

Xây dựng quy trình định lượng acid asperulosidic trong thuốc bột từ bài thuốc hỗ trợ điều trị thoái hóa cột sống của lương y Nguyễn Thiện Chung bằng phương pháp HPLC

Nguyễn Hữu Mai Linh¹, Phạm Ngọc Thạc², Huỳnh Trần Quốc Dũng², Võ Thanh Hóa³,
Phan Thanh Dũng¹, Nguyễn Đức Hạnh^{1*}

¹Khoa Dược, Trường Đại học Y Dược TP Hồ Chí Minh, 41 Đinh Tiên Hoàng, phường Bến Nghé, quận 1, TP Hồ Chí Minh, Việt Nam

²Bệnh viện Y học Cổ truyền TP Hồ Chí Minh, 179 Nam Kỳ Khởi Nghĩa, phường Võ Thị Sáu, quận 3, TP Hồ Chí Minh, Việt Nam

³Khoa Y, Đại học Quốc gia TP Hồ Chí Minh, đường Hải Thượng Lãn Ông, phường Đông Hòa, TP Dĩ An, tỉnh Bình Dương, Việt Nam

Ngày nhận bài 7/7/2022; ngày chuyển phản biện 11/7/2022; ngày nhận phản biện 25/7/2022; ngày chấp nhận đăng 29/7/2022

Tóm tắt:

Bài thuốc hỗ trợ điều trị thoái hóa cột sống của lương y Nguyễn Thiện Chung (gọi là BT) gồm 13 vị thuốc đã được chứng minh có tác dụng giảm đau, kháng viêm trên động vật và đã được phát triển thành dạng thuốc bột. Nghiên cứu này được thực hiện nhằm xây dựng phương pháp định lượng acid asperulosidic, chất điểm chỉ trong thuốc bột BT, bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC). Các điều kiện xử lý mẫu thử và điều kiện HPLC định lượng được nghiên cứu lựa chọn. Quy trình định lượng đã được thẩm định theo hướng dẫn của Hội đồng quốc tế về hài hòa các yêu cầu kỹ thuật đối với dược phẩm dùng cho người (ICH) về tính tương thích hệ thống, độ đặc hiệu, tính tuyến tính, độ chính xác và độ đúng. Methanol được chọn làm dung môi để chuẩn bị mẫu thử và tỷ lệ giữa thuốc bột BT và methanol là 300:25 (mg/ml). Điều kiện HPLC được chọn để định lượng acid asperulosidic gồm cột C18 Shimpack GIST (250×4,6 mm, 5 μm), bước sóng phát hiện 236 nm, nhiệt độ cột 30°C, tốc độ dòng 1 ml/phút và thể tích tiêm 10 μl. Pha động là hỗn hợp của acetonitril và H₃PO₄ 0,1% với tỷ lệ 9,5:90,5 (tt/tt). Phương pháp định lượng cho thấy sự tương quan tuyến tính cao giữa diện tích pic và nồng độ acid asperulosidic ($r^2=0,9987$). Giá trị độ lệch chuẩn tương đối (RSD) của độ chính xác trung gian là 1,24%. Tỷ lệ phục hồi trong khoảng 91,22-99,76%. Quy trình định lượng acid asperulosidic trong thuốc bột BT đáp ứng các yêu cầu thẩm định và có thể được áp dụng để xây dựng tiêu chuẩn và theo dõi chất lượng của thuốc bột BT.

Từ khóa: acid asperulosidic, bài thuốc thoái hóa cột sống, định lượng, HPLC, thuốc bột.

