn cho phép sử dụng của ASEAN.

### Tài liệu tham khảo

1. Association of South East Asian nation - ASEAN (2019), *Annex VII - List of UV filters which cosmetic products may contain*, Version No: 2019-02. p.1-7.
2. European commission (2021), *Annex VI- List of UV filters allowed in cosmetic products*, p.1-9.
3. Anna W Sobanska and Jaroslaw Pyzowski (2012), “Quantification of Sunscreen ethylhexyl triazone in topical skin-care products by normal-phase TLC/ Densitometry”, *The Scientific World Journal*, Vol.2012, p.1-6.
4. M. Nyeberg et al (2009), “Validation of HPLC method for the simultaneous and quantitative determination of 12 UV-filter in cosmetics”, *International Journal of Cosmetic Science*, Vol.32, p.47-53.
5. Ministry of public health – Thai Lan, “*Determination of sunscreen in cosmetic products by high performance liquid chromatograph (HPLC) using reversed phase system*”.
6. Food and Drug administration - United states (2019), *Guideline for the validation of chemical methods in food, feed, cosmetics and veterinary products*.
7. Viện kiểm nghiệm an toàn vệ sinh thực phẩm quốc gia (2010), *Thẩm định phương pháp trong phân tích hóa học và vi sinh*, Nhà xuất bản Khoa học và kỹ thuật, tr.16-59.

### SUMMARY

*A HPLC-based method was developed for identification and determination of Octyl triazone in cosmetic creams. Octyl triazone was extracted from cream matrices with ethanol and then 20 µl of sample solution was injected into chromatographic system with the following conditions: Phenomenex Gemini-C18 (250 x 4,6 mm; 5 µm) column maintaining at 40 °C, a mixture of methanol and ethanol (50 : 50) was used as the as a mobile phase, and DAD-detector was set at wavelength of 310 nm for recording chromatograms. The developed method was validated over the range from 0.1 µg/ml to 30 µg/ml in term of specificity, linear range, precision and accuracy according to the USFDA guidelines. This method was suitable for determination of Octyl triazone in cosmetic creams.*

(Ngày nhận bài: 21/07/2022 - Ngày phản biện: 16/08/2022 - Ngày duyệt đăng: 19/09/2022)

## MỤC LỤC

Trang

- **Nghiên cứu khoa học**
- Phân biệt dược liệu Hậu phác và dược liệu Hậu phác nhầm lẫn, giả mạo. 1  
*VÕ THỊ HƯỜNG, THÁI NGUYỄN HÙNG THU, NGUYỄN THỊ LIÊN*✉
- Nghiên cứu xây dựng qui trình xác định tiểu phân trong thuốc tiêm, thuốc tiêm truyền bằng kỹ thuật quét bán tự động trên hệ thống kính hiển vi BX51M-OLYMPUS. 4  
*TRẦN THỊ HỒNG ANH*✉, *LỤC THỊ VÂN, NGUYỄN THU PHƯƠNG, NGUYỄN VĂN LINH, NGUYỄN THỊ HỒNG HẠNH*
- Định danh, sơ bộ xác định thành phần và tác dụng của loài Trà hoa vàng (*Camellia Flava*) trồng tại Tây Nguyên. 12  
*TRƯƠNG MINH NHỰT, NGUYỄN HOÀNG THẢO MY, NGUYỄN HỮU LẠC THUY*✉
- Nghiên cứu xác định đồng thời ketamin và norketamin trong máu bằng sắc ký khí khối phổ. 18  
*PHẠM THỊ QUỲNH, PHẠM THỊ NGỌC MAI, PHẠM THỊ THU HÀ, PHẠM QUỐC CHINH* ✉
- Định tính và định lượng chất chống nắng octyl triazon trong mỹ phẩm dạng kem bằng phương pháp HPLC. 24  
*NGÔ THỊ DUYÊN, LÊ THỊ HƯỜNG HOA, TRẦN ĐỨC LAI, PHÙNG THỊ HỒNG, NGUYỄN VĂN HÀ* ✉

## CONTENTS

Page

- **Scientific researches**
- Distinctions between *Cortex Magnoliae officinalis* and its counterfeit. 1  
*VO THI HUONG, THAI NGUYEN HUNG THU, NGUYEN THI LIEN* ✉
- Development of a procedure for determining subvisible particle sizes in injections and infusions by BX51M-OLYMPUS microscope. 4  
*TRAN THI HONG ANH* ✉, *LUC THI VAN, NGUYEN THU PHUONG, NGUYEN VAN LINH, NGUYEN THI HONG HANH*
- Identification, chemical determination and evaluation bioactivities of *Camellia Flava* in Tay Nguyen. 12  
*TRUONG MINH NHUT, NGUYEN HOANG THAO MY, NGUYEN HUU LAC THUY* ✉
- Simultaneous determination of ketamin and norketamin in human blood by GC-MS. 18  
*PHAM THI QUYNH, PHAM THI NGOC MAI, PHAM THI THU HA, PHAM QUOC CHINH* ✉
- Identification and Determination of Octyl triazone in cosmetic creams by HPLC. 24  
*NGO THI DUYEN, LE THI HUONG HOA, TRAN DUC LAI, PHUNG THI HONG, NGUYEN VAN HA* ✉