

VIỆN KIỂM NGHIỆM THUỐC TRUNG ƯƠNG

ISSN 1859 - 0055

TẠP CHÍ

**KIỂM
NGHIỆM
thuốc**

JOURNAL OF DRUG QUALITY CONTROL

SỐ 4.2022

TẬP 20-SỐ 78

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 4/2022

JOURNAL OF DRUG QUALITY CONTROL N^o 4/2022

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 01 năm 2023.

XÂY DỰNG BỘ DỮ LIỆU HÌNH ẢNH SOI BỘT VÀ SẮC KÝ LỚP MỎNG CỦA 5 DƯỢC LIỆU NGƯU TẮT, PHÒNG PHONG, XUYÊN KHUNG, HOÀNG CẦM VÀ HOÀNG KỶ

VÕ THỊ HƯỜNG

Trung tâm Kiểm nghiệm dược phẩm, mỹ phẩm
Bình Định

NGUYỄN THỊ LIÊN✉

Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương

Từ khóa: Dược liệu chuẩn, dữ liệu hình ảnh soi bột, sắc ký lớp mỏng.

1. Đặt vấn đề

Trên thị trường ngày nay xuất hiện nhiều chế phẩm y học cổ truyền, thực phẩm chức năng có thành phần từ dược liệu và xu hướng sử dụng những loại thuốc có nguồn gốc từ dược liệu của người dân ngày càng tăng. Do đó, nguy cơ sử dụng nhầm lẫn, hoặc dược liệu bị làm giả mạo cũng tăng lên.

Để kiểm tra chất lượng dược liệu cũng như các chế phẩm có nguồn gốc từ dược liệu, thì dược liệu chuẩn và bộ dữ liệu chuẩn có vai trò rất quan trọng. Mặc dù Dược điển Việt Nam V đã có nhiều chuyên luận về dược liệu, tuy nhiên các chuyên luận này chủ yếu mô tả dược liệu bằng ngôn ngữ không có các hình ảnh cụ thể để minh họa khiến thử nghiệm viên khó so sánh và đối chiếu [1]. Vì vậy chúng tôi tiến hành xây dựng bộ dữ liệu hình ảnh soi bột và sắc ký lớp mỏng của 05 dược liệu chuẩn theo Dược điển Việt Nam V bao gồm Nguru tắt, Phòng phong, Xuyên khung, Hoàng cầm và Hoàng kỳ, nhằm cung cấp bộ dữ liệu tham khảo, cho công tác kiểm tra giám sát chất lượng dược liệu và chế phẩm có nguồn gốc từ dược liệu.

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 Sony 16.1 (Trung Quốc);
- Các dung môi, hóa chất, thuốc thử đạt tinh khiết phân tích, theo qui định của DĐVN V;
- Các thiết bị, dụng cụ thủy tinh cần thiết.

2.2. Đối tượng nghiên cứu

Các dược liệu chuẩn của Viện Kiểm nghiệm thuốc thành phố Hồ Chí Minh, bao gồm: Nguru tắt (*Radix Achyranthis bidentatae*), số lô 01112018; Phòng phong (*Radix Saposhnikoviae divaricatae*), số lô 15012019; Xuyên khung (*Rhizoma Ligustici wallichii*), số lô 15012020; Hoàng cầm (*Radix Scutellariae*), số lô 01042019; Hoàng kỳ (*Radix Astragali membranacei*), số lô 15062020.

2.3. Phương pháp nghiên cứu

- Phương pháp mô tả cảm quan: quan sát;
- Phương pháp soi bột: Tiến hành theo Dược điển Việt Nam V [1]. Bột dược liệu chuẩn được nghiền và rây qua rây số 125 μm . Quan sát bằng kính hiển vi MBL 2000-T-PL-30W, với độ phóng đại 40x;
- Phương pháp sắc ký lớp mỏng: Tiến hành theo Dược điển Việt Nam V [1].

3. Kết quả và bàn luận

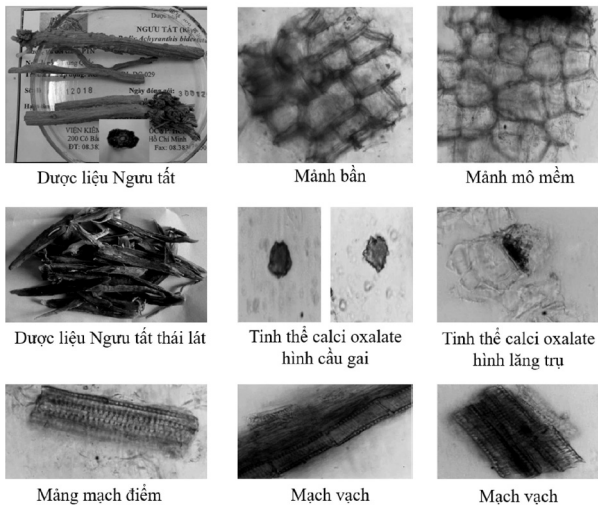
3.1. Dược liệu Nguru tắt

3.1.1. Mô tả

Rễ hình trụ, dài 20 cm – 30 cm, đường kính 0,5 cm – 1,0 cm. Đầu trên mang vết tích của gốc thân, đầu dưới thuôn nhỏ. Mặt ngoài màu vàng nâu có nhiều nếp nhăn dọc nhỏ và vết tích của rễ con [1].

3.1.2. Soi bột

- Bột màu nâu nhạt, mùi hơi hắc, vị ngọt sau đắng.
- Soi dưới kính hiển vi thấy: Mảnh bản, mảnh mô mềm thành mỏng, mảnh mạch điểm, tinh thể calci oxalat hình cầu gai. Mảnh hình thang, tinh thể calci oxalat hình lăng trụ nằm trong tế bào [2] (Hình 1).



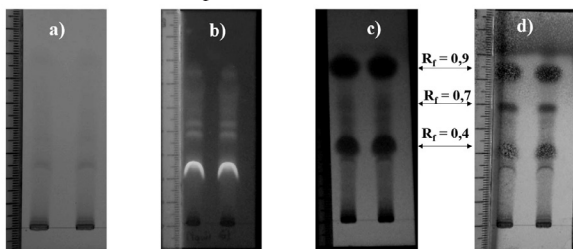
Hình 1. Hình ảnh soi bột dược liệu chuẩn Nguu tât

3.2.3. Sắc ký lớp mỏng

Điều kiện sắc ký [1]:

- Bản mỏng: Silica gel 60 F₂₅₄
- Dung môi triển khai: Cloroform – methanol (40 : 1)
- Dung dịch dược liệu chuẩn: Cân 1 g bột dược liệu chuẩn Nguu tât, thêm 30 ml *ethanol* 75 % và 3 ml *acid hydrochloric*, đun hồi lưu trong 1,5 h. Để nguội, lọc, cô dịch lọc tới cạn dưới áp suất giảm. Dùng 20 ml nước để hòa tan cặn và chuyển sang bình cạn, chiết bằng 100 ml *dicloromethan*. Gạn lấy dịch chiết *dicloromethan*, cô cạn dưới áp suất áp giảm. Hòa tan cặn trong 1 ml *methanol* thu được dung dịch chấm sắc ký.

- Cách tiến hành: Chấm riêng biệt lên bản mỏng 10 μ l dung dịch trên. Sau khi triển khai sắc ký dung môi đi được 7 cm, lấy bản mỏng để khô trong không khí. Soi UV (254 nm và 366 nm). Phun *acid phosphomolybdic* 5 % trong *ethanol*. Sấy bản mỏng ở 120 °C đến khi hiện rõ vết. Quan sát dưới ánh sáng thường. Trên sắc ký đồ của dung dịch dược liệu chuẩn Nguu tât có các vết có màu sắc và giá trị R_F được trình bày ở Hình 2.



Hình 2. Hình ảnh sắc ký lớp mỏng dược liệu chuẩn Nguu tât

- a) SKĐ ban đầu b) Soi UV-366 nm
c) Soi UV-254 nm d) Phun *acid phosphomolybdic* 5%/ethanol

3.2. Dược liệu Phòng phong

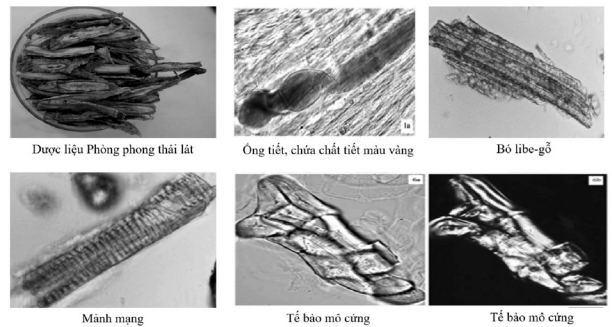
3.2.1. Mô tả

Mô tả dược liệu sau khi đã thái lát: Các lát hình elip. Bên ngoài màu nâu xám có các nếp nhăn dọc, sần sùi, đôi khi có các u lồi ngang kéo dài giống các lỗ vỏ, các lát đầu rễ có mang các gốc cuống lá dạng sợi. Mặt cắt màu nâu nhạt và phần vỏ bị nứt, khe nứt màu vàng nhạt, phần gỗ có các tia xuyên tâm. Mùi thơm, vị hơi ngọt [1].

3.2.2. Soi bột

- Bột có màu nâu nhạt.

- Soi kính hiển vi thấy: Ống tiết chứa chất tiết màu vàng nâu [2], Các bó libe – gỗ của góc cuống lá thường đi kèm các bó sợi. Mạch mạng. Tế bào mô cứng màu vàng lục, hình bầu dục hay dạng chữ nhật có thành dày [2] (Hình 3).



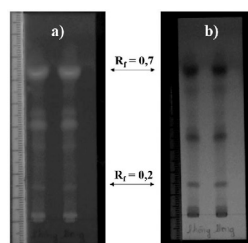
Hình 3. Hình ảnh soi bột dược liệu chuẩn Phòng phong

3.2.3. Sắc ký lớp mỏng

Điều kiện sắc ký [1]:

- Bản mỏng: Silica gel 60 F₂₅₄
- Dung môi triển khai: Cloroform – methanol (4 : 1)
- Dung dịch dược liệu chuẩn: Cân 1 g bột dược liệu chuẩn Phòng phong, thêm 20 ml *acetone*, lắc siêu âm 20 phút, lọc, cô dịch lọc trong cách thủy đến cạn, hòa cặn trong 1 ml *ethanol* 96 % làm dung dịch chấm sắc ký.

- Cách tiến hành: Chấm riêng biệt lên bản mỏng 10 μ l dung dịch trên. Sau khi triển khai sắc ký dung môi đi được 9 cm, lấy bản mỏng để khô trong không khí. Quan sát dưới ánh sáng UV (254 nm và 366 nm). Trên sắc ký đồ của dung dịch dược liệu chuẩn Phòng phong có các vết có màu sắc và giá trị R_F được trình bày ở Hình 4.



Hình 4. Hình ảnh sắc ký lớp mỏng của dược liệu chuẩn Phòng phong

- a) Soi UV 366 nm
b) Soi UV 254 nm

3.3 Dược liệu Xuyên khung

3.3.1. Mô tả

Mô tả dược liệu sau khi đã thái lát: Hình khối méo mó, nhiều dạng. Có nhiều u không đều nổi lên, bên ngoài màu nâu đất, bên trong màu vàng nâu có nếp nhăn, xù xì. Chất cứng, khó bẻ gãy. Mùi thơm, vị cay hơi tê.

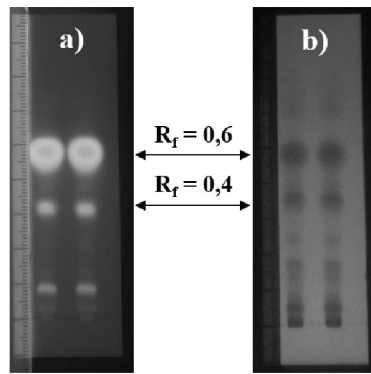
3.3.2. Soi bột

- Bột màu vàng nâu.
- Soi kính hiển vi thấy: Nhiều hạt tinh bột hình tròn, bầu dục, hình thận. Rốn hình chấm, hình vạch ngang, hạt đơn hoặc kép. Mảnh bản màu nâu. Mảnh mạch mạng, mạch vạch, mạch thang. Sợi có thành dày. Mảnh tế bào mô mềm có nhiều hạt tinh bột và có ống tiết [1] (Hình 5).

3.3.3. Sắc ký lớp mỏng

Điều kiện sắc ký [1]:

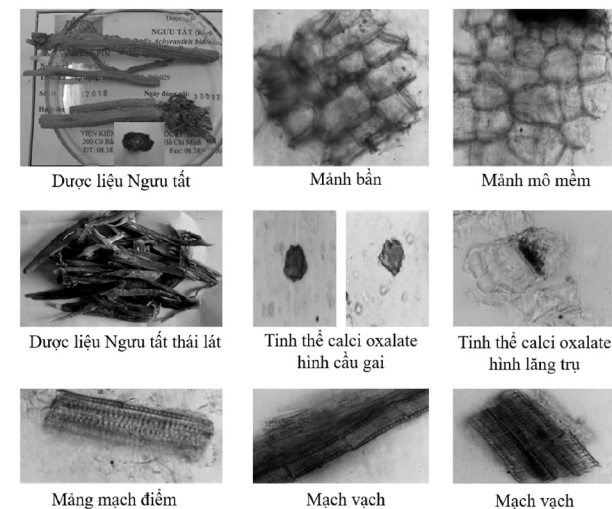
- Bản mỏng: Silica gel 60 F₂₅₄
- Dung môi triển khai: n-hexal – ethyl acetat (3 : 1)
- Dung dịch dược liệu chuẩn: Cân 1 g bột dược liệu chuẩn Xuyên khung, thêm 20 ml ether, đun hồi lưu trên cách thủy 1 giờ, để nguội, lọc. Bóc hơi dịch lọc trên cách thủy đến cạn. Hòa cạn trong 2 ml ethyl acetat làm dung dịch chấm sắc ký.



Hình 6. Hình ảnh sắc ký lớp mỏng dược liệu chuẩn Xuyên khung

a) Soi UV 366 nm

b) Soi UV 254 nm



Hình 5. Hình ảnh soi bột dược liệu chuẩn Xuyên khung

- Cách tiến hành: Chấm riêng biệt lên bản mỏng 10 µl dung dịch trên. Sau khi triển khai sắc ký dung môi đi được 9 cm, lấy bản mỏng để khô trong không khí. Quan sát dưới ánh sáng UV (254 nm và 366 nm). Trên sắc ký đồ của dung dịch dược liệu chuẩn Xuyên khung có các vết có màu sắc và giá trị R_f được trình bày ở Hình 6.

3.4 Dược liệu Hoàng cầm

3.4.1. Mô tả

Rễ hình chùy, vặn xoắn. Mặt ngoài nâu vàng hay vàng thẫm, rải rác có các vết của rễ con hơi lồi, phân trên hơi ráp, có các vết khía dọc vặn vẹo hoặc vân dạng mạng, phần dưới có các vết khía dọc và các vết nhăn nhỏ.

3.4.2. Soi bột

- Màu vàng hay vàng nâu.
- Soi kính hiển vi thấy: Sợi libe rải rác hoặc tập hợp thành bó hình thoi, thành dày có nhiều ống trao đổi nhỏ. Tế bào đá hơi tròn hoặc hình vuông hay hình chữ nhật, thành dày hay rất dày. Tế bào bản màu vàng nâu, nhiều cạnh [2]. Mảnh mạch nhiều thường là mạch mạng. Sợi gỗ [2] thường đứt gãy với các lỗ xiên rải rác. Nhiều hạt tinh bột, hạt đơn hình cầu có rốn nổi rõ, có khi hạt kép 2 đến 3 hạt [1] (Hình 7).

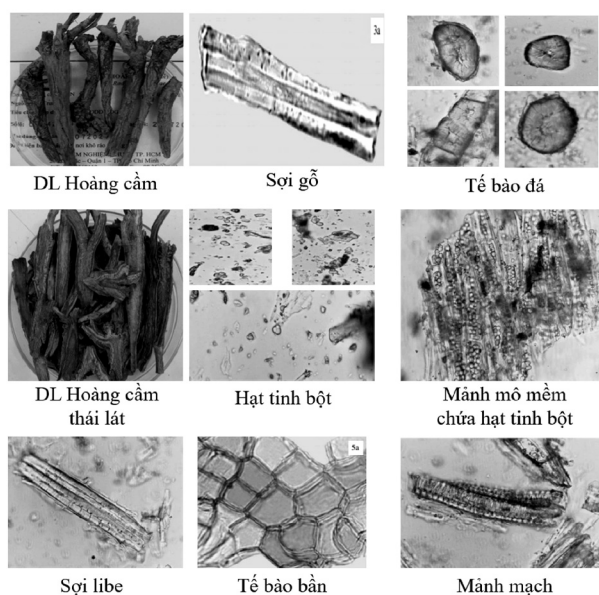
3.4.3. Sắc ký lớp mỏng

Điều kiện sắc ký [1]:

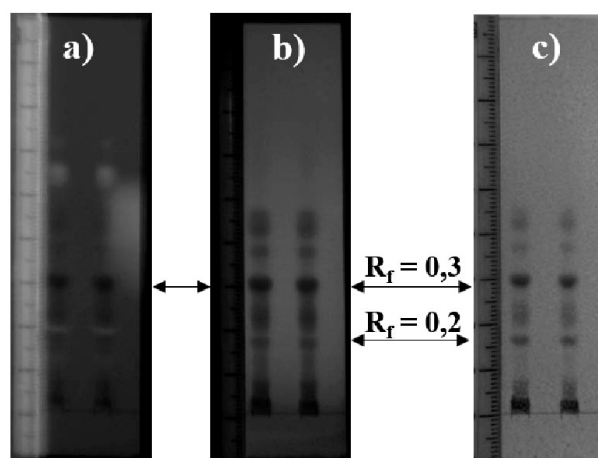
- Bản mỏng: Silica gel 60 F₂₅₄
- Dung môi triển khai: Toluene - ethyl acetat - methanol - acid formic (10 : 3 : 1 : 2)
- Dung dịch dược liệu chuẩn: Cân 1 g bột dược liệu Hoàng cầm chuẩn, thêm 30 ml hỗn hợp ethyl acetat - methanol (3 : 1), đun sôi hồi lưu trong cách thủy 30 phút, để nguội, lọc. Cô dịch lọc trên cách thủy đến cạn. Hòa cạn với 5 ml ethanol làm dung dịch chấm sắc ký.

- Cách tiến hành: Chấm riêng biệt lên bản mỏng 5 µl dung dịch trên. Sau khi triển khai sắc ký dung môi đi được 9 cm, lấy bản mỏng để khô trong không khí. Soi UV (254 nm, 366 nm), phun dung dịch sắt (III) clorid 1 % trong ethanol. Sấy bản mỏng 105 °C đến khi hiện rõ

vết. Quan sát dưới ánh sáng thường. Trên sắc ký đồ của dung dịch dược liệu chuẩn Hoàng cầm có các vết với hình dạng, màu sắc và giá trị R_f được trình bày ở Hình 8.