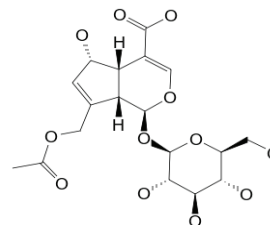
Chỉ số phân loại: 3.5

1. Đặt vấn đề

Bài thuốc thoái hóa cột sống của lương y Nguyễn Thiện Chung gồm 13 dược liệu (Mã đề, Cối xay, Cỏ tranh, Dây măng bát, Râu mèo, Ý dĩ, Cỏ xước, Nhàu, Đùng đỉnh, Mía dò, Rau bợ, Mướp gai, Đinh lăng lá xẻ) đã được chứng minh có tác dụng giảm đau và kháng viêm trên chuột [1]. Bài thuốc đã được nghiên cứu điều chế thành công dưới dạng cao khô và xây dựng phương pháp định tính và định lượng các chất điểm chỉ [2, 3]. Với mục tiêu tạo thuận tiện cho người sử dụng, cao khô BT đã được tiếp tục nghiên cứu phát triển thành dạng thuốc bột BT, sử dụng các tá dược cải thiện tính trơn chảy gồm maltodextrin và dextrose với tỷ lệ cao khô trong thuốc bột là 30%.

Acid asperulosidic (hình 1) là chất điểm chỉ quan trọng của cao khô BT [2, 3]. Vì vậy, việc nghiên cứu xây dựng quy trình định lượng acid asperulosidic trong thuốc bột từ BT để kiểm soát chất lượng và xây dựng tiêu chuẩn cơ sở sản phẩm thuốc bột BT là nghiên cứu mang tính cấp thiết. Nghiên cứu này được thực hiện với mục tiêu xây dựng và thẩm định quy trình định lượng acid asperulosidic thuốc bột từ BT bằng phương pháp HPLC.

*Tác giả liên hệ: Email: duchanh@ump.edu.vn



Hình 1. Cấu trúc hóa học của acid asperulosidic.

2. Nguyên liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Nguyên liệu

Thuốc bột BT, acid asperulosidic (hàm lượng 97,41%) được cung cấp bởi Khoa Dược, Trường Đại học Y Dược TP Hồ Chí Minh. CHCl₃ và H₂SO₄ đạt tiêu chuẩn phân tích (Trung Quốc). Methanol và H₃PO₄ đạt tiêu chuẩn phân tích (Merck, Đức). Acetonitril (Scharlau, Tây Ban Nha) và nước cất 2 lần đạt tiêu chuẩn dùng cho HPLC.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Khảo sát quy trình xử lý mẫu: Sử dụng phương pháp sắc ký lớp mỏng (SKLM) để khảo sát chọn dung môi chiết xuất acid asperulosidic trong BT với điều kiện khảo sát như sau:

Development of an HPLC method for asperulosidic acid quantification in the powder prepared from the spinal degeneration remedy of physician

Nguyen Thien Chung

Huu Mai Linh Nguyen¹, Ngoc Thac Pham²,
Tran Quoc Dung Huynh², Thanh Hoa Vo³,
Thanh Dung Phan¹, Duc Hanh Nguyen^{1*}

¹Faculty of Pharmacy, University of Medicine and Pharmacy at Ho Chi Minh City,
41 Dinh Tien Hoang Street, Ben Nghe Ward, District 1, Ho Chi Minh City, Vietnam

²Traditional Medicine Hospital - Ho Chi Minh City,

179 Nam Ky Khoi Nghia Street, Vo Thi Sau Ward, District 3, Ho Chi Minh City, Vietnam

³School of Medicine, Vietnam National University - Ho Chi Minh City,

Hai Thuong Lan Ong Street, Dong Hoa Ward, Di An City, Binh Duong Province, Vietnam

Received 7 July 2022; revised 25 July 2022; accepted 29 July 2022

Abstract:

Nguyen Thien Chung's remedy which consists of 13 medicinal herbs had been demonstrated its analgesic and anti-inflammatory effects on animal experiments. This remedy has further been developed into powder form. This study was conducted to develop a method to quantify asperulosidic acid, the important marker in BT powder, by high-performance liquid chromatography (HPLC). Sample processing conditions and quantitative HPLC conditions were screened. The HPLC method was validated according to the International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use (ICH) guidelines for system suitability, specificity, linearity, precision and accuracy. Methanol was chosen as the solvent for sample preparation and the ratio between BT powder and methanol was 300:25 (mg/ml). The selected HPLC conditions included a C18 Shimpack GIST column (250×4.6 mm, 5 μm), a detection wavelength of 236 nm, a column temperature of 30°C, a flow rate of 1 ml/min, and an injection volume of 10 μl. The mobile phase was a mixture of acetonitrile and 0.1% H₃PO₄ with a ratio of 9.5:90.5 (v/v). The quantitative method showed a good linear correlation between the peak area and the concentration of asperulosidic acid ($r^2=0.9987$). The Relative standard deviation (RSD) value of the intermediate precision was 1.24%. The recovery was found in a range of 91.22-99.76%. The HPLC method for asperulosidic acid quantification in BT powder met the validation requirements and could be applied to standardise and evaluate the quality of BT powder.

Keywords: asperulosidic acid, HPLC, powder, quantitation, the spinal degeneration remedy.

Classification number: 3.5

- Dung dịch đối chiếu gốc: Cân 3 mg chất chuẩn acid asperulosidic, cho vào bình định mức 10 ml. Thêm 9 ml methanol, siêu âm 15 phút, để nguội đến nhiệt độ phòng, bổ sung methanol đến vạch, lắc đều.

- Dung dịch đối chiếu: Cho 1 ml dung dịch đối chiếu gốc vào bình định mức 10 ml, bổ sung methanol đến vạch, lắc đều. Dung dịch acid asperulosidic đối chiếu có nồng độ 30 μg/ml trong methanol.

- Dung dịch thử: Cân 500 mg thuốc bột BT, cho vào bình định mức 25 ml. Thêm 20 ml methanol, siêu âm 30 phút, để nguội đến nhiệt độ phòng, bổ sung methanol đến vạch, lắc đều, lọc. Tiến hành tương tự với các dung môi ethanol, acetonitril và nước.

Triển khai SKLM với hệ dung môi triển khai CH₃Cl - MeOH - H₂O (60:40:10, lớp dưới) và phát hiện bằng thuốc thử H₂SO₄ 10% trong ethanol (sấy ở 105°C). Chọn dung môi chiết được nhiều acid asperulosidic nhất để chuẩn bị mẫu thử.

Khảo sát chọn tỷ lệ thuốc bột BT và dung môi chuẩn bị mẫu thử: Dùng dung môi chiết xuất được chọn để khảo sát và chọn tỷ lệ thuốc bột BT và dung môi chuẩn bị mẫu thử. Tiến hành thực nghiệm với 2 tỷ lệ thuốc bột BT và dung môi như sau:

- Tỷ lệ 1: Cân chính xác 300 mg thuốc bột BT và chiết với 25 ml dung môi được chọn.

- Tỷ lệ 2: Cân chính xác 300 mg thuốc bột BT và chiết với 50 ml dung môi được chọn.

Chiết xuất bằng phương pháp siêu âm trong 30 phút, chuẩn bị 3 mẫu thử riêng biệt cho mỗi tỷ lệ. Kiểm tra hiệu suất chiết acid asperulosidic của 2 tỷ lệ khảo sát bằng phương pháp HPLC theo điều kiện sắc ký được chọn. Chọn tỷ lệ có thể tích dung môi chiết thấp và chiết được tối đa chất điểm chỉ acid asperulosidic.

Khảo sát điều kiện HPLC định lượng acid asperulosidic trong thuốc bột BT: Sử dụng hệ thống sắc ký Shimadzu LC-2030C 3D plus, detector PDA (Nhật Bản), cột sắc ký C18 Shimpack GIST (250×4,6 mm, 5 μm) và tiền cột HQ105C18 (10×4,6 mm, 5 μm) (Thermo Scientific, Mỹ), nhiệt độ cột 30°C, bước sóng phát hiện 236 nm, thể tích tiêm mẫu 10 μl. Thăm dò một số chương trình pha động (bảng 1). Chọn điều kiện HPLC sao cho pic acid asperulosidic tách hoàn toàn khỏi các pic tạp trong mẫu thử và các thông số sắc ký đạt yêu cầu.

Bảng 1. Pha động khảo sát điều kiện HPLC định lượng acid asperulosidic trong thuốc bột BT.

Điều kiện pha động	% acetonitril	% dung dịch H ₃ PO ₄ 0,1%
I	10	90
II	9,5	90,5

Thẩm định quy trình định lượng acid asperulosidic trong thuốc bột BT: Quy trình định lượng acid asperulosidic trong thuốc bột BT được thẩm định theo hướng dẫn của ICH về tính tương thích hệ thống, tính đặc hiệu, tính tuyến tính, độ chính xác và độ đúng [4].

3. Kết quả và bàn luận

3.1. Khảo sát quy trình xử lý mẫu

Khảo sát dung môi chiết xuất acid asperulosidic trong mẫu thử: Kết quả SKLM phân tích thành phần dịch chiết thuốc bột BT khi chiết xuất bằng 4 dung môi khác nhau (nước, methanol, acetonitril, ethanol 96%) được trình bày ở hình 2.



Hình 2. SKLM khảo sát thành phần các dịch chiết thuốc bột BT. ACN: dịch chiết acetonitril; Et: dịch chiết ethanol 96%; Me: dịch chiết methanol; N: dịch chiết nước; Asp: dung dịch acid asperulosidic đối chiếu.

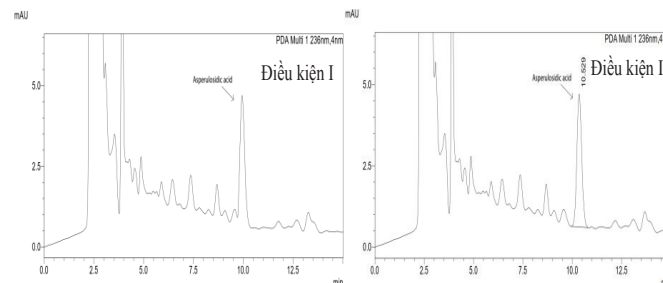
Kết quả SKLM cho thấy, ethanol 96%, methanol và nước đều chiết được acid asperulosidic. Acetonitril hầu như không chiết được chất điểm chỉ acid asperulosidic. Methanol là dung môi cho vết acid asperulosidic trong thành phần dịch chiết đậm nhất, chứng tỏ methanol là dung môi chiết được nhiều acid asperulosidic nhất. Vì vậy, methanol được chọn làm dung môi chiết xuất acid asperulosidic từ thuốc bột BT để điều chế mẫu thử.

Khảo sát chọn tỷ lệ thuốc bột BT và dung môi chuẩn bị mẫu thử: Bảng 2 trình bày hàm lượng acid asperulosidic xác định được với 2 tỷ lệ thuốc bột BT và methanol khảo sát. Phân tích thống kê cho thấy, lượng acid asperulosidic chiết được với 2 tỷ lệ khảo sát khác nhau không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$). Như vậy, với cùng một lượng thuốc bột BT, khi tăng gấp đôi lượng dung môi methanol chiết xuất, lượng acid asperulosidic chiết được không tăng thêm. Vậy, dung môi methanol với tỷ lệ thuốc bột BT và methanol (300:25) được chọn làm điều kiện chiết xuất acid asperulosidic trong phương pháp chuẩn bị mẫu thử định lượng acid asperulosidic trong thuốc bột BT.

Bảng 2. Hàm lượng acid asperulosidic xác định được với 2 tỷ lệ thuốc bột BT:methanol khảo sát.