Hình 7. Hình ảnh soi bột của dược liệu chuẩn Hoàng cầm



Hình 8. Hình ảnh sắc ký lớp mỏng dược liệu chuẩn Hoàng cầm

a) Soi UV 366 nm b) Soi UV 254 nm
c) Phun $FeCl_3$ 1 % trong ethanol

3.5 Dược liệu Hoàng kỳ

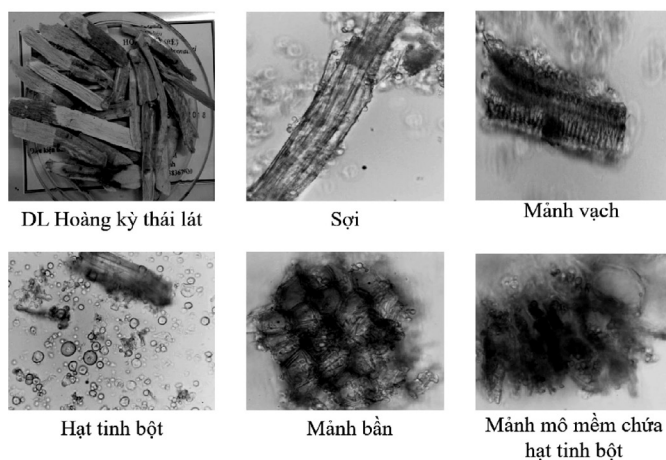
3.5.1. Mô tả

- Mô tả dược liệu sau khi đã thái lát: Các lát hình elip dài thuôn. Bên ngoài màu vàng hơi nâu nhạt hoặc màu nâu nhạt, với nếp nhăn dọc và rãnh dọc không đều. Chất cứng và dai, không dễ bẻ gãy, mặt gãy nhiều sợi và nhiều tinh bột. Mặt cắt phần vỏ màu trắng và phần gỗ màu vàng nhạt, đôi khi phần gỗ già bị mục nát màu nâu đen và rỗng. Mùi thơm nhẹ, vị hơi ngọt và hơi tanh như mùi đậu khi nhai [1].

3.5.2. Soi bột

- Màu trắng hơi vàng.

- Soi kính hiển vi thấy: Các sợi hợp thành bó hoặc rải rác, thành sợi dày có khe nứt dọc trên bề mặt, hai đầu sợi thường bị gãy thành dạng tua hoặc hình hơi cụt. Các mảnh mạch vạch. Nhiều hạt tinh bột đơn hoặc kép đôi kép 3 hình gần tròn hoặc hình trứng, nằm rải rác hoặc tập trung thành đám. Mảnh mô mềm chứa hạt tinh bột [1] (Hình 9).



Hình 9. Hình ảnh soi bột của dược liệu chuẩn Hoàng kỳ

3.5.3. Sắc ký lớp mỏng

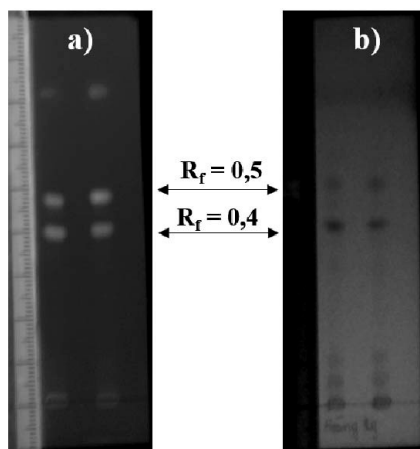
Điều kiện sắc ký [1]:

- Bản mỏng: Silica gel 60 F₂₅₄

- Dung môi triển khai: Cloroform – methanol (10 : 1).

- Dung dịch dược liệu chuẩn: Cân 2 g bột dược liệu chuẩn Hoàng kỳ, thêm 30 ml *ethanol* 96 %, đun sôi hồi lưu trên cách thủy 20 phút, để nguội, lọc, cô dịch lọc trên cách thủy đến cạn. Hòa tan cặn trong 15 ml *dung dịch natri hydroxyd* 0,3 %, lọc điều chỉnh dịch lọc đến pH 5–6 bằng *dung dịch acid hydroclorid* 10 %, rồi lắc với 15 ml *ethyl acetat*. Gạn lấy dịch chiết *ethyl acetat* lọc qua giấy lọc có *natri sulfat khan*, cô dịch chiết *ethyl acetat* trên cách thủy đến cạn. Hòa cặn với 1 ml *ethyl acetat* làm dung dịch chấm sắc ký.

- Cách tiến hành: Chấm riêng biệt lên bản mỏng 10 µl dung dịch trên. Sau khi triển khai sắc ký dung môi đi được 9 cm, lấy bản mỏng để khô trong không khí. Hơ bản mỏng trên hơi amoniac. Quan sát dưới ánh sáng UV (254 nm, 366 nm). Trên sắc ký đồ của dung dịch dược liệu chuẩn Hoàng kỳ có các vết có màu sắc và giá trị R_f được trình bày ở Hình 10.



Hình 10. Hình ảnh sắc ký lớp mỏng dược liệu chuẩn Hoàng kỳ

a) Hơ hơi ammoniac & soi UV 366 nm

b) Hơ hơi ammoniac & soi UV 254 nm

4. Kết luận

Đã xây dựng được bộ dữ liệu ảnh dựa trên các phương pháp mô tả, soi bột và sắc ký lớp mỏng nêu trong Dược điển Việt Nam V của 05 dược liệu chuẩn bao gồm Ngưu tất, Phòng phong, Xuyên khung, Hoàng cầm, Hoàng kỳ. Bộ dữ liệu ảnh này có thể dùng để đối chiếu, tham khảo trong quá trình kiểm nghiệm dược liệu và các chế phẩm có thành phần là các dược liệu trên.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Bộ Y tế (2017), Dược điển Việt Nam V, Nhà xuất bản Y học, tập 2.
2. Hong Kong Chinese Materia Medica Standards (HKCMMS) Office volume 1, volume 3. *Radix Achyranthis bidentatae*, *Radix Saposhnikoviae divaricatae*, *Radix Scutellariae*.

SUMMARY

In this study, we built a dataset of powder microscopic and thin layer chromatography images of 5 standard medicinal herbs including Radix Achyranthis bidentatae, Radix Saposhnikoviae divaricatae, Radix Ligustici wallichii, Radix Scutellariae, and Radix Astragali membranacei based on the methods described in Vietnamese Pharmacopoeia V. This image dataset can be used for comparison and reference in the process of testing medicinal herbs and preparations containing the medicinal herbs mentioned above.

(Ngày nhận bài: 04/01/2022; Ngày phản biện: 03/3/2022; Ngày duyệt đăng: 04/11/2022)

XÂY DỰNG VÀ THẨM ĐỊNH QUY TRÌNH ĐỊNH LƯỢNG ĐỒNG THỜI RUPATADIN, METHYLPARABEN VÀ PROPYLPARABEN TRONG SIRO BẰNG PHƯƠNG PHÁP SẮC KÝ LỎNG PHA ĐẢO

KIM NGỌC ĐỨC, NGUYỄN LÂM HỒNG

NGUYỄN THỊ VÂN, NGUYỄN VĂN BÌNH, LÊ QUANG THẢO✉

Đại học Dược Hà Nội

Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương

Từ khóa: Định lượng đồng thời, rupatadin, methylparaben, propylparaben, siro, RP-HPLC.

1. Đặt vấn đề

Rupatadin là thuốc kháng histamin H1 thế hệ 2 có hiệu quả trong việc điều trị dứt điểm các triệu chứng do dị ứng gây ra. Hoạt chất này thường được sử dụng phổ biến cho trẻ em dưới dạng siro để điều trị viêm mũi dị ứng [1]. Siro có ưu điểm là dễ sử dụng cho trẻ em vì thuốc dưới dạng siro đã hòa tan sẵn dược chất và siro là dạng bào chế có thể phối hợp nhiều loại tá dược để che giấu tốt mùi vị khó chịu của nhiều dược chất [2]. Nhưng cũng vì siro là dạng hỗn hợp lỏng nên dễ bị vi khuẩn, nấm, mốc tấn công. Do đó, trong công thức siro thường sử dụng chất bảo quản để ngăn chặn sự xâm nhập và phát triển của các loại vi sinh vật này. Các chất bảo quản nhóm paraben, trong đó hai chất hay được sử dụng trong dược phẩm là methylparaben và propylparaben do có phổ kháng khuẩn rộng trong phạm vi pH rộng, đồng thời cũng có hiệu quả chống nấm men và nấm mốc. Trong các công thức thuốc dùng đường uống, hai chất này thường được dùng kết hợp với nồng độ nằm trong khoảng 0,015 % đến 0,2 % đối với methylparaben và 0,02 % đến 0,06 % đối với propylparaben [3]. Tuy nhiên các tài liệu trong nước và một số tài liệu nước ngoài chúng tôi tham khảo chưa có tài liệu nào công bố về quy trình định lượng đồng thời rupatadin và hai chất bảo quản này.

Nhằm tối ưu hóa phương pháp phân tích trong quá trình kiểm tra chất lượng mẫu siro chứa ba thành phần này, nhóm nghiên cứu đã tiến hành xây dựng và thẩm định quy trình định lượng đồng thời rupatadin và các chất bảo quản methylparaben, propylparaben trong mẫu siro nghiên cứu bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao.

2. Thực nghiệm

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

2.1.1. Thiết bị, dụng cụ

Các thiết bị, dụng cụ đã được hiệu chuẩn, đáp ứng yêu cầu của ISO/IEC 17025 và GLP, bao gồm:

- Hệ thống sắc ký lỏng hiệu năng cao Waters kết nối detector PDA.

- Cột sắc ký Waters Reliant C18 (4,6 x 250 mm, 5 µm)
- Máy đo pH Excellent Mettler Toledo;
- Cân phân tích Mettler MS105, độ chính xác 0,01 mg;
- Các thiết bị, dụng cụ khác: máy lắc siêu âm, các dụng cụ thủy tinh chính xác class A

2.1.2. Chất chuẩn, hóa chất và dung môi

- Chất chuẩn: Rupatadin fumarat ($C_{30}H_{30}ClN_3O_4$), hàm lượng: 100,00 % (nguyên trạng), SKS: Y001922, số lô: Batch 1 của EDQM; methylparaben ($C_8H_8O_3$), hàm lượng 100,03 %, SKS: C0419108.04 và propylparaben ($C_{10}H_{12}O_3$), hàm lượng 100,03 % (nguyên trạng), SKS: C0319138.03 của Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương.

- Hóa chất: Kali dihydrophosphat (PA), acid phosphoric (PA) của Scharlau

- Dung môi: Acetonitril (HPLC) của Merck, nước RO đạt tiêu chuẩn DDVN V của Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương.

2.2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Đối tượng nghiên cứu

- Mẫu siro nghiên cứu chứa rupatadin fumarat 1,28 mg (tương đương với rupatadin (RU) 0,1 mg); methylparaben (MP) 0,9 mg; propylparaben (PP) 0,1 mg và tá dược trong vừa đủ 1 ml.

Để đánh giá ảnh hưởng của nền mẫu cũng như ảnh hưởng của sự có mặt 2 trong 3 chất phân tích đến kết quả định lượng chất phân tích còn lại, nhóm nghiên cứu tiến hành phân tích 04 mẫu placebo với thành phần các mẫu như sau:

- Mẫu PLA: Mẫu giả dược được chuẩn bị như mẫu thử nhưng không có rupatadin fumarat, methylparaben và propylparaben.

- Mẫu PLA-RU: Mẫu giả dược được chuẩn bị như mẫu thử nhưng không có rupatadin fumarat.

- Mẫu PLA-MP: Mẫu giả dược được chuẩn bị như mẫu thử nhưng không có methylparaben.

- Mẫu PLA-PP: Mẫu giả dược được chuẩn bị như mẫu thử nhưng không có propylparaben.

2.2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.2.1. Phương pháp chuẩn bị mẫu [5], [6]

- Dung dịch chuẩn gốc: Pha dung dịch chuẩn gốc rupatadin (0,5 mg/ml), methylparaben (0,45 mg/ml) và propylparaben (0,25 mg/ml) trong pha động.

- Dung dịch chuẩn hỗn hợp: Từ các dung dịch gốc, pha dung dịch hỗn hợp gồm rupatadin 0,05 mg/ml, methylparaben 0,045 mg/ml và propylparaben 0,005 mg/ml.

- Dung dịch thử: Cân chính xác một lượng chế phẩm tương ứng với 2,5 mg rupatadin (khoảng 2,5 ml) cho vào bình định mức 50 ml. Thêm 30 ml pha động, lắc siêu âm trong 10 phút. Để nguội về nhiệt độ phòng rồi thêm pha động vừa đủ đến vạch, lắc kĩ. Lọc qua màng lọc 0,45 μ l. Sử dụng dịch lọc.

2.2.2.2. Phương pháp phân tích

Sử dụng sắc ký lỏng pha đảo với cột sắc ký C18 (250 x 4,6 mm; 5 μ m) và pha động hỗn hợp acetonitril và dung dịch đệm.

Kiểm tra tính thích hợp của hệ thống: Tiến hành sắc ký với dung dịch chuẩn hỗn hợp; yêu cầu độ phân giải giữa các pic lớn hơn 1,5; độ lệch chuẩn tương đối của diện tích mỗi pic từ 6 lần tiêm lặp lại dung dịch chuẩn hỗn hợp không được lớn hơn 2,0 % [4].

Tiêm 20 μ l các dung dịch placebo, dung dịch chuẩn hỗn hợp và dung dịch thử vào hệ thống sắc ký. Ghi lại sắc ký đồ và đáp ứng của các pic chính trong dung dịch chuẩn hỗn hợp và dung dịch thử.

3. Kết quả và bàn luận

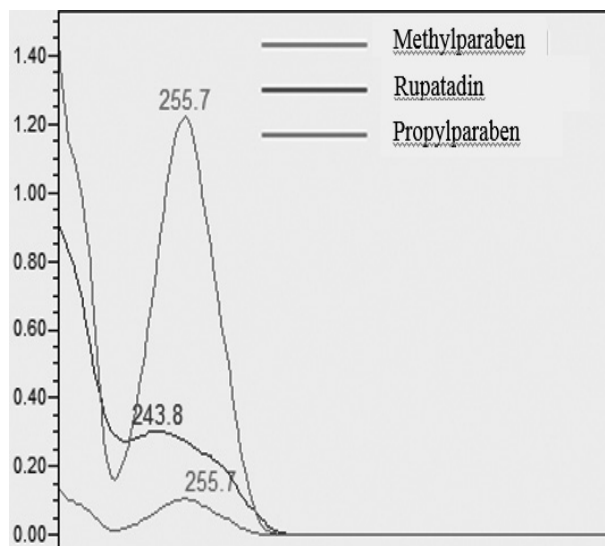
3.1. Lựa chọn điều kiện sắc ký

3.1.1. Lựa chọn cột sắc ký

Qua nghiên cứu các tài liệu về định lượng rupatadin và 2 chất bảo quản paraben, cùng các đặc điểm về tính chất lý hóa và công thức cấu tạo của các chất, với điều kiện hiện có của phòng thí nghiệm, tiến hành khảo sát với cột sắc ký C18 (4,6 x 250 mm, 5 μ m) [7], [8].

3.1.2. Lựa chọn bước sóng phát hiện

Thực hiện quét phổ UV mẫu chuẩn đơn của ba chất ở dải bước sóng 200 - 800 nm. Kết quả thu được như sau:



Hình 1. Hình ảnh quét phổ dung dịch chuẩn của mẫu rupatadin, methylparaben và propylparaben

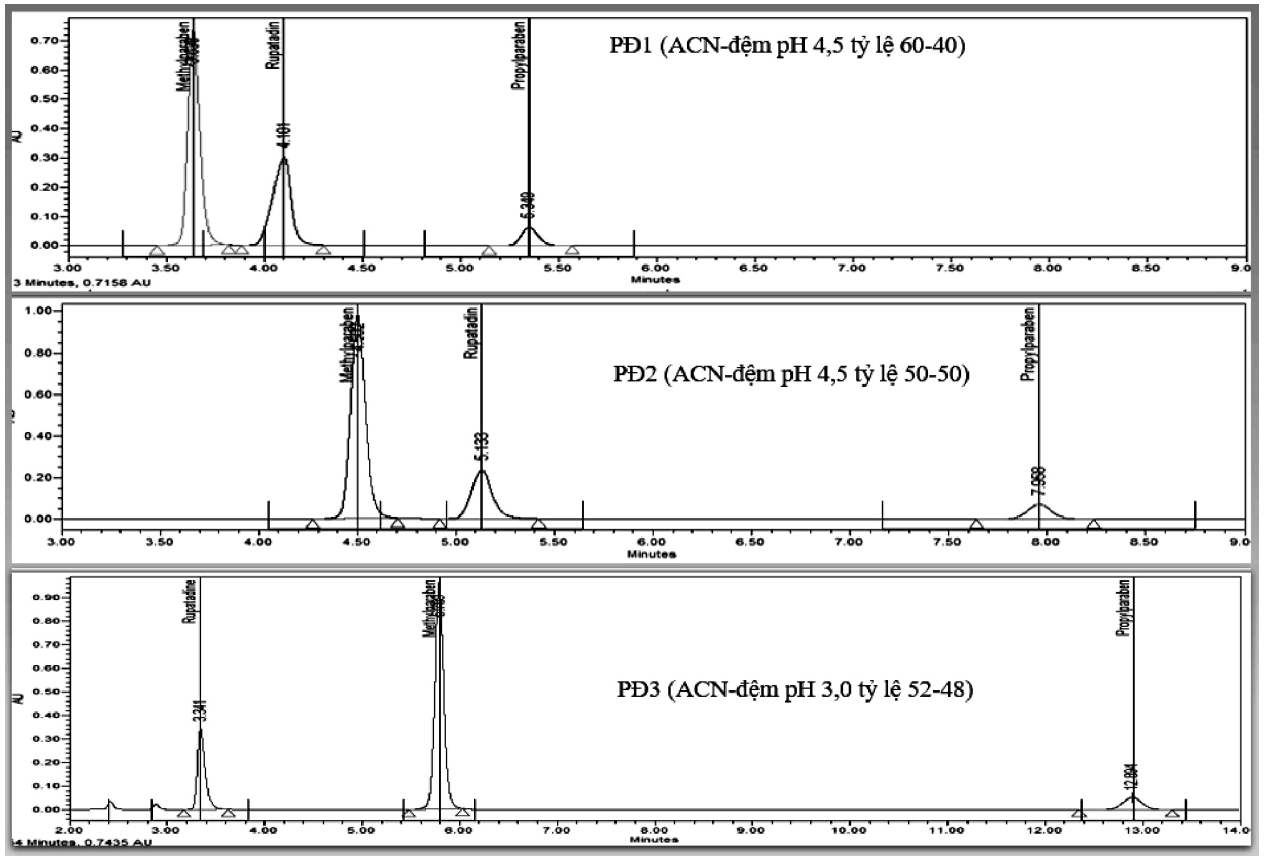
Kết quả cho thấy cả hai chất methylparaben và propylparaben đều có cực đại hấp thụ tại bước sóng khoảng 255 nm, trong khi đỉnh cực đại hấp thụ của rupatadin ở 244 nm. Tuy nhiên, trong công thức tỷ lệ propylparaben nhỏ nên để đảm bảo khoảng tuyến tính của propylparaben ưu tiên chọn bước sóng 255 nm để có thể định lượng đồng thời 3 chất.

3.1.3. Lựa chọn pha động

Dựa vào tính chất phân cực log P (5,37; 1,87; 2,93) tương ứng với rupatadin, methylparaben và propylparaben, lựa chọn sắc ký phân bố pha đảo để phân tích. Bên cạnh đó, giá trị pKa của rupatadin, methylparaben và methylparaben lần lượt là 7,19; 8,17; 8,35, do đó chúng tôi lựa chọn pha động có thành phần đệm pH < 5,0 để rupatadin chuyển dạng ion (BH⁺), sẽ có thời gian lưu ngắn hơn so với dạng tồn tại phân tử (B). Đồng thời ở pH đó, methylparaben và propylparaben tồn tại dưới dạng phân tử (HA) trong dung dịch, có thể được lưu giữ và rửa giải theo thời gian khác nhau [5].

Qua các tài liệu nghiên cứu được kết hợp với sự phổ biến của hóa chất, dung môi hiện có của phòng thí nghiệm, nhóm nghiên cứu lựa chọn pha động gồm acetonitril và đệm phosphat để tiến hành khảo sát ban đầu [7], [8]. Kết quả thu được như hình 2.

Kết quả khảo sát pha động gồm ACN và dung dịch đệm phosphat pH 4,5 ở hai tỷ lệ thể tích tương ứng là 60 - 40 (pha động 1) và 50 - 50 (pha động 2) cho thấy với pha động 2, hình dạng các pic cân đối hơn, các pic tách xa nhau hơn (Bảng 1).



Hình 2. Kết quả khảo sát lựa chọn pha động

Bảng 1: Kết quả độ phân giải giữa các pic khi thay đổi hệ pha động

Pha động	Methylparaben	Rupatadin	Propylparaben
ACN – Đệm pH 4,5 (60 - 40)	-	2,6	4,5
ACN – Đệm pH 4,5 (50 - 50)	-	3,8	10,9
ACN – Đệm pH 3,0 (52 - 48)	15,8	-	26,7

Tuy nhiên, trong quá trình phân tích mẫu lặp lại với pha động 2 xuất hiện hiện tượng trôi thời gian lưu của rupatadin. Vì vậy pha động 2 không phù hợp để tiếp tục nghiên cứu.

Điều chỉnh pH của dung dịch đệm xuống 3,0 để ion hóa hoàn toàn rupatadin, tiến hành khảo sát tiếp với pha động 3 gồm ACN và dung dịch đệm phosphat (KH_2PO_4 0,025M, pH 3,0) tỷ lệ thể tích tương ứng 52 : 48. Kết quả cho thấy với pha động này, pic rupatadin xuất hiện trước, tách xa các pic methylparaben và propylparaben hơn các hệ pha động còn lại.

Sau khi khảo sát và đánh giá các chương trình, chúng tôi lựa chọn chương trình phân tích là:

Điều kiện sắc ký:

- Máy sắc ký lỏng hiệu năng cao Waters kết nối detector PDA
- Cột sắc ký Waters Reliant C_{18} (4,6 mm x 250 mm, 5 μm)
- Pha động: Acetonitril : đệm phosphat (KH_2PO_4 0,025M, pH 3,0) tỷ lệ thể tích tương ứng 52 : 48 (tt : tt).
- Tốc độ dòng: 1,0 ml/phút
- Thể tích tiêm: 20 μl
- Nhiệt độ cột: 30 °C
- Bước sóng phát hiện: 255 nm

3.2. Thẩm định phương pháp phân tích

Theo hướng dẫn của ICH và AOAC, phương pháp phân tích cần được thẩm định các chỉ tiêu sau: Độ đặc hiệu, độ thích hợp hệ thống, độ tuyến tính, độ chính xác, độ đúng và khoảng xác định.

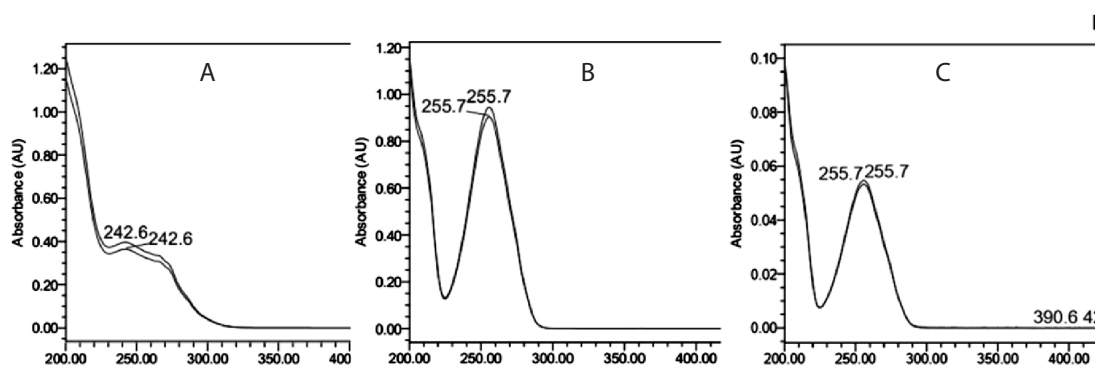
3.2.1. Độ đặc hiệu

Tiến hành tiêm vào hệ thống sắc ký lần lượt các dung dịch placebo; dung dịch thử và dung dịch chuẩn hỗn hợp. Kết quả được trình bày ở dưới đây.

Bảng 1. Kết quả đánh giá độ đặc hiệu dung dịch placebo, chuẩn, thử

Loại mẫu / Thời gian lưu	PLA	PLA-RU	PLA-MP	PLA-PP	Thử	Chuẩn hỗn hợp
Rupatadin	-	-	3,303	3,303	3,302	3,302
Methylparaben	-	5,789	-	5,788	5,789	5,788
Propylparaben	-	12,894	12,892	-	12,894	12,892

So sánh phổ UV của các pic thu được trên sắc ký đồ của dung dịch thử với phổ UV của các pic thu được trên sắc ký đồ của dung dịch chuẩn hỗn hợp, thu được kết quả như sau:



Hình 3. Kết quả chồng phổ định tính 3 chất rupertadin (A), methylparaben (B) và propylparaben (C) giữa mẫu chuẩn và mẫu thử

Kết quả cho thấy:

- Trên sắc ký đồ của dung dịch PLA không xuất hiện các pic tại thời gian lưu tương ứng với các pic rupertadin, methylparaben và propylparaben trên sắc ký đồ của dung dịch chuẩn hỗn hợp.

- Trên sắc ký đồ của dung dịch PLA-RU xuất hiện pic có thời gian lưu tương ứng với pic rupertadin nhưng không xuất hiện các pic tại thời gian lưu tương ứng với các pic methylparaben và propylparaben trên sắc ký đồ của dung dịch chuẩn hỗn hợp.

- Trên sắc ký đồ của dung dịch PLA-MP xuất hiện pic có thời gian lưu tương ứng với pic methylparaben nhưng không xuất hiện các pic tại thời gian lưu tương ứng với các pic rupertadin và propylparaben trên sắc ký đồ của dung dịch chuẩn hỗn hợp.

- Trên sắc ký đồ của dung dịch PLA-PP xuất hiện pic có thời gian lưu tương ứng với pic propylparaben nhưng

không xuất hiện các pic tại thời gian lưu tương ứng với các pic rupertadin và methylparaben trên sắc ký đồ của dung dịch chuẩn hỗn hợp.

- Trên sắc ký đồ của dung dịch thử xuất hiện các pic có thời gian lưu và phổ UV lần lượt tương ứng thời gian lưu và phổ UV của các pic rupertadin, methylparaben, propylparaben trên sắc ký đồ của dung dịch chuẩn hỗn hợp.

Vì vậy, phương pháp có tính đặc hiệu để định tính và định lượng đồng thời rupertadin, methylparaben và propylparaben trong chế phẩm siro.

3.2.2. Độ thích hợp hệ thống

Tiêm lặp lại 06 lần chuẩn hỗn hợp vào hệ thống sắc ký, dung dịch chuẩn hỗn hợp chứa rupertadin, methylparaben và propylparaben với nồng độ tương ứng là 0,05 mg/ml, 0,045 mg/ml và 0,005 mg/ml theo điều kiện sắc ký đã được lựa chọn ở trên. Kết quả đánh giá độ thích hợp của hệ thống được trình bày ở bảng dưới đây:

Bảng 2. Kết quả đánh giá độ thích hợp hệ thống

	Chuẩn hỗn hợp								
	Pic rupatadin			Pic methylparaben			Pic propylparaben		
	T _R (phút)	S (mAU.s)	R _s	T _R (phút)	S (mAU.s)	R _s	T _R (phút)	S (mAU.s)	R _s
TB ± SD (n = 6)	3,303 ± 0,002	1865010 ± 1601	-	5,786 ± 0,001	5951759 ± 2554	15,8 ± 0,1	12,888 ± 0,003	753116 ± 2633	26,7 ± 0,0
RSD (%) (n = 6)	0,05	0,09	-	0,02	0,04	0,33	0,02	0,35	0,00

Kết quả cho thấy:

+ Độ lệch chuẩn tương đối (RSD) của thời gian lưu của các pic trong khoảng từ 0,02 % đến 0,05 % ($\leq 1,0$ %) và RSD diện tích của các pic nằm trong khoảng từ 0,04 % đến 0,35 % ($\leq 2,0$ %).

+ Các pic tách xa nhau, độ phân giải giữa các pic Rupatadin, Methylparaben, Propylparaben lần lượt là 15,8 và 26,7 ($> 1,5$)

Điều đó chứng tỏ hệ thống sắc ký đảm bảo được tính thích hợp của hệ thống đối với việc phân tích định tính

và định lượng đồng thời rupatadin, methylparaben và propylparaben.

3.2.3. Độ tuyến tính

Từ các dung dịch chuẩn gốc rupatadin (0,5 mg/ml), methylparaben (0,45 mg/ml) và propylparaben (0,05 mg/ml), pha loãng bằng pha động để thu được 05 dung dịch chuẩn hỗn hợp có nồng độ các chất chính xác khoảng 50 %, 80 %, 100 %, 120 %, 150 % so với nồng độ định lượng. Tiến hành sắc ký theo điều kiện phân tích đã chọn. Kết quả được trình bày trong Bảng 3.

Bảng 3. Kết quả đánh giá độ tuyến tính

Chất phân tích	Khoảng nồng độ tuyến tính ($\mu\text{g/ml}$)	Phương trình đường chuẩn	Hệ số tương quan tuyến tính r	%Hệ số chặn Y%
Rupatadin	25,0 – 75,0	$Y = 36954,51 X + 28390,94$	0,9990	1,50
Methylparaben	22,5 – 67,5	$Y = 133902,51 X - 27828,12$	0,9989	0,47
Propylparaben	2,5 – 7,5	$Y = 154154,03 X - 10364,4$	0,9998	1,36

Kết quả cho thấy có sự tương quan tuyến tính chặt chẽ giữa diện tích pic và nồng độ từng chất phân tích trong khoảng nồng độ khảo sát với hệ số tương quan $r > 0,998$.

3.2.4. Độ chính xác

Tiến hành phân tích trên 12 mẫu thử độc lập, với 02 kiểm nghiệm viên khác nhau, ở 02 ngày khác nhau (mỗi kiểm nghiệm viên phân tích 06 mẫu độc lập). Kết quả được trình bày trong Bảng 4.

Bảng 4. Kết quả đánh giá độ chính xác

	% RU so với nhãn		% MP so với nhãn		% PP so với nhãn	
	KNV1	KNV2	KNV1	KNV2	KNV1	KNV2
TB ± SD (n = 6)	100,9 ± 1,5	101,9 ± 1,5	103,2 ± 1,6	103,2 ± 1,4	97,8 ± 1,3	98,6 ± 1,2
RSD (%) (n = 6)	1,44	1,43	1,56	1,35	1,29	1,24
TB ± SD (n = 12)	101,4 ± 1,5		103,2 ± 1,4		98,2 ± 1,2	
RSD (%) (n = 12)	1,45		1,39		1,26	

RU: Rupatadin; MP: Methylparaben; PP: Propylparaben

Kết quả ở Bảng 4 cho thấy phương pháp đạt yêu cầu về độ chính xác đối với cả 3 hoạt chất (RSD < 2,0 %).

3.2.5. Độ đúng

Chuẩn bị các mẫu tự tạo bằng cách thêm chính xác lượng chất chuẩn của chất cần phân tích vào các mẫu placebo. Lượng chất chuẩn thêm vào tương ứng với các mức 70 %, 100 % và 130 % so với nồng độ định lượng,

ở mỗi mức nồng độ chuẩn bị 03 mẫu độc lập.

Tiến hành xử lý mẫu và sắc ký theo các điều kiện đã chọn. Tính lượng thu hồi của các chất phân tích. Kết quả được trình bày trong Bảng 6 - 8.

Bảng 5. Kết quả đánh giá độ đúng của phương pháp

% thêm vào	% thu hồi RU	% thu hồi MP	% thu hồi PP
70 % (n = 3)	101,2 ± 0,2	101,6 ± 0,4	101,4 ± 0,5
100 % (n = 3)	101,4 ± 0,6	100,9 ± 1,5	100,3 ± 0,6
130 % (n = 3)	101,0 ± 0,6	101,4 ± 1,0	101,0 ± 0,6
TB ± SD (%) (n = 9)	101,2 ± 0,4	101,3 ± 1,0	100,9 ± 0,7
RSD (%) (n = 9)	0,44	0,95	0,67

Kết quả ở trên cho thấy, phương pháp có độ đúng cao với phần trăm tỷ lệ thu hồi ở mỗi mức nồng độ đều nằm trong khoảng từ 98,0 - 102,0 % và RSD < 2,0 %. Do đó, đảm bảo cho việc định lượng rupatadin, methylparaben và propylparaben trong chế phẩm.

3.2.6. Khoảng xác định

Từ kết quả khảo sát độ đúng và độ tuyến tính, suy ra khoảng xác định của quy trình định lượng đã xây dựng là từ 0,035 – 0,065 mg/ml rupatadin; 0,0315 – 0,0585 mg/ml methylparaben và 0,0035 – 0,0065 mg/ml propylparaben.

4. Kết luận

Qua thực nghiệm, chúng tôi đã xây dựng được phương pháp định lượng đồng thời rupatadin, methylparaben và propylparaben trong siro bằng phương pháp HPLC với điều kiện sắc ký đơn giản, dễ dàng, tiết kiệm và có thể áp dụng rộng rãi ở các phòng thí nghiệm có máy HPLC. Phương pháp được thẩm định đạt yêu cầu theo hướng dẫn của ICH [9], có độ chính xác cao, độ đúng tốt, khoảng tuyến tính rộng để có thể phân tích đồng thời rupatadin, methylparaben và propylparaben trong các chế phẩm siro đang lưu hành trên thị trường.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. M.Sudhakara Rao, D.Dwarakanatha Reddy, P.S.N. Murthy (2009), “Rupatadine: pharmacological profile and its use in the treatment of allergic rhinitis”, *Indian J Otolaryngol Head Neck Surg*, 61(4), pp. 320-332.
2. Trường Đại học Dược Hà Nội (2021), *Bào chế và sinh dược học*, tập 1, Nhà xuất bản Y học, tr.60.
3. Rowe RC, Sheskey PJ, Cook WG, Fenton ME (2012), *Handbook of pharmaceutical excipients*.
4. Hội đồng Dược điển Việt Nam (2017), *Dược điển Việt Nam V*.
5. Popovic-Nikolic, M. R.; Popovic, G. V.; Stojilkovic, K.; Agbaba, D. D. (2018), “Acid–Base Equilibria of Rupatadine Fumarate in Aqueous Media”, *J. Chem. Eng. Data*, 63(8), pp. 3150-3156.
6. Scientific Committee on Consumer Safety (2021), *Opinion on Propylparaben*, pp.15.
7. Trương Quốc Kỳ; Võ Hoàng Nam; Nguyễn An Công; Đặng Minh Đức (2019), “Xây dựng quy trình định lượng đồng thời methylparaben và propylparaben trong vỏ nang mềm bằng phương pháp HPLC với đầu dò PDA”, *Tạp chí Y học Hồ Chí Minh*, tập 23, số 3, tr. 1-6
8. Rele, R. V.; Mali, R. N. (2016), “New Validated RP-HPLC Method for Quantification of Rupatadine Fumarate Impurities in Solid Dosage Form Supported By Forced Degradation Studies”, *Der Pharmacia Lettre*, 8(14), pp.66-72
9. ICH (2018), *Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology*, Q2R1

SUMMARY

A reversed-phase HPLC method for simultaneous determination of rupatadin, methylparaben and propylparaben in the studied syrup was introduced. The method was carried out on a C18 column (4.6 mm x 250 mm, 5 μ m), using an acetonitrile - phosphate buffer pH 3.0 mixture (52/48, v/v) as mobile phase. The mobile phase flow rate was maintained at 1.0 mL per minute. Injection volume was 20 μ L. The UV detector was set at 255 nm. The developed method has been illustrated to satisfy the requirements of specificity, system suitability, linearity, accuracy, precision (repeatability and intermediate precision) according to ICH-(Q2R1) guideline. The validation results indicated that the developed procedure was suitable for simultaneous determination of rupatadin, methylparaben and propylparaben in the studied syrup and may be applied in other similar products..