Tỷ lệ thuốc bột BT và methanol (mg/ml)	Hàm lượng acid asperulosidic trong thuốc bột BT (%; kl/kl)
300:25	0,0967±0,0004
300:50	0,0962±0,0010

Khảo sát điều kiện HPLC định lượng acid asperulosidic trong thuốc bột BT: Kết quả HPLC khảo sát các chương trình pha động định lượng acid asperulosidic trong mẫu thử được trình bày trong hình 3.



Hình 3. Sắc ký đồ HPLC phân tích mẫu thử thuốc bột BT với các chương trình pha động khảo sát.

Kết quả hình 3 cho thấy, điều kiện sắc ký I không tách được pic acid asperulosidic. Điều kiện sắc ký II cho pic acid asperulosidic trên sắc ký đồ đạt yêu cầu đối với pic định lượng trong phương pháp phân tích HPLC. Vì vậy, điều kiện sắc ký II được chọn để định lượng acid asperulosidic trong mẫu thử thuốc bột BT.

3.2. Quy trình định lượng acid asperulosidic trong thuốc bột BT

Mẫu chuẩn: Cân 1 mg acid asperulosidic chuẩn vào bình định mức 10 ml, thêm 7 ml methanol, siêu âm 15 phút, để nguội, bổ sung methanol đến vạch, lắc đều, lọc qua màng lọc 0,22 µm.

Mẫu thử: Cân 300 mg thuốc bột BT cho vào bình định mức 25 ml. Thêm 23 ml methanol, siêu âm 30 phút, để nguội đến nhiệt độ phòng, bổ sung methanol đến vạch, lắc đều, lọc qua màng lọc 0,22 µm.

Điều kiện HPLC: Máy HPLC Shimadzu LC-2030C 3D Plus, detector PDA (Nhật Bản), cột C18 Shimpack GIST (250×4,6 mm, 5 µm), bước sóng phát hiện 236 nm, nhiệt độ cột 30°C, tốc độ dòng 1 ml/phút, thể tích tiêm mẫu 10 µl. Pha động gồm acetonitril và dung dịch H₃PO₄ 0,1% với tỷ lệ 9,5:90,5.

Hàm lượng acid asperulosidic (%) trong thuốc bột BT được tính theo công thức sau:

$$X(\%) = \frac{S_t \times C \times 25}{S_c \times m_t} \times a \times 100$$

trong đó: S_t, S_c: diện tích pic acid asperulosidic của mẫu thử và mẫu chuẩn; C: nồng độ dung dịch acid asperulosidic chuẩn (mg/ml); m_t: khối lượng cân của mẫu thử (đã trừ độ ẩm) (mg); a: hàm lượng của acid asperulosidic chuẩn.

3.3. Thẩm định quy trình định lượng acid asperulosidic trong thuốc bột BT

Tính tương thích hệ thống: Chuẩn bị dung dịch thử bằng cách cân 300 mg thuốc bột BT vào bình định mức 25 ml. Thêm 23 ml methanol, siêu âm 30 phút, để nguội đến nhiệt

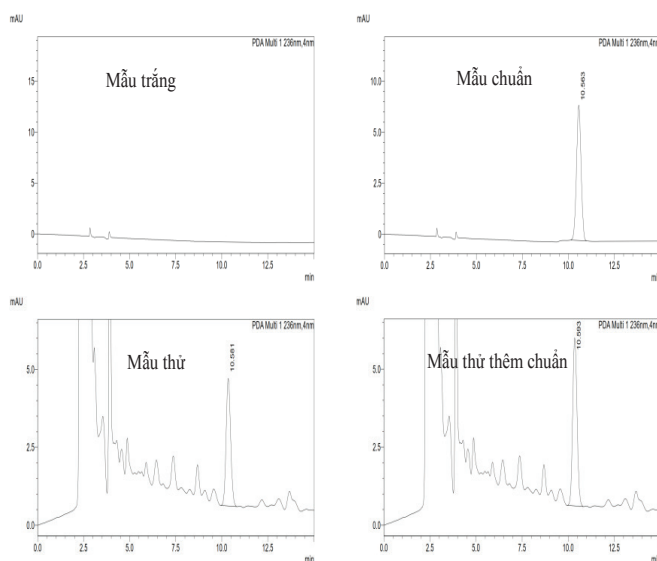
độ phòng, bổ sung methanol đến vạch, lắc đều, lọc qua màng lọc 0,22 μm .