(Ngày nhận bài: 06/10/2022; Ngày phản biện: 27/10/2022; Ngày duyệt đăng: 05/12/2022)

XÂY DỰNG QUI TRÌNH ĐỊNH LƯỢNG KETAMIN VÀ MỘT SỐ THUỐC DÙNG LÀM CHẤT ĐỘN TRONG NƯỚC THẢI BẰNG GC-MS/MS NHẪM TRUY NGUYÊN CƠ SỞ SẢN XUẤT KETAMIN

TRƯƠNG MẠNH CƯỜNG

NGUYỄN XUÂN TRƯỜNG

Viện Khoa học hình sự

NGUYỄN THỊ THÙY LINH, VŨ NGÂN BÌNH, ĐẶNG THỊ NGỌC LAN,

TRẦN NGUYỄN HÀ, PHẠM THỊ THANH HÀ✉

Trường Đại học Dược Hà Nội

Từ khóa: ketamin, chất độn, ma túy, GC-MS/MS, định lượng

1. Đặt vấn đề

Ma túy từ nhiều thế kỷ nay đã trở thành tệ nạn. Ở Việt Nam đây vẫn là vấn đề nhức nhối, là hiểm họa lớn cho toàn xã hội. Trong những năm gần đây, Ketamin (KET) là một loại ma túy được các đối tượng mua bán, vận chuyển và tàng trữ với số lượng vô cùng lớn, được các con nghiện ưa chuộng sử dụng. Ngày 15/08/2019 tại TP Quy Nhơn, tỉnh Bình Định đã phát hiện một số lượng lớn dung môi, hoá chất, thiết bị thí nghiệm và dụng cụ được tập kết tại đây. Đến ngày 04/3/2020, Cục C04 phối hợp với Kiểm sát viên Vụ 4, Viện Kiểm sát nhân dân tối cao tiếp tục kiểm tra kho và giám định toàn bộ hoá chất tại kho đều là các tiền chất thiết yếu dùng để sản xuất ma túy tổng hợp, trên các dụng cụ thu giữ đều có dấu vết của các chất trung gian hình thành trong quá trình sản xuất ma túy [1]. Chất độn trong sản xuất ma túy (còn được gọi là chất pha loãng) có thể là các chất không có hoạt tính sinh học được thêm vào để tăng khối lượng (dimethylsulfon, isopropylbenzen,...) hoặc được thêm vào với mục đích tăng cường tác dụng của ma túy (cafein, procain, diphenhydramin, clopheniramin...) [2]. Tội phạm ma túy ngày càng tăng và hoạt động ngày càng tinh vi hơn nên ngoài việc điều tra, khai thác tội

phạm qua trình sát cần thiết phải có các nghiên cứu để giám sát việc sản xuất ma túy của các cơ sở sản xuất trái phép thông qua việc rò rỉ các hóa chất trong nước thải, giúp có thêm cơ sở để phát giác tội phạm sớm hơn. Trên thế giới, các phương pháp phân tích các ma túy và các chất liên quan chủ yếu trên các thiết bị phân tích hiện đại với độ nhạy cao như LC-MS/MS [4,5,6], GC-MS/MS [3]. Cung cấp thêm công cụ hỗ trợ cho công tác điều tra, tố giác tội phạm ma túy qua nước thải của cơ sở sản xuất ma túy là cần thiết nhưng cho đến nay chưa có công trình nào trong nước nghiên cứu về phân tích các chất độn và KET trong các nguồn nước thải, do vậy nghiên cứu này được triển khai.

2. Thực nghiệm

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

2.1.1. Thiết bị, dụng cụ

- Thiết bị phân tích: Hệ thống GC-MS/MS Agilent 7890A (Mỹ), Cột sắc ký DB1-MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 mm) (Agilent, Mỹ).

- Thiết bị phụ trợ: Cân phân tích A&D, Model GR-200 (Nhật), máy ly tâm Kubota 6500 (Nhật), máy lắc xoay Labinco L46 (Hà Lan), phễu lọc Buchner, màng lọc

cellulose 0,45 mm, tủ lạnh âm sâu (-86 °C) Panasonic (Nhật), máy đo pH Eutech Instruments (Singapore), máy cô nito Hanon 200 (Trung Quốc).

2.1.2. Hóa chất, chất chuẩn

- Chất đối chiếu: Ketamin.HCl (UNX 2028, Lot No18570, lọ 20 mg), Isopropylbenzylamin, Dimethyl sulfon (98,0 %) (Viện khoa học hình sự, Bộ Công An), Cafein (99,57 %, SKS 0316099.03, lọ 200 mg); Diphenhydramin. HCl (99,9 % C₁₇H₂₁NO.HCl nguyên trạng, SKS C0220120.02, lọ 200 mg, Clopheniramin maleat (SKS 0418032.03, lọ 200 mg) (Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương), Procain. HCl (Pro-638-HC-20, Lot 638.1B0.1, Lipromed ACT, CH-4144 ARLSHEIM, SWITZERLAND).

- Hóa chất tinh khiết phân tích: Acetonitril (LC-MS, Mỹ), Amoni acetat (Đức), Methanol (Pháp), Amoni acetat (PA - Merck), Acid acetic (PA - Merck), Acid formic (PA- Merck), Amoni format (PA - Merck), n-hexan (PA- Mỹ), Diethyl ether (PA- Mỹ), Ethyl acetat (PA- Mỹ), Dicloromethan (PA - Merck), Chloroform (PA - Merck).

2.2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

Đối tượng nghiên cứu

+ Mẫu nền: Nước sông hồ không có các chất cần phân tích (Hồ Thiên Quang, Hồ Công viên thống nhất, Hồ công viên Yên sở, Hồ công viên Nghĩa Đô)

Thời gian (phút)	0 - 1	1 - 12,2	12,2 - 13,2	13,2 - 16,5	16,5 - 17,5
Nhiệt độ (°C)	90	90 -180	180	180 - 280	280

- Tiêm mẫu : thể tích tiêm 1 µL; chế độ tiêm mẫu chia dòng, tỷ lệ 9 : 1

Nhiệt độ buồng hoá hơi 260 °C

Điều kiện MS

Nhiệt độ nguồn 230 °C Nhiệt độ quad 1: 150 °C

Dòng filament 35 mA Nhiệt độ quad 2: 150 °C

+ Mẫu thử: Nước thải thu thập ở các cơ sở nghi ngờ sản xuất ma túy tổng hợp. Mẫu do cơ quan chức năng cung cấp, hoặc mẫu nước thử tự tạo, được thêm các chất chuẩn được nghiên cứu.

+ Mẫu chuẩn: chuẩn gốc Ketamin (KET), Cafein (CAF), Procain (PRO), Diphenhydramin (DFH), Isopropylbenzyl (IPB), Clopheniramin (CLO) 1000 µg/mL: cân chính xác một lượng chất chuẩn tương ứng vào bình định mức 10,0 ml, hòa tan và định mức vừa đủ bằng methanol, bảo quản ở nhiệt độ 2 - 8 °C. Sau đó pha loãng bằng MeOH để được dung dịch chuẩn trung gian khoảng 20000 - 10000 - 5000 - 2000 - 1000 - 500 -100 - 50 - 10 - 5 - 1 - 0,5 ppb.

3. Kết quả và bàn luận

3.1. Xây dựng quy trình định lượng bằng GC-MS/MS

3.1.1. Lựa chọn điều kiện GC và khối phổ MS/MS

Chuẩn bị dung dịch chuẩn đơn của KET và 6 chất độn với nồng độ khoảng 20 ppm được tiêm vào hệ thống GC-MS/MS.

Điều kiện GC

+ Cột DB1-MS 30 m, id 0,25 mm x 0,25 mm (Agilent) là cột phổ biến cho GC, pha tĩnh không phân cực, chịu được nhiệt độ cao.

+ Pha động: Khí mang: He; Tốc độ dòng 1,2 mL/phút

+ Chương trình gradient nhiệt độ:

Khảo sát điều kiện khối phổ qua 3 bước: Lựa chọn mảnh mẹ sử dụng chế độ Scan, Lựa chọn mảnh con sử dụng chế độ Product ion, Lựa chọn chế độ MRM. Các điều kiện phân mảnh ion và năng lượng bắn phá (CE) được trình bày ở bảng 1.

Bảng 1. Các điều kiện khối phổ cho mảnh con định lượng và định tính

TT	Tên chất	Mảnh mẹ	Mảnh con định lượng		Mảnh con định tính	
			m/z	CE (v)	m/z	CE (V)
1	KET	180	116	70	144	20
2	CAF	109	55	70	81	15
3	IPB	91	65	70	41	25
4	PRO	86	58	70	43	20
5	DFH	73	44	70	58	15
6	CLO	203	167	70	125	15
7	DMS	79	48	70	51	25

3.1.2. Khảo sát quy trình xử lý mẫu

Chất gây nghiện KET và các chất độn đều có bản chất là các base yếu vì vậy trong các nghiên cứu trước đây, các tác giả thường tiến hành acid hóa mẫu thử sau khi thu mẫu đến pH 2 để tăng độ ổn định của các đối tượng này.

Nền mẫu nước thải thường phức tạp, thay đổi tùy vào đặc điểm, thói quen sinh hoạt khu dân cư. Qua tham khảo một số nghiên cứu trước đây, quy trình xử lý mẫu được dự kiến gồm quy trình xử lý sơ bộ, và quy trình chiết lỏng - lỏng (LLE).

Xử lý sơ bộ

+ Các mẫu nước thải thu thập được acid hóa ngay bằng dung dịch HCl tới pH 2 - 3.

+ Bảo quản ở tủ lạnh sâu tới khi xử lý mẫu.

+ Khi xử lý mẫu, mẫu thử lấy ra được rã đông ở nhiệt độ phòng, lắc đều.

+ Ly tâm 5000 vòng/ phút trong 5 phút để lắng tạp thô.

+ Lọc lớp dịch trong phía trên qua giấy lọc cellulose.

Quy trình LLE xử lý mẫu nước thải được xây dựng như sau:

+ Lấy 100 ml dịch lọc nước thải và thêm vào một lượng NaCl tương ứng sao cho nồng độ NaCl 0,01 M, khuấy đều để hòa tan. Sau đó chỉnh pH của dung dịch nước thải bằng dung dịch NH₄OH đặc sao cho pH = 10.

+ Lấy 10,0 ml dung dịch nước thải vào ống ly tâm bằng thủy tinh có nút mài, lắc đều.

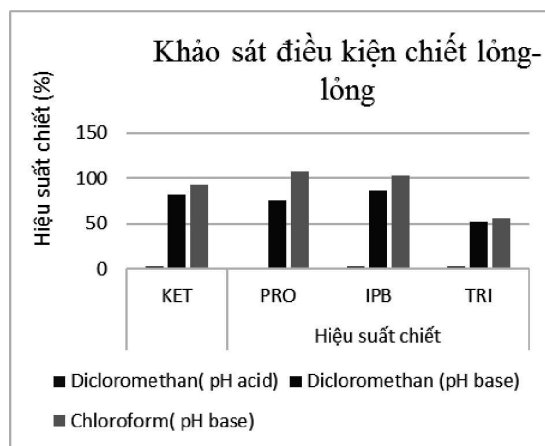
+ Thêm 10 ml chloroform, lắc xoáy 5 phút.

+ Hút 2,0 ml phần dung môi chloroform vào ống nghiệm khác, cô dưới luồng khí nitơ ở nhiệt độ phòng. Hòa tan cân bằng 1,0 ml MeOH, lắc xoáy 1 phút và chạy sắc ký.

+ Lấy 100 ml dịch lọc.

Quy trình chiết lỏng - lỏng (LLE)

Nhóm nghiên cứu đã tiến hành khảo sát với nhiều dung môi chiết như: n-hexan, dicloromethan, chloroform, ethyl acetat và diethyl ete và môi trường chiết khác nhau (pH acid và base). Tiến hành Chiết lỏng- lỏng, tiêm sắc ký và so sánh diện tích của hỗn hợp các chất chuẩn cùng nồng độ 100 ppb trong MeOH thì kết quả nhận thấy: với dung môi dicloromethan và chloroform cho tỷ lệ thu hồi của các chất phân tích cao hơn hẳn so với 3 dung môi còn lại và hiệu suất chiết ở dung môi chloroform cao hơn dung môi dicloromethan. Mặt khác, phần lớn các chất phân tích đều có tính base yếu nên khi chiết ở môi trường acid, các chất phân ly thành ion nên chuyển sang dung môi hữu cơ ít nên hiệu suất chiết sẽ thấp. Chiết lỏng - lỏng trong môi trường base thì tỷ lệ thu hồi các chất phân tích cao hơn nhiều so với môi trường acid (do các chất tồn tại dưới dạng phân tử). Vì vậy lựa chọn dung môi chiết là Chloroform và chiết ở môi trường pH = 10 (Hình 1).



Hình 1. Khảo sát điều kiện LLE

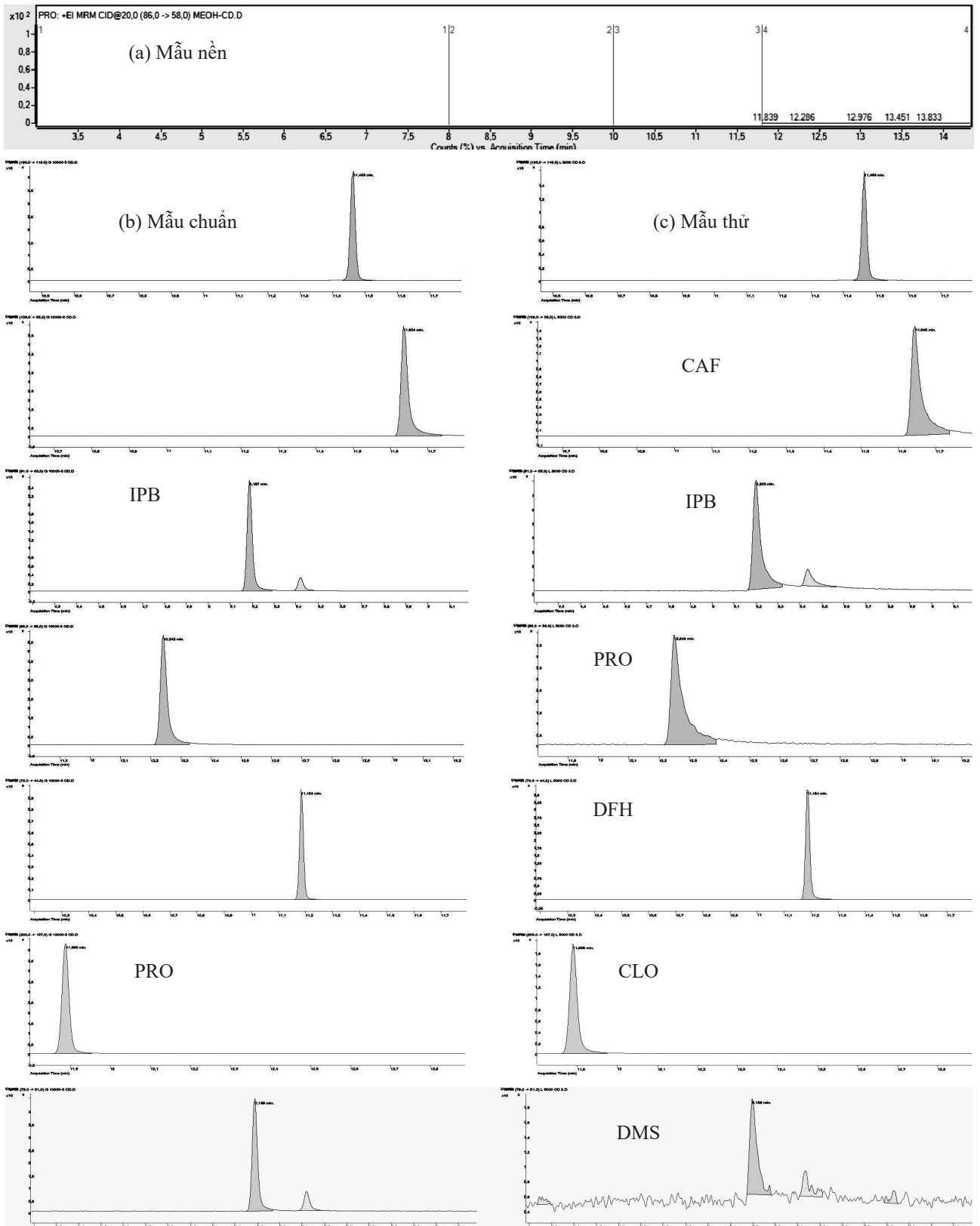
3.2. Kết quả thẩm định phương pháp phân tích

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

Tiến hành chạy sắc ký 6 lần hỗn hợp chuẩn có nồng độ là 500 ppb. Tiến hành sắc ký với điều kiện đã khảo sát, ghi lại thời gian lưu, diện tích pic tương ứng. Kết quả độ lệch chuẩn của thời gian lưu ($\leq 2\%$), diện tích pic ($\leq 5\%$) của các chất đều nằm trong giới hạn cho phép, cho thấy các điều kiện sắc ký đã lựa chọn và hệ thống GC-MS/MS sử dụng phù hợp và ổn định cho phép phân tích KET và 6 chất độn.

3.2.2. Độ chọn lọc của phương pháp

Tiến hành phân tích mẫu nền nước thải không có các đối tượng phân tích, mẫu nền thêm chuẩn và các mẫu chuẩn. Các sắc đồ được trình bày trong hình 2.



Hình 2. Độ chọn lọc định lượng KET và chất độn bằng GC-MS/MS với các sắc đồ và phổ khối của (a) mẫu nền, (b) mẫu chuẩn và (c) mẫu thử được xử lý bằng LLE

Nhận xét: Trên sắc ký đồ của mẫu nền, không xuất hiện các pic tương ứng với thời gian lưu của các pic trong mẫu chuẩn, và mẫu thử (mẫu nền thêm chuẩn) cho các pic có thời gian lưu trùng với thời gian lưu của của các pic trên sắc ký đồ mẫu chuẩn.

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

Tiến hành thêm chuẩn vào mẫu nền không chứa phân tích sao cho mức nồng độ các chất giảm dần cho tới khi không phát hiện được pic. Sau đó tiến hành xử lý và phân tích theo quy trình đã xây dựng. Kết quả LOD và LOQ được thể hiện ở bảng 2.

3.2.4. Khoảng nồng độ tuyến tính

Tiến hành chuẩn bị một dãy dung dịch chuẩn hỗn hợp của KET và 6 chất độn với dãy nồng độ như sau: KET (8,8 - 17684,3 ppb), cafein (495 - 19800 ppb), procain (480 - 19200 ppb); Isopropylbenzyl amin (54,5 - 21800 ppb); clopheniramin (50,5 - 20200 ppb); Diphenhydramin (10,2 - 20400 ppb); Dimethyl sunfon (550 - 22000 ppb). Tiến hành sắc ký với điều kiện đã khảo sát. Ghi lại tín hiệu pic và tiến hành xây dựng mối tương quan giữa nồng độ và diện tích tương ứng. Kết quả khảo sát sự tương quan giữa nồng độ và diện tích được ghi lại ở bảng 2.

Bảng 2. Khoảng tuyến tính, LOD, LOQ của KET và chất độn bằng GC-MS/MS

KET, Phương trình hồi quy: $y = 7,9295x - 3042,8$; $R^2 = 0,9862$									KET	S/N	
Nồng độ (ppb)	8,8	44	88	442	884	1768	8842	17684	LOD (ppb)	4,4	5,09
Diện tích pic	31	141	283	1559	3713	7921	54045	143967	LOQ (ppb)	8,8	9,63
Cafein, Phương trình hồi quy: $y = 11,921x + 8330,8$; $R^2 = 0,9919$									CAF	S/N	
Nồng độ (ppb)	495	990	1980	9900	19800				LOD (ppb)	99	5,6
Diện tích pic	3058	6948	13940	94782	234985				LOQ (ppb)	495	9,6
Procain, Phương trình hồi quy: $y = 2,0862x - 2983,7$; $R^2 = 0,9876$									PRO	S/N	
Nồng độ (ppb)	480	960	1920	4800	19200				LOD (ppb)	96	3,3
Diện tích pic	131	392	925	2660	38052				LOQ (ppb)	480	12,0
Dimethyl sunfon, Phương trình hồi quy: $y = 1,0013x - 834,85$; $R^2 = 0,9907$									DMS	S/N	
Nồng độ (ppb)	550	1100	2200	11000	22000				LOD (ppb)	550	4,96
Diện tích pic	248	581	1300	8666	21927				LOQ (ppb)	1100	16,34
Isopropylbenzyl, Phương trình hồi quy: $y = 56,265x - 27425$; $R^2 = 0,9905$									IPB	S/N	
Nồng độ (ppb)	54,5	109	545	1090	2180	10900	21800		LOD (ppb)	10,9	1,95
Diện tích pic	1224	2445	15360	35551	74962	495075	1249073		LOQ (ppb)	54,5	9,74
Clopheniramin, Phương trình hồi quy: $y = 9,7412x - 5129,80,0634$; $R^2 = 0,988$									CLO	S/N	
Nồng độ (ppb)	50,5	101	505	1010	2020	10100	20200		LOD (ppb)	10,1	3,7
Diện tích pic	187	345	1988	4952	10727	76822	200141		LOQ (ppb)	50,5	14,7
Diphenhydrazin, Phương trình hồi quy: $y = 14,694x - 6355$; $R^2 = 0,9869$									DFH	S/N	
Nồng độ (ppb)	10,2	51	102	510	1020	2040	10200	20400	LOD (ppb)	5,1	4,7
Diện tích pic	94	311	601	3412	7792	17560	116341	307537	LOQ (ppb)	10,2	11,08

Kết quả cho thấy trong các khoảng nồng độ của mỗi chất có sự tương quan tuyến tính tương đối tốt giữa nồng độ và diện tích pic. Như vậy, phương pháp đã đáp ứng được yêu cầu về đường chuẩn và khoảng tuyến tính theo tiêu chuẩn của AOAC.

3.2.5. Độ lặp lại

Độ lặp lại của phương pháp được đánh giá bằng cách phân tích các mẫu nền thêm chuẩn lặp lại 6 lần độc lập ở nồng độ 2000 ppb. Các kết quả trình bày ở bảng 3.

Bảng 3. Độ lặp lại định lượng KET và chất độn bằng GC-MS/MS

Độ lặp lại	TT	KET	CAF	IPB	PRO	DFH	CLO	DMS
Diện tích pic	1	17616	27700	19726	1469	40609	25370	383
	2	21072	34841	22018	1735	49659	32020	346
	3	18112	27786	20725	1413	42386	26865	304
	4	17891	28854	20596	1410	41213	26347	370
	5	18399	30016	20637	1501	42772	27208	390
	6	17890	27228	20725	1349	41613	26073	372
TB		18496	29404	20738	1446	43042	27314	361
RSD %		7,0	9,7	3,5	9,2	7,7	8,8	8,8

Độ lệch chuẩn tương đối của diện tích pic tỷ đối (RSD %) dao động tùy theo từng chất đều nằm trong giới hạn cho phép. Như vậy, phương pháp đáp ứng được yêu cầu về độ lặp lại theo tiêu chuẩn của AOAC.

3.2.6. Độ thu hồi

- Chuẩn bị các lô mẫu trong nền mẫu nước thải không có các đối tượng phân tích, thêm KET và 6 chất độn ở nồng độ 1000 ppb, 2000 ppb, 5000 ppb vào 3 mẫu

độc lập. Tiến hành xử lý mẫu theo quy trình đã xây dựng.

- Xác định nồng độ các chất bằng cách đáp ứng của chuẩn trong các mẫu qua quá trình xử lý mẫu và đáp ứng của chuẩn ở mẫu pha trong MeOH.

Tất cả các lô mẫu được phân tích ở điều kiện sắc ký đã chọn. Kết quả khảo sát tỷ lệ thu hồi của các chất được trình bày ở bảng 4.

Bảng 4. Độ thu hồi định lượng KET và chất độn bằng LLE & GC-MS/MS

Tên chất		Độ thu hồi (%)						
		KET	CAF	IPB	PRO	DFH	CLO	DMS
Ngưỡng nồng độ	TB	101,6	91,8	58,2	76,8	105,9	107,0	37,2
	RSD %	1,1	1,8	1,0	1,6	1,4	1,5	3,1
1000 ppb	TB	92,5	91,7	67,5	50,7	91,6	96,2	39,0
	RSD %	3,9	3,9	9,5	5,0	1,9	2,2	1,6
2000 ppb	TB	102,3	94,9	61,7	54,6	107,4	106,5	40,8
	RSD %	1,4	3,8	6,7	3,6	1,2	2,9	0,7

Kết quả thẩm định cho thấy, tỷ lệ thu hồi của KET và các chất độn tương đối lặp lại, ở mỗi mức nồng độ, giá trị CV độ thu hồi các chất giữa các lần chiết đều nằm trong giới hạn cho phép, tỷ lệ thu hồi các chất hầu hết > 30 %, đáp ứng yêu cầu về độ thu hồi chất phân tích theo tiêu chuẩn của AOAC 2016.

3.3. Bàn luận

Việc sử dụng GC-MS/MS là phương pháp phân tích hiện đại, có độ nhạy cao phù hợp với đối tượng phân tích trong nền mẫu nước thải. KET và các chất độn có thời gian phân tích ngắn (< 13 phút). Mặt khác quy trình xử lý mẫu bằng chiết lỏng - lỏng tiến hành nhanh, giảm chi phí, dễ thực hiện so với quy trình xử lý mẫu chiết pha rắn [3-6]. Dựa vào đặc tính của chất phân tích, KET ($pK_a = 7,5$), DFH ($pK_a = 8,98$), CLO ($pK_a = 9,13$), là các base yếu, CAF là một chất lưỡng tính ($pK_{a1} = 0,7$, $pK_{a2} = 14$) và khả năng hòa tan trong chloroform tốt, tại pH 10 thì trên 90 % các chất tồn tại dưới dạng phân tử nên chuyển sang dung môi được nhiều hơn, độ thu hồi các chất cao (> 90 %),

PRO (pka = 9,1), IPB (pka = 9,8) là một base yếu, tại pH 10 khoảng hơn 50 % IPB tồn tại ở dạng phân tử nên độ thu hồi thấp hơn (>50 %). DMS có tính acid rất yếu (pka = 28, ở 25 °C), khả năng tan trong chloroform kém hơn nên độ thu hồi thấp nhất, tuy nhiên vẫn đạt yêu cầu độ thu hồi (>30 %) theo AOAC 2016. Phương pháp đã xây dựng có thể áp dụng vào mẫu nước thải của cơ sở nghi ngờ sản xuất trái phép KET, là công cụ hữu ích giúp bổ sung thêm thông tin về mẫu nước thải, phát hiện được cả KET và một số chất độc thường dùng trong quá trình sản xuất ma túy.

4. Kết luận

Quy trình phân tích bằng LLE và GC-MS/MS cho phép định lượng đồng thời Ketamin và 6 chất độc là CAF, CLO, DFH, DMS, IPB và PRO với tính đúng đắn đảm bảo. Quy trình phân tích đã được thẩm định theo hướng dẫn AOAC 2016 cho thấy phương pháp có độ đặc hiệu - chọn lọc tốt; độ nhạy tốt thể hiện ở LOD thấp: 4,4 ppb

cho KET và 5,1 ppb DFH; 10,1 ppb cho CLO và 10,9 ppb IPB; 99 ppb cho CAF và 96 ppb PRO và 550 ppb cho DMS. Phép phân tích cho đáp ứng tuyến tính ($R^2 > 0,98$) trong khoảng khảo sát: 10 - 20000 ppb với KET, DFH; 50 - 20000 ppb với IPB, CLO; 500 - 20000 ppb với CAF, PRO và DMS. Độ lặp lại đạt yêu cầu (RSD từ 3,5 - 9,9 %). Tỷ lệ thu hồi đạt được tốt với tất cả các chất phân tích: 90,1 - 103,7 % với KET; 89,5 - 98,6 % với CAF; 57,0 - 74,7 % với IPB; 48,1 - 78,0 % với PRO; 90,2 - 108,6 % với DFH; 96,2 - 109,2 % với CLO và 37,2 - 40,8 % với DMS. Phương pháp có triển vọng tốt để ứng dụng phân tích KET và 6 chất độc trong mẫu nước thải của các cơ sở sản xuất ma túy.

Lời cảm ơn

Nghiên cứu này được tài trợ bởi đề tài Khoa học công nghệ “Nghiên cứu, xây dựng quy trình phân tích hoá chất trong nước thải cơ sở sản xuất trái phép ketamine”, mã số CTMT.2021.C09.06.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Trung tâm giám định ma túy (2020), Báo cáo tổng kết công tác giám định ma túy.
2. UNODC (1998), *Clandestine Manufacture of Substances under International Control*, United Nations, New York.
3. Hernández F., Ibáñez M., Portolés T., Cervera M. I., Sancho J. V., López F. J. (2015), “Advancing towards universal screening for organic pollutants in waters”. *J. Hazard. Mater.*, 282, pp.86–95.
4. Baker DR, Kasprzyk-Hordern B (2011), “Multi-residue determination of the sorption of illicit drugs and pharmaceuticals to wastewater suspended particulate matter using pressurized liquid extraction, solid phase extraction and liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry”, *Journal of Chromatography A*, 1218, pp.7901–13.
5. EMCDDA (2021), *Wastewater analysis and drugs - a European multi-city study*, Perspectives on drugs, EMCDDA, Lisbon.
6. Katelyn S. Foppe, Bikram Subedi (2018), “Analysis of Illicit Drugs in Wastewater Using High-Performance Liquid Chromatography-Electrospray Ionization-Tandem Mass Spectrometry (HPLC-ESI-MS/MS)” *Analysis of Drugs of Abuse*, 1810, pp.183-191.
7. AOAC (2016), *Guidelines for Standard Method Performance Requirements*, AOAC International.

SUMMARY

Analysis of chemicals in wastewater has been proven as a tool for investigation of narcotic drug production site. In this study, a gas chromatographic tandem mass spectroscopic (GC-MS/MS) method was developed for the determination in wastewater of ketamin and 6 other drugs often used as diluent for ketamin: cafein, chlorpheniramine, diphenhydramine, dimethylsulfon, isopropylbenzyl and procain. The analysis method using liquid-liquid extraction for sample treatment. A column DB1-MS 30 m, id 0,25 mm x 0,25 mm was used with helium as carrier gas at 1,2 ml/min and multireaction monitoring at MS/MS detector. The method was validated with high repeatability (RSD % of 1.3 - 7.6 %), good recovery and linearity in the investigated range according to AOAC guidelines. Validation results showed that the developed method was suitable for determination ketamin and the 6 diluents in wastewater.

(Ngày nhận bài: 13/9/2022; Ngày phản biện: 13/9/2022; Ngày duyệt đăng: 14/9/2022)

XÂY DỰNG VÀ THẨM ĐỊNH QUI TRÌNH ĐỊNH LƯỢNG ĐỒNG THỜI CLOPIDOGREL, ASPIRIN VÀ ACID SALICYLIC TRONG HUYẾT TƯƠNG NGƯỜI BẰNG PHƯƠNG PHÁP LC-MS/MS

TẠ MẠNH HÙNG

HOÀNG VĂN ĐỨC, TRẦN HOÀNG,
PHẠM THANH HUYỀN, PHAN THỊ NGHĨA✉

Cục Quản lý Dược Việt Nam

Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương

Từ khóa: Clopidogrel, Aspirin, Acid salicylic, LC-MS/MS, huyết tương

1. Đặt vấn đề

Clopidogrel và aspirin là hai thuốc được sử dụng rộng rãi nhất với tác dụng chống kết tập tiểu cầu và dự phòng huyết khối. Clopidogrel được sử dụng phối hợp với aspirin để dự phòng tái hẹp mạch sau can thiệp mạch qua da và đặt stent mạch vành [1]. Clopidogrel (CPD) là tiền chất (prodrug) với tác dụng ức chế kết tập tiểu cầu phụ thuộc vào chuyển hóa ở gan thành chất chuyển hóa thiol có hoạt tính. Chất chuyển hóa chính của clopidogrel là acid clopidogrel carboxylic, chất này không có hoạt tính. Aspirin (APR) có tác dụng ức chế kết tập tiểu cầu ở mức liều thấp. Khi uống, một phần aspirin được thủy phân thành acid salicylic (SA) trong thành ruột. Sau khi vào tuần hoàn, phần aspirin còn lại cũng nhanh chóng chuyển thành acid salicylic, tuy nhiên trong 20 phút đầu sau khi uống, aspirin vẫn giữ nguyên dạng trong huyết tương [1].

Sau khi uống liều đơn chế phẩm clopidogrel/aspirin hàm lượng 75/100 mg, nồng độ CPD trong huyết tương rất thấp từ 1 - 3 ng/ml với mức độ dao động lớn [4]. Mặt khác, chất chuyển hóa chính của CPD là acid clopidogrel carboxylic có nồng độ cao hơn rất nhiều so với chất mẹ, cùng với khả năng chuyển hóa ngược ở ngoài cơ thể tạo thành clopidogrel. Do đó, chỉ một phần nhỏ chất chuyển hóa acid clopidogrel carboxylic được chuyển hóa ngược cũng làm thay đổi lớn đến nồng độ CPD trong huyết tương làm ảnh hưởng đến kết quả phân tích. Bởi vậy, phương pháp phân tích clopidogrel cần đánh giá được khả năng chuyển hóa ngược từ acid clopidogrel carboxylic, đồng thời phải hạn chế tối thiểu hiện tượng này trong toàn bộ quá trình phân tích.

Nồng độ APR trong huyết tương có mức độ dao động lớn giữa các nghiên cứu được báo cáo từ 400 ng/ml đến 1500 ng/ml, cùng với chất chuyển hóa SA có nồng độ khá cao 4000 - 5000 ng/ml. Ở ngoài cơ thể aspirin, tiếp tục bị thủy phân tạo thành acid salicylic dưới ảnh hưởng của enzym huyết tương, pH, nhiệt độ. Theo các hướng dẫn của EMA và FDA, chất chuyển hóa SA cần được

định lượng cùng với chất mẹ APR.

Do vậy để định lượng được CPD, APR và chất chuyển hóa SA trong mẫu huyết tương người đòi hỏi phải có phương pháp bảo quản, xử lý mẫu phù hợp cũng như một phương pháp phân tích có đủ độ nhạy, đặc hiệu, chính xác và tin cậy. Dựa trên nguyên lý hoạt động của phương pháp sắc ký lỏng – khối phổ (LC-MS), các phương pháp chiết tách và tham khảo tài liệu [3], chúng tôi đã tiến hành nghiên cứu xây dựng phương pháp UPLC-MS/MS có đủ độ nhạy, đặc hiệu, chính xác, định lượng được đồng thời clopidogrel, aspirin và acid salicylic trong các mẫu huyết tương người.

2. Thực nghiệm

2.1. Nguyên vật liệu

- Chất chuẩn:

+ Clopidogrel bisulfat (CPD) - chuẩn của Viện kiểm nghiệm thuốc Trung ương, SKS: 0317247.03, hàm lượng 98,97 % tính theo nguyên trạng.

+ Aspirin (APR) - chuẩn của Viện kiểm nghiệm thuốc Hồ Chí Minh, SKS: QT078110619, hàm lượng 99,50 % tính theo nguyên trạng.

+ Acid salicylic (SA) - chuẩn của Viện kiểm nghiệm thuốc Trung ương, SKS: 0118281.01, hàm lượng 99,93 % tính theo nguyên trạng.

+ Glimepirid (GLM) - chuẩn của Viện kiểm nghiệm thuốc Trung ương, SKS: WS.0108218, hàm lượng 97,49 %, tính theo nguyên trạng. Glimepirid được sử dụng làm chất nội chuẩn (IS) của CPD trong phương pháp phân tích.

+ Furosemid (FRM) - chuẩn của Viện kiểm nghiệm thuốc Trung ương, SKS: 0103128, hàm lượng 99,72 %; độ ảm 0,07 %. Furosemid được sử dụng làm chất nội chuẩn (IS) của APR và SA trong phương pháp phân tích.

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

- *Huyết tương (HT) trắng*: Không có CPD, APR, SA của Bệnh viện Trung ương quân đội 108

2.2. Thiết bị và dụng cụ phân tích

2.2.1. *Thiết bị*: Các thiết bị được quản lý và hiệu chuẩn theo các quy định của ISO/IEC và GLP, bao gồm: Máy sắc ký lỏng khối phổ Waters Xevo TQD (Waters – Mỹ); Cân phân tích Mettler Toledo (Thụy Sĩ, độ chính xác $d = 0,01$ mg); Tủ lạnh sâu $-70\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Panasonic

– Nhật Bản); Máy ly tâm lạnh (Sigma 4-16KS – Đức); Máy cô bay hơi dung môi dùng khí Nitơ; Máy lắc xoay; Máy lọc nước...

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

2.3. Điều kiện phân tích

2.3.1. Điều kiện sắc ký

Bảng 1. Điều kiện sắc ký

Cột sắc ký: Luna C18(2)-HST; 50×3 mm; 2,5 μm		Bảo vệ cột: C18	
Tốc độ dòng: 0,2 ml/phút		Nhiệt độ cột: 40 °C	
Pha động (chương trình gradient):	Thời gian (phút)	Pha động A (%)	Pha động B (%)
	0	60	40
	0,7	90	10
	2	90	10
	2,3	60	40
	4,5	60	40
- Pha động A: dung dịch acid formic 0,05 % trong acetonitril - Pha động B: dung dịch acid formic 0,05 % trong nước			
Thể tích tiêm: 5 μL		Nhiệt độ autosampler: 6 °C	

2.3.2. Điều kiện khối phổ

Kiểu khối phổ hai lần (MS/MS), nguồn ion hóa ESI (+) và ESI (-). Các thông số của thiết bị khối phổ để phát hiện CPD, APR, SA và chất chuẩn nội (IS) được trình bày ở Bảng 2.

Bảng 2. Các thông số của đầu dò khối phổ dùng để định lượng CPD, APR, SA và chuẩn nội

<i>Hoạt chất</i>	Clopidogrel	Glimepirid (CPD-IS)	Aspirin	Acid salicylic	Furosemid (APR-IS)
<i>Thông số</i>					
Chế độ ion hóa	ESI(+)	ESI(+)	ESI(-)	ESI(-)	ESI(-)
Điện thế ion hóa (kV)	2,0	2,0	2,5	2,5	2,5
Điện thế chọn lọc ion (V)	32	26	14	14	40
Nhiệt độ hóa hơi (°C)	500	500	500	500	500
Khí hóa hơi (L/H)	800	800	800	800	800
Khí làm sạch (L/H)	25	25	25	25	25
Năng lượng phân mảnh (V)	14	24	6	15	24
Ion ban đầu (parent ion)	322	491	179	137	329
Ion tạo thành (product ion)	212	126	137	93	205

2.3.3. Phương pháp chuẩn bị mẫu

- Huyết tương để pha mẫu: thêm kali florid vào huyết tương trắng để thu được huyết tương pha mẫu có nồng độ kali florid khoảng 1 mg/ml.

- Dung dịch chuẩn gốc: chuẩn bị dung dịch chuẩn gốc CPD, SA trong acetonitril có nồng độ lần lượt khoảng 400 µg/ml, 1400 µg/ml và dung dịch chuẩn nội gốc GLM, FRM trong acetonitril có nồng độ lần lượt khoảng 500 µg/ml và 500 µg/ml. Dung dịch chuẩn gốc APR có nồng độ khoảng 500 µg/ml được chuẩn bị trong hỗn hợp acetonitril – acid formic (99 : 1).