Cân bằng cột bằng pha động ít nhất 15 phút. Tiêm 6 lần liên tiếp cùng một mẫu dung dịch thử. Kết quả bảng 3 cho thấy, các thông số thời gian lưu, diện tích pic có $\text{RSD} \leq 2\%$. Hệ số bất đối, độ phân giải, số đĩa lý thuyết đạt yêu cầu phân tích. Như vậy, phương pháp HPLC định lượng acid asperulosidic trong thuốc bột BT đạt tính tương thích hệ thống.

Bảng 3. Tính tương thích hệ thống của phương pháp định lượng acid asperulosidic trong thuốc bột BT.

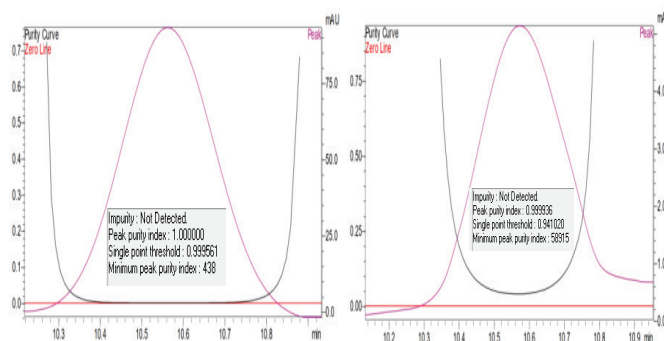
TT	t_r (phút)	S (mAU.s)	Độ phân giải R_{S1}	Độ phân giải R_{S2}	Hệ số bất đối N	N
1	10,565	90853	1,705	1,674	0,992	8027
2	10,482	91126	1,712	1,642	0,986	8113
3	10,338	92709	1,723	1,682	0,977	7954
4	10,417	91011	1,694	1,655	0,954	8239
5	10,526	89532	1,704	1,679	1,003	8412
6	10,493	91665	1,718	1,643	0,995	8125
TB	10,470	91149,33	1,709	1,663	0,985	8145
% RSD	0,78	1,14				
Yêu cầu phân tích	$\text{RSD} < 2\%$	$\text{RSD} < 2\%$	$R_s \geq 1,5$	$R_s \geq 1,5$	$0,8 \leq A_s \leq 1,2$	

Tính đặc hiệu: Hình 4 cho thấy sắc ký đồ của mẫu trắng không có pic xuất hiện trong khoảng thời gian lưu tương ứng với thời gian lưu của pic acid asperulosidic trong mẫu chuẩn (khoảng 10,47 phút). Sắc ký đồ của mẫu thử cho pic có thời gian lưu tương ứng với pic acid asperulosidic trong mẫu chuẩn. Khi thêm chuẩn vào mẫu thử, chiều cao và diện tích pic acid asperulosidic trong mẫu thử tăng.



Hình 4. Sắc ký đồ HPLC khảo sát tính đặc hiệu của quy trình định lượng acid asperulosidic trong thuốc bột BT (t_r của acid asperulosidic là 10,47 phút).

Độ tinh khiết pic của acid asperulosidic trong mẫu chuẩn và mẫu thử đạt yêu cầu (hình 5).

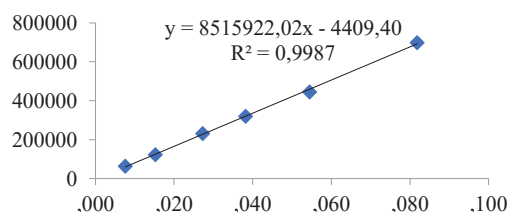


Hình 5. Độ tinh khiết pic của acid asperulosidic trong mẫu chuẩn và mẫu thử.