- Dung dịch chuẩn nội làm việc: từ các dung dịch chuẩn nội gốc chuẩn bị dung dịch chuẩn làm việc trong hỗn hợp acetonitril - nước (1:1) có nồng độ GLM và FRM lần lượt khoảng 1 µg/ml và 20 µg/ml.

- Dung dịch chuẩn làm việc: từ các dung dịch chuẩn gốc CPD, APR, SA, chuẩn bị các dung dịch chuẩn làm việc trong acetonitril – acid formic (99 : 1) có nồng độ chuẩn bằng 20 lần nồng độ mẫu huyết tương tương ứng.

- Từ các dung dịch chuẩn làm việc trong dung môi, chuẩn bị các mẫu bằng cách pha loãng với huyết tương trắng để thu được các mẫu trong đường chuẩn chứa CPD có nồng độ khoảng từ 10 pg/ml đến 10000 pg/ml, chuẩn APR có nồng độ khoảng từ 10 ng/ml đến 2500 ng/ml, chuẩn SA có nồng độ khoảng từ 70 ng/ml đến 3500 ng/ml và các mẫu LLOQ, LQC, SQC, MQC và HQC chứa CPD có nồng độ tương ứng là 10; 30; 500; 4000; 8000 pg/ml, APR có nồng độ tương ứng là 10; 30; 125; 1000; 2000 ng/ml và SA có nồng độ tương ứng là 70; 210; 875; 1400; 2800 ng/ml.

2.3.4. Phương pháp xử lý mẫu

Mẫu HT để ráo đông ở nhiệt độ phòng. Hút 200 µl HT vào ống nhựa 2 ml. Thêm 200 µl dung dịch KH_2PO_4 1M. Thêm 20 µl dung dịch chuẩn nội làm việc. Thêm 1,25 ml tert butyl methyl ether. Lắc xoáy 5 phút. Ly tâm 2800 g (5000 vòng/phút) trong 5 phút. Hút 1 ml lớp trên vào ống cô. Cô bay hơi dung môi thu cần. Hòa tan cần trong 400 µl dung môi hòa tan mẫu. Tiêm sắc ký.

2.3.5. Phương pháp tính kết quả

Xác định nồng độ CPD, APR, SA có trong các mẫu thử (chưa biết nồng độ) dựa vào tỷ lệ diện tích pic tương ứng CPD/FRM, APR/FRM, SA/FRM thu được từ sắc đồ của mẫu thử và đường chuẩn tương ứng phân tích trong cùng điều kiện.

3. Kết quả và bàn luận

3.1. Quá trình phát triển phương pháp

- Khảo sát xác định điều kiện khối phổ: lần lượt đưa vào thiết bị khối phổ các dung dịch chuẩn có nồng độ các chất phân tích khoảng 1 µg/ml để xác định thông số khối phổ cho từng chất. Phù hợp với cấu trúc hóa học của các chất phân tích, clopidogrel và chuẩn nội glimepirid được ion hóa mang điện tích dương, trong khi đó aspirin, acid salicylic và chuẩn nội furosemid được ion hóa mang điện tích âm. Các thông số khối phổ bao gồm tín hiệu Ion ban đầu/Ion tạo thành, điện thế ion hóa, điện thế chọn lọc ion, năng lượng phân mảnh, nhiệt độ hóa hơi, tốc độ khí hóa hơi... được xác định cho từng chất phân tích và chuẩn nội tương ứng. Tuy nhiên, trên phổ khối MS của dung dịch chuẩn APR ngoài mảnh khối $m/z=179$ tương ứng với ion $[\text{APR-H}]^-$, còn xuất hiện mảnh phổ khối $m/z=137$ tương tự với số khối của ion $[\text{SA-H}]^-$. Như vậy, trước khi đi vào bộ phân tích khối phân tử APR đã phân mảnh tại nguồn ion hóa ESI. Quá trình này là phù hợp với cấu trúc phân tử của APR bị đứt gãy tại nhóm 2-acetyloxy tạo ion $[\text{SA-H}]^-$. Do đó, quá trình sắc ký phải phân tách được APR và SA.

- Khảo sát xác định điều kiện sắc ký: do tính chất lý hóa khác nhau của các chất phân tích, đồng thời nền mẫu dịch sinh học sau xử lý vẫn còn chứa nhiều tạp chất nên quá trình sắc ký phải rửa giải, tách các chất khỏi tạp nền mẫu. Quá trình khảo sát trên các hệ pha động và cột sắc ký khác nhau, lựa chọn pha động gồm acetonitril chứa 0,05 % acid formic và nước chứa 0,05 % acid formic theo chương trình gradient và sử dụng cột sắc ký Phenomenex Luna C18(2)-HST (50 mm x 3mm; 2,5 µm) cho thấy các pic CPD, APR, SA cân đối, đáp ứng cao và ổn định. Đồng thời các pic APR và SA tách nhau rõ ràng giúp loại bỏ ảnh hưởng do hiện tượng phân mảnh tại nguồn ion hóa.

- Khảo sát xác định điều kiện xử lý mẫu: dựa trên tính chất của các chất phân tích và điều kiện sẵn có, tiến hành khảo sát qui trình xử lý mẫu bằng kỹ thuật rửa protein và chiết lỏng – lỏng. Với kỹ thuật rửa protein, tín hiệu chất phân tích thu được thấp do pha loãng mẫu, không đáp ứng yêu cầu giới hạn định lượng cần phải đạt được. Với kỹ thuật chiết lỏng - lỏng, thường thu được mẫu sạch hơn kỹ thuật rửa protein và có thể làm giàu mẫu. Khảo sát trên các dung môi khác nhau, lựa chọn tert butyl methyl ether làm dung môi chiết cho tỷ lệ thu hồi cao, nền mẫu sạch. Ngoài ra, các chất phân tích có đặc điểm phân ly khác nhau với CPD là base yếu, $pK_a = 5,3$ và APR, SA có tính acid, pK_a lần lượt là 3,5 và 2,3. Vì vậy, ảnh hưởng của pH đến hiệu suất chiết xảy ra theo chiều hướng trái ngược nhau giữa các chất phân tích, tại pH trung tính và kiềm, hiệu suất chiết CPD cao,

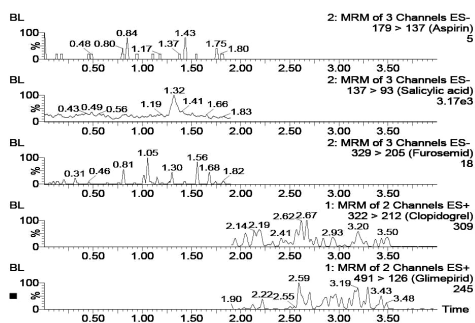
trái lại, tại pH acid hiệu suất chiết APR và SA cao. Tiến hành khảo sát trên các dải pH sử dụng các acid, muối ở các nồng độ và tỷ lệ khác nhau, nhận thấy khi sử dụng dung dịch muối KH_2PO_4 1M với tỷ lệ 1 : 1 nhận thấy các chất phân tích có tỷ lệ thu hồi cao, ổn định.

3.2. Kết quả thẩm định phương pháp

3.2.1 Độ đặc hiệu – chọn lọc của phương pháp

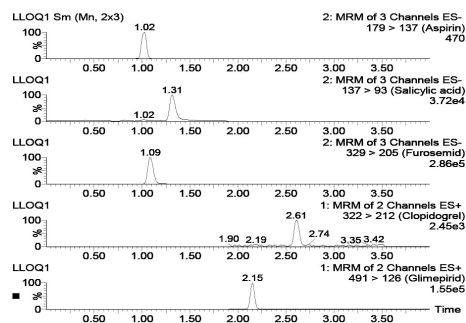
Phân tích các mẫu HT trắng và các mẫu HT tự tạo chứa chuẩn nội và CPD, APR, SA với nồng độ lần lượt khoảng 10 pg/ml; 10 ng/ml; 70 ng/ml theo phương pháp đã được xây dựng.

Trên sắc ký đồ (SKĐ) của mẫu HT trắng (Hình 1), tại thời điểm 2,61 phút; 2,15 phút; 1,02 phút và 1,09 phút trùng với thời gian lưu của CPD, IS-GLM và APR, SA và IS theo các quy định của phương pháp phân tích thuốc trong dịch sinh học [4],[5].



Hình 1. Sắc ký đồ mẫu huyết tương trắng

IS-FRM trong mẫu chuẩn (Hình 2) không xuất hiện các pic có mảnh phổ khối $m/z = 322 \gg 212$ (đặc trưng cho CPD), mảnh phổ khối $m/z = 491 \gg 126$ (đặc trưng cho IS-GLM) và mảnh phổ khối $m/z = 179 \gg 137$ (đặc trưng cho APR), mảnh phổ khối $m/z = 329 \gg 205$ (đặc trưng cho IS-FRM). Riêng tại thời điểm 1,31 phút, trên SKĐ của mẫu HT trắng xuất hiện đáp ứng pic có mảnh phổ khối $m/z = 137 \gg 93$ (đặc trưng cho SA), nguyên nhân là do trong huyết tương người luôn tồn tại lượng nhỏ acid salicylic có nguồn gốc từ thức ăn được dung nạp hàng ngày. Tuy nhiên, đáp ứng trên SKĐ mẫu HT trắng rất nhỏ và không lớn hơn 20 % đáp ứng mẫu huyết tương thêm SA ở nồng độ LLOQ (70 ng/ml). Do vậy, phương pháp phân tích có độ đặc hiệu - chọn lọc với CPD, APR, SA và IS theo các quy định của phương pháp phân tích thuốc trong dịch sinh học [4],[5].



Hình 2. Sắc ký đồ mẫu huyết tương tự tạo

3.2. Đường chuẩn và khoảng tuyến tính

Phân tích các mẫu HT chứa chuẩn CPD có nồng độ khoảng từ 10 pg/ml đến 10000 pg/ml, chuẩn APR có nồng độ khoảng từ 10 ng/ml đến 2500 ng/ml, chuẩn SA có nồng độ khoảng từ 70 ng/ml đến 3500 ng/ml và chuẩn nội tương ứng theo quy trình đã xây dựng. Tiến hành lặp lại trên 5 đường chuẩn riêng rẽ. Xác định sự tương quan giữa nồng độ CPD, APR, SA có trong mẫu và tỷ lệ diện tích pic tương ứng CPD/GLM; APR/FRM; SA/FRM bằng phương pháp hồi quy tuyến tính, sử dụng hệ số tỷ trọng ($1/\text{nồng độ}^2$). Tóm tắt kết quả xác định mối tương quan tuyến tính được trình bày trong Bảng 3

Bảng 3. Kết quả xác định mối tương quan tuyến tính

STT	Phương trình hồi qui ($y = ax+b$)		
	CPD	APR	SA
Đường chuẩn 1	$y = 0,0007x + 0,0002;$ $r = 0,9980$	$y = 0,0001x - 0,0004;$ $r = 0,9985$	$y = 0,0013x + 0,0440;$ $r = 0,9969$
Đường chuẩn 2	$y = 0,0007x + 0,0033;$ $r = 0,9990$	$y = 0,0001x - 0,0002;$ $r = 0,9984$	$y = 0,0012x + 0,0561;$ $r = 0,9960$
Đường chuẩn 3	$y = 0,0007x + 0,0021;$ $r = 0,9991$	$y = 0,0001x - 0,0001;$ $r = 0,9984$	$y = 0,0012x + 0,0517;$ $r = 0,9949$
Đường chuẩn 4	$y = 0,0007x + 0,0014;$ $r = 0,9984$	$y = 0,0001x - 0,0003;$ $r = 0,9987$	$y = 0,0013x + 0,0420;$ $r = 0,9976$
Đường chuẩn 5	$y = 0,0007x + 0,0024;$ $r = 0,9999$	$y = 0,0001x - 0,0002;$ $r = 0,9978$	$y = 0,0013x + 0,0509;$ $r = 0,9942$

Kết quả thẩm định cho thấy trong khoảng nồng độ từ 10 pg/ml đến 10000 pg/ml đối với CPD, từ 10 ng/ml đến 2500 ng/ml đối với APR, từ 70 ng/ml đến 3500 ng/ml đối với SA có sự tương quan tuyến tính giữa nồng độ CPD, APR, SA với tỷ lệ diện tích pic tương ứng CPD/GLM; APR/FRM; SA/FRM với hệ số tương quan > 0,99. Nồng độ CPD, APR, SA xác định từ đường chuẩn so với giá trị lý thuyết đều đạt xấp xỉ 100 % và nằm trong giới hạn cho phép theo qui định của phương pháp phân tích thuốc trong dịch sinh học.

3.3. Giới hạn định lượng dưới của phương pháp

Phân tích các mẫu huyết tương trắng và mẫu huyết tương chứa CPD, APR và SA với nồng độ lần lượt khoảng 10 pg/ml; 10 ng/ml và 70 ng/ml (mẫu LLOQ). Xác định diện tích pic CPD, APR, SA và chuẩn nội GLM, FRM của các mẫu LLOQ và xác định nồng độ CPD, APR, SA có trong các mẫu từ đường chuẩn tiến hành làm song song trong cùng điều kiện. Tiến hành trên 3 ngày khác nhau. Kết quả thẩm định giới hạn định lượng dưới của phương pháp được trình bày ở Bảng 6.

Bảng 6. Kết quả xác định giá trị LLOQ

Ngày thẩm định	Tỷ lệ diện tích pic			Nồng độ xác định từ đường chuẩn (ng/ml)			Độ đúng so với nồng độ thực (%)			Tỷ lệ LLOQ/Zero		
	CPD/GLM	APR/FRM	SA/FRM	CPD	APR	SA	CPD	APR	SA	CPD	APR	SA
Ngày 1	0,020	0,001	0,144	11,4	8,8	73,8	111,7	86,8	104,9	-	-	5,7
	0,017	0,002	0,147	8,8	11,2	75,7	85,9	111,0	107,7			
	0,017	0,001	0,137	9,0	8,5	68,3	88,3	84,5	97,2			
	0,017	0,002	0,140	9,4	9,6	70,5	92,1	95,1	100,3			
	0,016	0,001	0,143	7,5	6,4	72,9	74,0	62,9	103,7			
	0,017	0,002	0,130	8,5	10,1	63,1	83,5	100,2	89,7			
	Trung bình (%)							89,3	90,1			
CV (%)							14,1	18,2	6,4			
Ngày 2	0,016	0,002	0,132	10,5	12,4	69,5	103,4	122,4	98,9	148,7	-	8,0
	0,017	0,001	0,130	11,3	9,3	68,6	111,1	92,6	97,6			
	0,017	0,002	0,136	11,6	12,2	72,2	114,2	121,2	102,7			
	0,022	0,001	0,138	15,2	11,1	73,9	148,8	109,9	105,1			
	0,016	0,001	0,135	10,8	10,7	71,9	105,6	105,7	102,2			
	0,018	0,002	0,140	11,9	11,4	75,4	116,2	113,1	107,3			
	Trung bình (%)							116,6	110,8			
CV (%)							14,2	9,9	3,6			
Ngày 3	0,025	0,002	0,153	12,6	10,9	78,9	124,0	108,0	112,3	13,9	-	6,3
	0,024	0,001	0,138	11,9	8,3	69,4	116,4	82,0	98,8			
	0,023	0,002	0,160	11,3	9,9	83,5	110,5	97,5	118,8			
	0,018	0,002	0,153	8,5	10,6	78,6	83,4	105,1	111,8			
	0,022	0,002	0,153	11,0	10,7	78,9	108,0	105,7	112,3			
	0,024	0,002	0,164	12,0	11,3	85,6	117,2	112,3	121,7			
	Trung bình (%)							109,9	101,8			
CV (%)							12,9	10,6	7,0			
Trung bình (%)							105,2	100,9	105,2			
CV (%)							17,2	14,9	7,6			

(-): không xác định

Kết quả thẩm định cho thấy tỷ lệ đáp ứng của pic CPD, APR, SA trong các mẫu LLOQ (nồng độ lần lượt khoảng 10 pg/ml; 10 ng/ml; 70 ng/ml) so với đáp ứng tại thời gian lưu tương ứng trong các mẫu huyết tương trắng có thêm

chuẩn nội (mẫu zero) đều > 5; tỷ lệ nồng độ CPD, APR, SA xác định từ đường chuẩn so với nồng độ thực có trong mẫu nằm trong khoảng từ 80 – 120 % (trung bình = 105,2 % và CV = 17,2 % cho CPD; trung bình = 100,9 % và CV = 14,9 % cho APR; trung bình = 105,2 % và CV = 7,6 % cho SA) đáp ứng yêu cầu giới hạn định lượng dưới của phương pháp phân tích thuốc trong dịch sinh học.

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

Tiến hành thẩm định độ đúng, độ lặp lại trên 5 lô mẫu thử LLOQ, LQC, SQC, MQC và HQC. Xác định hàm lượng CPD, APR, SA có trong mẫu bằng phương pháp đường chuẩn và tỷ lệ % giữa nồng độ xác định được từ đường chuẩn so với nồng độ lý thuyết. Tiến hành trên 3 ngày khác nhau. Kết quả xác định độ đúng, độ lặp lại của phương pháp được trình bày ở Bảng 7, 8, 9.

Bảng 7. Kết quả thẩm định độ đúng, độ lặp lại trong ngày và khác ngày - CPD

Độ đúng, Độ lặp lại	Mẫu LLOQ (10 pg/ml)		Mẫu LQC (30 pg/ml)		Mẫu SQC (500 pg/ml)		Mẫu MQC (4000 pg/ml)		Mẫu HQC (8000 pg/ml)	
	Độ đúng (%)	Độ lặp lại (CV%)	Độ đúng (%)	Độ lặp lại (CV%)	Độ đúng (%)	Độ lặp lại (CV%)	Độ đúng (%)	Độ lặp lại (CV%)	Độ đúng (%)	Độ lặp lại (CV%)
Ngày 1 (n = 6)	89,3	14,1	103,8	11,0	97,9	10,8	106,9	14,8	107,1	13,3
Ngày 2 (n = 6)	116,6	14,2	109,3	14,5	102,1	7,9	102,4	9,9	103,4	7,0
Ngày 3 (n = 6)	109,9	12,9	100,5	13,4	93,5	5,2	94,6	9,9	95,5	5,1
Khác ngày (n = 3)	105,2	17,2	104,5	12,8	97,8	8,7	101,3	12,4	102,0	10,1

Bảng 8. Kết quả thẩm định độ đúng, độ lặp lại trong ngày và khác ngày - APR

Độ đúng, Độ lặp lại	Mẫu LLOQ (10 ng/ml)		Mẫu LQC (30 ng/ml)		Mẫu SQC (125 ng/ml)		Mẫu MQC (1000 ng/ml)		Mẫu HQC (2000 ng/ml)	
	Độ đúng (%)	Độ lặp lại (CV%)	Độ đúng (%)	Độ lặp lại (CV%)	Độ đúng (%)	Độ lặp lại (CV%)	Độ đúng (%)	Độ lặp lại (CV%)	Độ đúng (%)	Độ lặp lại (CV%)
Ngày 1 (n = 6)	90,1	18,2	97,6	11,9	105,7	9,2	111,7	8,4	111,4	5,5
Ngày 2 (n = 6)	110,8	9,9	100,8	10,6	100,2	4,6	98,3	4,2	101,8	4,6
Ngày 3 (n = 6)	101,8	10,6	93,2	8,5	96,0	4,9	97,9	5,6	94,4	3,6
Khác ngày (n = 3)	100,9	14,9	97,2	10,4	100,6	7,5	102,6	8,9	102,6	8,3

Bảng 9. Kết quả thẩm định độ đúng, độ lặp lại trong ngày và khác ngày - SA

Độ đúng, Độ lặp lại	Mẫu LLOQ (0,2 ng/ml)		Mẫu LQC (0,6 ng/ml)		Mẫu SQC (4 ng/ml)		Mẫu MQC (20 ng/ml)		Mẫu HQC (40 ng/ml)	
	Độ đúng (%)	Độ lặp lại (CV%)	Độ đúng (%)	Độ lặp lại (CV%)	Độ đúng (%)	Độ lặp lại (CV%)	Độ đúng (%)	Độ lặp lại (CV%)	Độ đúng (%)	Độ lặp lại (CV%)
Ngày 1 (n = 6)	100,6	6,4	109,8	8,3	109,1	8,3	110,0	8,6	103,8	5,8
Ngày 2 (n = 6)	102,3	3,6	106,9	8,4	103,3	4,8	97,3	2,7	94,9	3,6
Ngày 3 (n = 6)	112,6	7,0	106,0	2,8	101,3	4,3	97,8	6,2	92,0	3,2
Khác ngày (n = 3)	105,2	7,6	107,6	6,8	104,6	6,7	101,7	8,6	96,9	6,8

Kết quả thẩm định cho thấy ở các khoảng nồng độ thấp; trung bình và cao, phương pháp có độ đúng trong ngày, khác ngày từ 85 % đến 115 % (ngoại trừ mẫu LLOQ từ 80 % đến 120 %); độ lặp lại trong ngày, khác ngày với giá trị CV < 15,0 % (ngoại trừ mẫu LLOQ với CV < 20 %); đáp ứng các yêu cầu về độ đúng, độ lặp lại của phương pháp phân tích thuốc trong dịch sinh học theo hướng dẫn của US-FDA và EMA.

3.5. Độ ổn định của hoạt chất trong huyết tương

Tiến hành nghiên cứu độ ổn định của CPD, APR, SA trên các lô mẫu LQC và HQC. Các lô mẫu này được thêm chất chuyển hóa acid clopidogrel carboxylic (CCA) ở nồng độ 1000 ng/ml để đánh giá ảnh hưởng của quá trình chuyển hóa ngược từ chất chuyển hóa CCA thành

chất mẹ CPD. Đánh giá độ ổn định của CPD, APR, SA trong HT bằng cách so sánh nồng độ CPD, APR, SA có trong mẫu được bảo quản ở những điều kiện nhất định với nồng độ pha thực tế. Kết quả nghiên cứu độ ổn định của CPD, APR, SA trong huyết tương ở cả hai khoảng nồng độ thấp và cao được trình bày trong Bảng 10.

Bảng 10. Kết quả nghiên cứu độ ổn định của CPD, APR, SA trong huyết tương

Độ ổn định		LQC			HQC		
		CPD	APR	SA	CPD	APR	SA
Sau 4 chu kỳ đông – rã đông	Nồng độ trung bình	26,2	102,1	231,2	6853,1	1915,0	2575,6
	% độ ổn định	87,7	31,5	109,6	86,4	93,3	91,6
	CV %	5,2	11,4	10,1	0,6	3,6	3,1
Độ ổn định thời gian ngắn (6 giờ; nhiệt độ phòng)	Nồng độ trung bình	29,2	29,8	241,5	7324,4	1917,6	2881,1
	% độ ổn định	98,3	96,6	114,5	92,3	93,4	102,4
	CV %	4,1	10,1	7,7	3,8	10,9	13,1
Độ ổn định trong autosampler (48 giờ; 6 °C)	Nồng độ trung bình	27,3	27,7	188,9	7090,3	1877,0	2701,7
	% độ ổn định	91,6	92,1	89,4	89,1	93,6	95,9
	CV %	8,0	8,4	8,3	5,1	11,5	14,9
Độ ổn định thời gian dài (79 ngày; -70 °C ± 5 °C)	Nồng độ trung bình	26,2	31,8	236,5	6999,4	1982,6	2935,6
	% độ ổn định	88,4	103,3	112,1	88,3	96,6	104,4
	CV %	11,4	4,4	8,8	5,6	4,0	7,0

Kết quả thẩm định cho thấy độ ổn định của CPD, APR, SA trong huyết tương có mặt của chất chuyển hóa CCA tại các điều kiện bảo quản khác nhau (sau 5 chu kỳ đông – rã đông; bảo quản ở nhiệt độ phòng sau 6 giờ; bảo quản trong autosampler sau 48 giờ và bảo quản ở -70 °C ± 5 °C sau 79 ngày) đáp ứng các yêu cầu về độ ổn định của phương pháp phân tích thuốc trong dịch sinh học. Đồng thời quá trình chuyển hóa ngược của chất chuyển hóa CCA tạo thành chất mẹ CPD được kiểm soát.

4. Kết luận

Nghiên cứu đã xây dựng được phương pháp định lượng đồng thời clopidogrel, aspirin và chất chuyển

hóa acid salicylic trong huyết tương người bằng UPLC/MS-MS với giá trị giới hạn định lượng dưới lần lượt là 10 pg/ml, 10 ng/ml và 70 ng/ml; khoảng tuyến tính rộng, lần lượt từ 10 đến 10000 pg/ml; 10 đến 2500 ng/ml và 70 ng/ml đến 3500 ng/ml, phù hợp với thông số được động học của các chất phân tích; độ đúng, độ lặp lại đáp ứng yêu cầu đối với phương pháp phân tích thuốc trong dịch sinh học theo qui định của EMA [4] và US-FDA [5]. Thời gian phân tích ngắn (4,5 phút cho mỗi mẫu). Phương pháp phân tích có thể ứng dụng trong các nghiên cứu đánh giá sinh khả dụng và tương đương sinh học chế phẩm chứa hoạt chất clopidogrel và aspirin.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Bộ Y tế (2018), Dược thư quốc gia Việt Nam, lần xuất bản thứ hai, Nhà xuất bản Khoa học và kỹ thuật, trang 117-119 và trang 425-428; .
- Chhonker, Y. S., Pandey, C. P., Chandasana, H., Laxman, T. S., Prasad, Y. D., Narain, V. S. Bhatta, R. S. (2015), “Simultaneous quantitation of acetylsalicylic acid and clopidogrel along with their metabolites in human plasma using liquid chromatography tandem mass spectrometry”, *Biomedical Chromatography*, 30(3), 466–473.
- Choi, H.-K., Ghim, J.-L., Shon, J., Choi, Y.-K., & Jung, J. A. (2016), “Pharmacokinetics and relative bioavailability of fixed-dose combination of clopidogrel and aspirin versus coadministration of individual formulations in healthy Korean men”, *Drug Design, Development and Therapy*, Volume 10, 3493–3499.
- European Medicines Agency, Committee for Medicinal Products for Human Use (2012). *Guideline on Validation of Bioanalytical Methods*.
- U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration (2018): *Guidance for Industry - Bioanalytical Method Validation*.

SUMMARY

A high throughput and specific method using ultra performance liquid chromatography tandem mass spectrometry for simultaneous determination of clopidogrel, aspirin and salicylic acid in human plasma was developed. The Waters Xevo TQD UPLC-MS/MS was operated under the multi reaction-monitoring mode using both of positive electrospray ionization and negative electrospray technique. Clopidogrel, aspirin, salicylic acid and internal standard were extracted from human plasma by liquid - liquid extraction technique using tert butyl methyl ether. The reconstituted samples were chromatographed on a C18 column (dimension 50 x 3 mm, particle 2.5 μ m) with a gradient elution at a flow rate of 0.2 ml/min using 0.1 % formic acid in water – 0.1 % formic acid in acetonitrile. The standard curves were found to be linear in the range 10 to 10000 pg/ml, 10 to 2500 ng/ml and 70 to 3500 ng/ml for clopidogrel, aspirin, salicylic acid, respectively, with mean correlation coefficient of > 0.99 for all analysis. The intra-day and inter-day precision and accuracy were within 85 % - 115.0 %. Total run time was 4.5 min only. This method can be used for BA-BE studies of clopidogrel and aspirin combination preparations.

(Ngày nhận bài: 29/3/2021; Ngày phản biện: 27/10/2022; Ngày duyệt đăng: 03/11/2022)

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

NGUYỄN HOÀNG THẢO MY, TRƯƠNG MINH NHỰT,
NGUYỄN ĐỨC TUẤN, NGUYỄN HỮU LẠC THỦY✉

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

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

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Trà hoa vàng (THV) là một phân nhóm của họ Trà (Theaceae), phân bố chủ yếu ở các nước châu Á như Trung Quốc, Ấn Độ Tại Việt Nam, THV phân bố dọc khắp các tỉnh thành với hơn 40 loài đã được tìm thấy [1]. Các tác dụng sinh học trong THV như chống oxy hóa, kháng khuẩn, kháng viêm đã được công bố và có liên quan đến các thành phần hóa học trong trà, bao gồm flavonoid, polyphenol, tannin ... [2]. Hiện nay, nhiều loài THV đã được nuôi trồng và phát triển trên nhiều tỉnh thành trong cả nước, và vùng Tây Nguyên nơi có điều kiện khí hậu và thổ nhưỡng thích hợp cho sự phát triển của THV là một trong những khu vực được lựa chọn. Trong nghiên cứu trước, một loài THV tại Tây Nguyên là *Camellia flava* (Pitard) Sealy đã được định danh và đánh giá sơ bộ tác dụng sinh học [3]. Ở nghiên cứu này, chúng tôi tiếp tục nghiên cứu định danh một loài THV khác tại vùng Tây Nguyên qua đặc điểm thực vật, DNA; nghiên cứu thành phần hóa học đồng thời đánh giá một số tác dụng sinh học *in vitro*. Các kết quả nghiên cứu này sẽ là góp phần bổ sung dữ liệu về thành

phần hóa học và tác dụng sinh học của các loài THV, đặc biệt là THV trồng tại Tây Nguyên.

2. THỰC NGHIỆM

2.1. Đối tượng nghiên cứu

Một loài THV được thu hái tại xã Nghĩa Hưng, huyện Chư Păh, tỉnh Gia Lai - Tây Nguyên vào tháng 01/2022. Mẫu tiêu bản có mã số L4.100222 được lưu mẫu tại bộ môn Phân tích – Kiểm nghiệm, khoa Dược, Đại học Y Dược Tp.HCM.

Mẫu cao lá: Chiết 100 g bột lá đã được sấy khô ở 50 °C và xay thành bột thô bằng phương pháp chiết ngâm kiệt với dung môi ethanol 70 %. Cô thu hồi dung môi thu được cao lá. Độ ẩm của cao lá là 22,5 %.

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 hydrochloric, 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 α -amylase (Sigma Aldrich).

Các chất chuẩn sử dụng trong nghiên cứu gồm: 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).

Máy móc và thiết bị: kính hiển vi Carl Zeiss; tủ an toàn sinh học Telstar Bio II Advance Plus; nồi hấp tiệt 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

Các đặc điểm hình thái của loài như cơ quan sinh dưỡng và cơ quan sinh sản được quan sát, mô tả và chụp hình. Vi phẫu thân, lá, bột lá và bột hoa được chuẩn bị và quan sát dưới kính hiển vi quang học, mô tả chi tiết.

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 với các giai đoạn sau: khởi đầu (98 °C, 30 giây, 1 lần); biến tính (98 °C, 15 giây, 35 lần); bắt cặp (55 °C, 30 giây, 35 lần); kéo dài (72 °C, 40 giây, 35 lần) và kết thúc (72 °C, 600 giây, 1 lần). Sản phẩm PCR được kiểm tra tinh khiết, sau đó được giải trình tự và so sánh với dữ liệu trên NCBI.

2.3.3. Xác định hàm lượng polyphenol toàn phần

Hàm lượng polyphenol toàn phần trong cao được thử nghiệm theo hướng dẫn của ISO 14502-1:2005 [4]. Cao lá được pha loãng bằng methanol đến nồng độ thích hợp, phản ứng với thuốc thử Folin-Ciocalteu trong Na_2CO_3 tạo thành sản phẩm hấp thụ cực đại ở bước sóng 765 nm. Kết quả được biểu diễn bằng đơn vị mg GAE/g (số mg acid gallic trong 1 g cao).

2.3.4. Xác định hàm lượng flavonoid toàn phần

Hàm lượng flavonoid toàn phần trong cao được tiến hành theo nghiên cứu của Chatatikun và cộng sự (2013) [5]. Cao lá được pha loãng bằng methanol đến nồng độ thích hợp, phản ứng với thuốc thử AlCl_3 trong CH_3COONa 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 mg quercetin trong 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 thực hiện theo mô hình của Kedare và cộng sự [6]. Kết quả được thể hiện qua giá trị IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$) 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 thực hiện theo mô hình của Roberta và cộng sự (1999) [7]. Kết quả được thể hiện qua giá trị IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$) 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 thực hiện theo mô hình của Ferreira và cộng sự (2007) [8]. Kết quả được thể hiện qua giá trị EC_{50} ($\mu\text{g/ml}$) và so sánh với với mẫu chứng dương acid ascorbic.

2.3.6. Đánh giá tác dụng ức chế hoạt tính enzym α -amylase

Quy trình đánh giá tác dụng ức chế hoạt tính α -amylase được thực hiện theo mô hình của Akkarachiyasit và cộng sự có hiệu chỉnh [9]. Kết quả được thể hiện qua giá trị IC_{50} (mg/ml) và so sánh với với mẫu chứng dương acarbose.

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

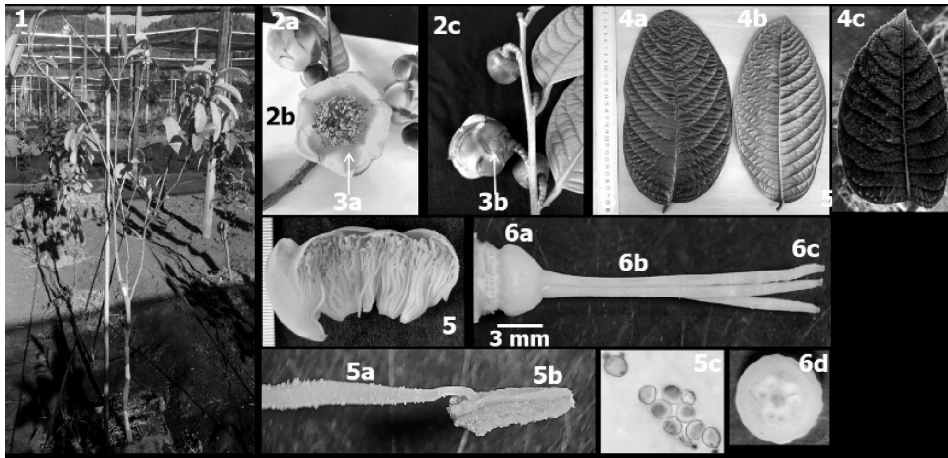
3.1. Kết quả đặc điểm thực vật

3.1.1. Đặc điểm hình thái

Cây gỗ nhỏ cao 2,0 – 5,0 m, màu xám, tiết diện thân đa giác. Lá đơn, mọc cách, không có lá kèm. Phiến lá hình bầu dục đầu nhọn, dài 28 – 30 (cm), rộng 4,0 – 5,5 (cm), màu xanh lục mặt trên đậm hơn mặt dưới, nhẵn, bìa phiến có răng cưa cạn. Gân lá hình lông chim nổi rõ ở mặt dưới, có 11 – 13 đôi gân phụ. Cuống lá màu xanh, hình trụ, mặt trên có rãnh cạn, dài 0,9 – 1,3 (cm).

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 7 – 8, 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 – 5 (mm), rộng 5 – 7 (mm). Cánh hoa 8 – 9, gần đều, rời nhau, đính thành 2 – 3 vòng, cánh hoa hình bầu dục, mặt ngoài màu vàng phớt tím, mặt trong màu vàng, dài 2,5 – 4,0 (cm), rộng 2,0 – 2,5 (cm).

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



Hình 1. Đặc điểm hình thái của loài nghiên cứu

(1: Toàn cây; 2a: Hoa chưa nở; 2b: Hoa nở; 2c: Nụ hoa; 3a: Cánh hoa; 3b: Lá đài; 4a: Mặt trên của lá; 4b: Mặt dưới của lá; 4c: Lá non; 5: Bộ nhị; 5a: Chỉ nhị; 5b: Bao phấn; 5c: Hạt phấn; 6a: Bầu noãn; 6b: Vòi nhụy; 6c: Đầu nhụy; 6d: Bầu noãn cắt ngang)

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

So với đặc điểm hình thái của loài *Camellia flava*, loài *Camellia hakodae* có chiều dài lá có thể đến 28 – 30 (cm), gấp khoảng 3 lần so với khoảng tối đa của *Camellia flava*; đồng thời mép lá khá cứng chắc, răng cưa khá rõ ngược lại với dạng mềm và lượn sóng ở *Camellia flava* [3].

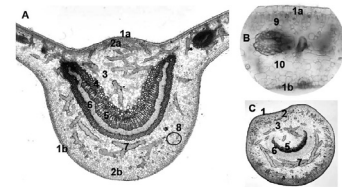
Về hình thái của hoa, loài *Camellia hakodae* ghi nhận rõ kích thước cánh hoa thường lớn hơn, mặt ngoài màu vàng phớt tím và mặt trong vàng so với màu vàng đồng nhất trên *Camellia flava*. Lá noãn 5, dính nhau, tạo bầu trên 5 ô cùng đầu nhụy 5 ở *Camellia hakodae* giúp phân biệt so với lá noãn 3, dính nhau, tạo bầu trên 3 ô cùng đầu nhụy 3 ở loài *Camellia flava* [3]. Các đặc điểm còn lại về hình dạng cuống hoa, lá bắc, lá đài, nhị, nhụy gần như tương đồng ở 2 loài so sánh.

3.1.2. Đặc điểm vi học

Vi phẫu thân gần tròn bao gồm bản, mô mềm vỏ đạo, 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, tinh thể calci oxalat hình cầu gai và tinh bột.

Vùng gân lá dày gấp 4,0 – 4,5 lần vùng thịt lá, mặt dưới lõm hơn mặt trên bao gồm biểu bì trên, biểu bì dưới, mô dày góc trên, mô dày góc dưới, mô mềm khuyết, hệ thống dẫn hình cung với gỗ ở trên và libe ở

dưới, mạch gỗ, mô mềm gỗ, mô cứng, thể cứng và tinh thể calci oxalat hình cầu gai.