Tính tuyến tính: Chuẩn bị dung dịch đối chiếu gốc bằng cách cân 5,6 mg chất chuẩn acid asperulosidic, cho vào bình định mức 5 ml. Thêm 4 ml methanol, siêu âm trong 15 phút, để nguội ở nhiệt độ phòng, bổ sung methanol đến vạch, lắc đều. Dung dịch đối chiếu gốc có nồng độ 1,0910 mg/ml. Pha loãng dung dịch đối chiếu gốc trong bình định mức 10 ml bằng methanol thu được các dung dịch chuẩn có nồng độ 0,0076, 0,0153, 0,0273, 0,0382, 0,0545, 0,0818 mg/ml. Kết quả khảo sát mối tương quan giữa diện tích pic và nồng độ acid asperulosidic được trình bày trong bảng 4 và hình 6.

Bảng 4. Tương quan giữa diện tích pic và nồng độ acid asperulosidic.

Nồng độ (mg/ml)	Diện tích pic
0,0076	64942
0,0153	122115
0,0273	233180
0,0382	321569
0,0545	445127
0,0818	700516



Hình 6. Tương quan giữa nồng độ và diện tích pic acid asperulosidic.

Độ chính xác: Chuẩn bị dung dịch thử bằng cách cân chính xác khoảng 300 mg thuốc bột BT vào bình định mức 25 ml. Thêm 23 ml methanol, siêu âm 30 phút, để nguội đến nhiệt độ phòng, bổ sung methanol đến vạch, lắc đều, lọc qua

màng lọc 0,22 μ m. Tiến hành chuẩn bị tương tự 5 mẫu dung dịch thử còn lại.

Tiến hành phân tích 6 mẫu dung dịch thử ở cùng một điều kiện trong ngày 1 và 2. Kết quả khảo sát độ lặp lại và độ chính xác trung gian của quy trình định lượng acid asperulosidic trong thuốc bột BT được trình bày ở bảng 5.

Bảng 5. Độ lặp lại và độ chính xác trung gian của quy trình định lượng.

TT	Ngày 1			Ngày 2		
	Khối lượng cân (mg)	Diện tích pic	Hàm lượng acid asperulosidic trong thuốc bột BT (%)	Khối lượng cân (mg)	Diện tích pic	Hàm lượng acid asperulosidic trong thuốc bột BT (%)
1	300,2	93125	0,0994	300,4	91509	0,0976
2	301,7	91245	0,0969	302,1	92156	0,0978
3	302,8	90448	0,0957	303,2	90237	0,0954
4	298,5	89973	0,0965	298,9	92285	0,0990
5	301,6	92162	0,0979	301,8	91937	0,0976
6	300,5	91125	0,0971	300,8	90264	0,0962
Trung bình			0,0972			0,0973
RSD (%)			1,30			1,31

Kết quả thống kê: $F_{\text{tn}} = 1,003 < F_{0,05} = 5,050 \rightarrow$ Sự khác biệt kết quả thu được giữa 2 ngày khác nhau không có ý nghĩa về mặt thống kê.

Kết quả thống kê độ chính xác trong ngày (độ lặp lại) cũng như ở các ngày phân tích khác nhau (độ chính xác trung gian) cho thấy, hàm lượng trung bình của acid asperulosidic trong thuốc bột BT là 0,0973%, giá trị $RSD < 2\%$, $F_{\text{tn}} < F_{0,05}$, chứng tỏ phương pháp HPLC định lượng acid asperulosidic trong thuốc bột BT có độ chính xác cao.