Hình 2. Đặc điểm vi phẫu lá của loài nghiên cứu

(A: vi phẫu gân lá; B: vi phẫu thịt lá; C: vi phẫu cuống lá; 1a: biểu bì trên; 1b: biểu bì dưới; 2a: mô dày trên; 2b: mô dày dưới; 3: mô mềm; 4: mô cứng; 5: gỗ; 6: libe; 7: thể cứng; 8: tinh thể calci oxalat; 9: mô mềm giậu; 10: mô mềm xốp)

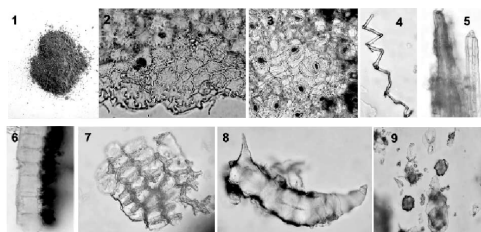
Vi phẫu cuống lá có mặt trên có hai tai nhỏ và mặt dưới lõm tròn bao gồm biểu bì, mô dày góc, mô mềm khuyết, hệ thống dẫn hình cung với gỗ ở trên và libe ở dưới, mạch gỗ, mô mềm gỗ, thể cứng và tinh thể calci oxalat hình cầu gai.

Vi phẫu thịt lá có biểu bì trên, biểu bì dưới, lỗ khí, mô mềm giậu, mô mềm xốp và tinh thể calci oxalat hình cầu gai.

Đặc điểm vi học cho thấy loài *Camellia hakodae* có vùng gân lá nổi bật dày gấp 4 - 5 lần và vùng thịt lá cùng nhiều tinh thể calci oxalat hình cầu gai so với loài đã nghiên cứu trước đó *Camellia flava*.

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 5 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 có lỗ khí; 4. Mảnh mạch xoắn; 5. Bó sợi; 6. Mảnh mô mềm giậu; 7. Mảnh mô mềm; 8. Thể cứng; 9. Tinh thể calci oxalat hình cầu gai

Bột dược liệu của loài này tương đối giống với bột dược liệu của loài *Camellia flava*.

Nhìn chung, đặc điểm về kích thước lá to của loài (có thể lên đến 28 – 30 cm) là một đặc điểm nổi bật, không những giúp phân biệt giữa các loài trà hoa vàng với nhau mà còn là một dấu hiệu giúp nhận diện và dự đoán tên khoa học một cách dễ dàng và chính xác hơn. Ngoài ra, các đặc điểm về lá nhẵn có mép răng cưa, bầu nhụy không lông phù hợp với mô tả hình thái thực vật của loài *Camellia hakodae* Ninh theo 3 tài liệu tham khảo. [1, 10, 11]. Vì vậy, có thể dự đoán tên khoa học của loài là *Camellia hakodae* Ninh.

3.2. Kết quả giải trình tự gen

Thử nghiệm giải trình tự gen nhằm khẳng định dự

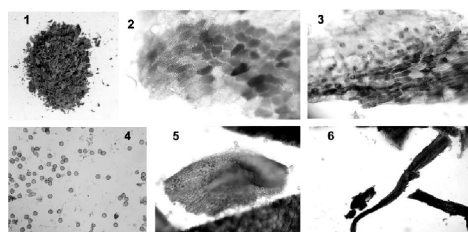
```
TAAGATTACAAATTGACTTATTATACTCCTGACTATGAAACCAAAGATACTGATATCTT
GGCAGCATTCCGAGTAACCTCCGCAACCTGGAGTCCACCTGAAGAAGCAGGGGCCGCG
GTAGCTGCCGAATCTTCTACTGGTACATGGACAACCTGTGTGGACCGATGGACTTACTAG
CCTTGATCGTTACAAAGGGCGATGCTACCACATCGAGCCCCTTGCTGGAGAAGAAAAGT
CAATTTATTGCTTATGTAGCGTATCCTTTAGACCTTTTTGAAGAAGGTTCTGTTACTAAC
ATGTTTACTTCCATTGTGGGTAATGTATTTGGGTTCAAAGCCCTGCGCGCTCTACGTCT
GGAAGATCTCGCAATCCCTACTGCGTATGTTAAAACCTTTCCAAGGACCGCTCATGGC
ATCCAAGTTGAAAGAGATAAATTGAACAAGTATGGTCGTCCTGTTGGGATGTACTA
TAAACCTAAATTGGGGTTATCTGCTAAAACCTACGGAAGAGCAGTTTATGAATGTCTC
CGCGGTGGACTTGATTTTAC
```

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

Nghiên cứu đã khuếch đại vùng gen matK và ghi nhận đoạn gen phân lập được có chiều dài 600bp so với vùng rbcL với kết quả 730 bp đã thực hiện ở *Camellia flava*. Cả 2 loài đều cho kết quả tương thích về tên khoa học trên ngân hàng gen NCBI.

3.3. Kết quả xác định hàm lượng polyphenol toàn phần

Hàm lượng polyphenol toàn phần được xác định bằng phản ứng với thuốc thử Folin-Ciocalteu. Acid gallic được sử dụng làm chất đối chiếu, trong khoảng nồng độ 10,0 đến 50,0 µg/ml. Phép định lượng có phương trình hồi quy là: $y = 0,0107x + 0,0301$, và $R^2 = 0,9994$; trong



Hình 4. Đặc điểm bột hoa loài nghiên cứu

1. Bột hoa; 2. Mảnh biểu bì lá đài; 3. Mảnh biểu bì cánh hoa; 4. Hạt phấn; 5. Mảnh bao phấn; 6. Mảnh chỉ nhị

đoán tên khoa học từ đặc điểm hình thái. Mẫu lá được chiết tách DNA và khuếch đại một phần vùng gen matK. 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 matK phân lập được từ mẫu nghiên cứu có chiều dài 600 bp.

Kết quả so sánh đoạn matK của mẫu thử loài nghiên cứu với mẫu đối chứng loài *Camellia hakodae* Ninh [mã số KR140092.1, 2015] 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 hakodae* Ninh, thuộc họ trà Theaceae.

đó y là hàm lượng polyphenol toàn phần (mg GAE/g), x là nồng độ mẫu thử (µg/ml). Mẫu cao thử được pha đến nồng độ thử là 400 µg/ml. Polyphenol toàn phần có trong cao lá *C. hakodae* được có hàm lượng là $55,16 \pm 0,02$ mg GAE/g.

Chưa có công trình nghiên cứu về hàm lượng polyphenol toàn phần của loài *Camellia hakodae* phân bố trong tự nhiên. So sánh với hàm lượng polyphenol toàn phần của loài *Camellia flava* trồng tại Tây Nguyên ($104,36 \pm 0,03$ mg GAE/g), hàm lượng trong loài nghiên cứu thấp hơn 2 lần [3]. Tuy nhiên, khi 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* [12], hàm lượng polyphenol toàn phần trong loài *Camellia hakodae* cao hơn đáng kể (55,16 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 $AlCl_3$. Quercetin được sử dụng làm chất đối chiếu, với nồng độ sử dụng trong khoảng từ 3,125 đến 100,000 μ 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 (μ g/ml). Mẫu cao thử có nồng độ là 20 mg/ml trong methanol. Flavonoid toàn phần có trong cao lá *Camellia hakodae* được tính toán được là $2,92 \pm 0,26$ mg QE/g.

Chưa có công trình nghiên cứu về hàm lượng flavonoid toàn phần của loài *Camellia hakodae* phân bố trong tự nhiên. So sánh với hàm lượng flavonoid toàn phần của loài *Camellia flava* trồng tại Tây Nguyên ($14,49 \pm 0,28$ mg QE/g), hàm lượng trong loài nghiên cứu thấp hơn gần 7 lần [3]. Tuy nhiên, khi so sánh kết quả với nghiên cứu của Song và cộng sự (2011) trên 6 loài trà hoa vàng thu hái ở Vườn Trà Hoa Vàng (Quảng Tây, Trung Quốc) vào tháng 1 năm 2008, hàm lượng flavonoid toàn phần của loài *Camellia hakodae* thấp hơn so với loài *Camellia impressinervis* nhưng cao hơn 5 loài THV còn lại [12].

3.5. Đánh giá tác dụng chống oxy hóa

Tác dụng chống oxy hóa của mẫu cao lá được xác định dựa vào IC_{50} hoặc EC_{50} . Cao lá được hòa tan trong methanol thành dãy dung dịch có nồng độ thích hợp. Bảng 1 trình bày IC_{50} và 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

	IC_{50} DPPH (μ g/ml)	IC_{50} ABTS (μ g/ml)	EC_{50} (μ g/ml)
Acid ascorbic	8,12	57,54	279,25
Cao lá	63,88	619,92	219,55

So sánh với công trình nghiên cứu sàng lọc hoạt tính chống oxy hóa bằng mô hình bắt gốc tự do DPPH trên loài *Camellia nitidissima* của tác giả Ninh và cộng sự năm 2010, kết quả IC_{50} của cao lá loài *Camellia hakodae* thấp hơn rất nhiều lần so với kết quả của nghiên cứu đã công bố ($IC_{50} = 410$ μ g/ml) [13]. Kết quả thử nghiệm hoạt tính chống oxy hóa trên 2 mô hình còn lại cho thấy mẫu cao lá bắt gốc tự do ABTS kém hơn

chúng đương acid ascorbic khá nhiều, nhưng khả năng khử các chất oxy hóa lại tốt hơn chúng đương. Từ kết quả thực nghiệm, kết luận loài *Camellia hakodae* có tác dụng chống oxy hóa.

Đối sánh với nghiên cứu về hoạt tính chống oxy hóa trên *Camellia flava*, thực nghiệm cho thấy IC_{50} của *Camellia hakodae* gấp khoảng 1,5 lần trên 2 mô hình DPPH và ABTS cũng như giá trị EC_{50} gấp 2,5 lần theo đánh giá tổng năng lực khử [3].

3.6. Đánh giá khả năng ức chế hoạt tính enzym α -amylase

Tác dụng ức chế hoạt tính enzym α -amylase của cao lá và acarbose được xác định dựa vào sự giảm độ hấp thụ quang của phức chất tinh bột – iod. IC_{50} được xác định từ phương trình hồi quy tuyến tính cho thấy tác dụng ức chế hoạt tính enzym α -amylase của mẫu chứng đương acarbose và cao lá với IC_{50} lần lượt là 0,06 và 0,64 mg/ml.

Kết quả đánh giá tác dụng ức chế enzym α -amylase cho thấy mẫu cao lá ức chế hoạt tính enzym kém hơn chứng đương acarbose khoảng 10 lần. Tuy nhiên, IC_{50} này vẫn tương đối thấp nên có thể kết luận loài *Camellia hakodae* có khả năng ức chế hoạt tính enzym α -amylase.

Hiện chưa có công bố về hoạt tính ức chế enzyme α -amylase của loài *Camellia hakodae*, thực nghiệm ghi nhận tiềm năng ức chế tốt hơn so với *Camellia flava* trước đó (IC_{50} trên cao lá là 0,69 mg/ml), định hướng cho hoạt tính hỗ trợ điều trị đái tháo đường.

4. KẾT LUẬN

Mẫu trà hoa vàng trồng tại vùng Tây Nguyên của nghiên cứu này đã được xác định tên khoa học là *Camellia hakodae* theo các tài liệu đối chứng. Hàm lượng polyphenol và flavonoid toàn phần trong lá được xác định lần lượt là $55,16 \pm 0,02$ mg GAE/g được liệu và $2,92 \pm 0,06$ mg QE/g được liệu. Kết quả nghiên cứu ghi nhận mẫu thử cao lá có tác dụng chống oxy hóa với giá trị IC_{50} (EC_{50}) trên 3 mô hình thử nghiệm lần lượt là 63,88; 619,92 và 219,55 μ g/ml. Hoạt tính ức chế hoạt tính enzym α -amylase cũng được ghi nhận với IC_{50} là 0,64 mg/ml.

Những kết quả nghiên cứu này sẽ bổ sung dữ liệu khoa học cho loài *Camellia hakodae* và mở đầu cho những nghiên cứu chuyên sâu hơn.

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

1. 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.
2. He D, Li X, Sai X, et al (2018), “*Camellia nitidissima* CW Chi: a review of botany, chemistry, and pharmacology”. *Phytochem Rev*, 17(2), pp.327-349.
3. Trương Minh Nhật, Nguyễn Hoàng Thảo My, Nguyễn Hữu Lạc Thủy (2022), “Định danh, sơ bộ xác định thành phần và tác dụng của loài trà hoa vàng (*Camellia flava*) trồng tại Tây Nguyên”, *Tạp chí Kiểm nghiệm thuốc*, 20(77), tr. 12-18.
4. 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*. 2005:10.
5. Chatatikun M. , Chiabchalarad 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.
6. Kedare S. B. , Singh R. (2011), “Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay”, *J Food Sci Tech*. 48(4), pp.412-422.
7. 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.
8. 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.
9. Akkarachiyasit S., Charoenlertkul P., Yibchok-Anun S. et al. (2010), “Inhibitory activities of cyanidin and its glycosides and synergistic effect with acarbose against intestinal α -glucosidase and pancreatic α -amylase”, *Int J Mol Sci*, 11(9), pp.3387-3396.
10. Ninh T. , Ninh L. (2014), “The yellow Camellias of the Tam Dao National Park”, *Int Camellia J*, (45), pp.122-128.
11. Trần Ninh, Hakoda, (2010), “Các loài trà ở vườn Quốc gia Tam Đảo”, *Dự án quản lý vườn quốc gia Tam Đảo và vùng đệm*, 30.
12. Song L., Wang X., Zheng X. et al (2011), “Polyphenolic antioxidant profiles of yellow camellia” *Food Chem*, 129(2), pp.351-357.
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 hakodae in Tay Nguyen province was described in detail morphological and anatomical characteristics. The total phenolic and flavonoid content in the leaves' extract were found as 55.16 ± 0.02 mg GAE/g và 2.92 ± 0.06 mg QE/g, respectively. Moreover, the ethanol extract of leaves performed brilliantly the antioxidant activities (DPPH assay: $IC_{50} = 63.88$ μ g/ml; ABTS assay: $IC_{50} = 619.92$ μ g/ml; and total reducing power: $EC_{50} = 219.55$ μ g/ml) and inhibited alpha amylase ($IC_{50} = 0.64$ mg/ml).

(Ngày nhận bài: 04/01/2022; Ngày phản biện: 26/05/2022; Ngày duyệt đăng: 04/11/2022)

THUỐC KHÔNG ĐẠT CHẤT LƯỢNG ĐÃ ĐƯỢC BỘ Y TẾ XỬ LÝ TỪ 01/06/2022 ĐẾN 30/11/2022

NGUYỄN MAI QUYÊN

Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương

Để tăng cường giám sát các cơ sở sản xuất, kinh doanh trong việc thực hiện thu hồi thuốc vi phạm chất lượng, đồng thời giúp cho các đồng nghiệp có thêm thông tin về những hoạt chất và các tên thuốc cần lưu ý về chất lượng, chúng tôi tập hợp danh mục các thuốc vi phạm chất lượng từ 01/06/2022 đến 30/11/2022 mà Bộ Y tế đã ra văn bản thông báo thuốc giả, thuốc bị thu hồi, rút số đăng ký gồm: 34 thuốc bị thu hồi, 12 thuốc giả và 49 thuốc rút số đăng ký.

(Chi tiết về danh mục thuốc xin xem ở website <https://nidqc.gov.vn>)

MỤC LỤC

	<i>Trang</i>
• Nghiên cứu khoa học	
- Xây dựng bộ dữ liệu hình ảnh soi bột và sắc ký lớp mỏng của 5 dược liệu Ngưu tất, Phòng phong, Xuyên khung, Hoàng cầm và Hoàng kỳ. <i>VÕ THỊ HƯỜNG, NGUYỄN THỊ LIÊN</i>	1
- Xây dựng và thẩm định quy trình định lượng đồng thời rupatadine, methylparaben và propylparaben trong siro bằng phương pháp sắc ký lỏng pha đảo. <i>KIM NGOC ĐỨC, NGUYỄN LÂM HỒNG, NGUYỄN THỊ VÂN, NGUYỄN VĂN BÌNH, LÊ QUANG THẢO</i>	6
- Xây dựng qui trình định lượng ketamin và một số thuốc dùng làm chất độn trong nước thải bằng GC-MS/MS nhằm truy nguyên cơ sở sản xuất ketamin. <i>NGUYỄN THỊ THUY LINH, VŨ NGÂN BÌNH, ĐẶNG THỊ NGỌC LAN, TRẦN NGUYỄN HẠ TRƯƠNG MẠNH CƯỜNG, NGUYỄN XUÂN TRƯỜNG, PHẠM THỊ THANH HẠ</i>	12
- Xây dựng và thẩm định phương pháp LC-MS/MS định lượng đồng thời clopidogrel, aspirin và acid salicylic trong huyết tương người. <i>HOÀNG VĂN ĐỨC, TẠ MẠNH HÙNG, TRẦN HOÀNG, PHẠM THANH HUYỀN, PHAN THỊ NGHĨA</i>	19
- Định danh, sơ bộ xác định thành phần và tác dụng của lá trà hoa vàng (<i>Camellia Hakodae</i>) trồng tại Tây Nguyên. <i>NGUYỄN HOÀNG THẢO MY, TRƯƠNG MINH NHỰT, NGUYỄN ĐỨC TUẤN, NGUYỄN HỮU LẠC THUY</i>	26
• Thông tin khoa học - Tin tức	
- Thuốc giả, thuốc không đạt chất lượng bị thu hồi và thuốc đã được Bộ Y tế rút số đăng ký từ 01/6/2022 đến 31/11/2022. <i>NGUYỄN MAI QUYÊN</i>	31

CONTENTS

	<i>Page</i>
• Scientific researches	
- Construction of a dataset of powder microscopic and thin layer chromatography images of 5 standard medicinal herbs: <i>Radix Achyranthis bidentatae</i> , <i>Radix Saposhnikovia divaricatae</i> , <i>Radix Ligustici wallichii</i> , <i>Radix Scutellariae</i> , and <i>Radix Astragali membranacei</i> . <i>VO THI HUONG, NGUYEN THI LIEN</i>	1
- Development of a reversed-phase HPLC method for simultaneous determination of rupatadin, methylparaben and propylparaben in the studied syrup. <i>KIM NGOC DUC, NGUYEN LAM HONG, NGUYEN THI VAN, NGUYEN VAN BINH, LE QUANG THAO</i>	6
- Method development for determination of ketamin and some diluents in wastewater using GC-MS/MS for investigating illegal ketamin manufacture. <i>NGUYEN THI THUY LINH, VU NGAN BINH, DANG THI NGOC LAN, TRAN NGUYEN HA, TRUONG MANH CUONG, NGUYEN XUAN TRUONG, PHAM THI THANH HA</i>	12
- Development and validation a LC-MS/MS for simultaneous determination of clopidogrel, aspirin and salicylic acid in human plasma. <i>HOANG VAN DUC, TA MANH HUNG, TRẦN HOÀNG, PHẠM THANH HUYEN, PHAN THI NGHIA</i>	19
Identification, chemical determination, and evaluation bioactivities leaves of <i>Camellia hakodae</i> in Tay Nguyen province. <i>NGUYEN HOANG THAO MY, TRUONG MINH NHUT, NGUYEN DUC TUAN, NGUYEN HUU LAC THUY</i>	26
• Technical information - News	
- Counterfeit drugs, substandard pharmaceuticals were recalled and drug licenses were withdrew from June 2022 to November 2022 according to Decisions of Ministry of Health. <i>NGUYEN MAI QUYEN</i>	31