Giới hạn phát hiện và định lượng: Tiến hành phân tích mẫu chuẩn acid asperulosidic ở nồng độ 40 μ g/ml, sau đó pha loãng dần đến khi dung dịch chuẩn không còn xuất hiện tín hiệu của acid asperulosidic ở nồng độ 0,008 μ g/ml (bảng 6). Tại nồng độ 0,08 μ g/ml ghi nhận tín hiệu $S/N=3$ nên 0,08 μ g/ml là giới hạn phát hiện (LOD) của phương pháp. Giới hạn định lượng (LOQ) $= 3 \times LOD = 3 \times 0,08 = 0,24$ μ g/ml [5].

Bảng 6. Kết quả xác định nồng độ giới hạn LOD.

Nồng độ chuẩn (μ g/ml)	40	10	2	0,4	0,08	0,008
Diện tích pic	340259	85076	14956	2837	786	Không có tín hiệu

Độ đúng: Thêm chất chuẩn acid asperulosidic vào mẫu thử ở các mức 80, 100 và 120% so với nồng độ acid asperulosidic định lượng. Kết quả khảo sát độ đúng được trình bày ở bảng 7.

Bảng 7. Kết quả khảo sát độ đúng của phương pháp định lượng.

Mức nồng độ thêm vào	Lượng chuẩn thêm vào (mg)	Lượng chuẩn thu hồi (mg)	Tỷ lệ hồi phục (%)	Giá trị trung bình
80%	0,22	0,2081	94,58	TB = 93,83% RSD = 2,47%
		0,2105	95,68	
		0,2007	91,22	
100%	0,26	0,2581	99,28	TB = 97,67% RSD = 2,44%
		0,2468	94,94	
		0,2568	98,79	
120%	0,32	0,3192	99,76	TB = 97,89% RSD = 1,9%
		0,3132	97,86	
		0,3074	96,05	

TB: trung bình.

Kết quả bảng 5 cho thấy, hàm lượng trung bình của acid asperulosidic trong thuốc bột BT khoảng 0,0973% (kl/kl). Theo yêu cầu về độ hồi phục và RSD tương ứng với nồng độ chất phân tích, tỷ lệ hồi phục cho phép của phương pháp định lượng acid asperulosidic trong khoảng 90-107% và $RSD < 5,3\%$ [4]. Kết quả bảng 7 cho thấy, quy trình định lượng acid asperulosidic trong thuốc bột BT đạt yêu cầu về độ đúng.

4. Kết luận

Quy trình định lượng acid asperulosidic trong thuốc bột BT gồm quy trình xử lý mẫu thử và quy trình HPLC định lượng acid asperulosidic trong thuốc bột BT đã được nghiên cứu xây dựng thành công. Quy trình định lượng đã được thẩm định đạt các yêu cầu về tính tương thích hệ thống, tính tuyến tính, độ đặc hiệu. Độ chính xác trung gian ($RSD=1,24\%$) và độ đúng của phương pháp định lượng (trong khoảng 91,22-99,76%) đạt yêu cầu.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] N.C. Sang, N.L.T. Tuyen, N.T.K. Oanh, et al. (2020), "Survey of acute toxicity and analgesic and anti-inflammatory effects of medicine by herbalist Nguyen Thien Chung, An Giang province", *Journal of Pharmacology*, **60(529)**, pp.84-88 (in Vietnamese).
- [2] P.N. Thac, N.D. Hanh, N.H.M. Linh, et al (2021), "Developing a qualitative method for some main medicinal herbs in extracts from herbal medicine to support the treatment of spinal degeneration by herbalist Nguyen Thien Chung", *Journal of Pharmacology*, **17(3)**, pp.83-90.
- [3] P.N. Thac, N.D. Hanh, N.H.M. Linh, et al. (2020), "Developing a process for quantifying asperulosidic acid in extracts from herbal medicine Nguyen Thien Chung's degenerative spine medicine using the HPLC method", *Journal of Pharmacology*, **6(10)**, pp.83-89.
- [4] L. Huber (2007), *Validation and Qualification in Analytical Laboratories*, Taylor & Francis, 2nd ed., 303pp.
- [5] ICH Harmonised Tripartite Guideline (2005), *Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2(R1)*, International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, Geneva.