

cho trẻ tại các trường mầm non ở Thành Phố Cần Thơ.

TAI LIU THAM KHAO

1. American Psychiatric Association (2013), Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders 5th Edition, Washington DC, p.50
2. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). (2009). Prevalence of autism spectrum disorders-Autism and developmental disabilities monitoring network United States. 2006. Morbidity and mortality' weekly report. Surveillance summaries (Washington. DC: 2002). 58(WY 1-20)
3. Shaw, K. A., Maenner, M. J., Bakian, A. V., et al (2021) "Early identification of autism spectrum disorder among children aged 4 years—Autism and Developmental Disabilities Monitoring Network. 11 sites, United States, 2018" MMWR Surveillance Summaries, 70(10), 1.DOI:10.15585/mmwr.ss6903a1
4. Trần Thiên Thắng (2019), "Khảo sát tỷ lệ trẻ từ 18-36 tháng có biểu hiện rối loạn phổ tự kỷ tại phòng khám bệnh viện nhi đồng Cần Thơ bằng thang điểm M-Chat", Tạp chí Y Dược Học Cần Thơ, 22-25, tr. 293-304.
5. Thi Vui L, Minh DD, Thuy Quynh N et al. Early screening and diagnosis of autism spectrum disorders in Vietnam: A population based cross-sectional survey. Journal of Public Health Research, 2022;11(2): jphr-2021.DOI: 10.4081/jphr.2021.2460
6. Wieckowski, A. T., Williams, L. N., Rando, et al (2023), "Sensitivity and specificity of the modified checklist for autism in toddlers (Original and Revised): a systematic review and meta-analysis". JAMA pediatrics. DOI:10.1001/jamapediatrics.2022.5975
7. Liu Y. et al (2016), "Knowledge, attitudes, and perceptions of autism spectrum disorder in a stratified sampling of preschool teachers in China", BMC Psychiatry. DOI: 10.15585/mmwr.ss6903a1
8. Nguyễn Minh Phương, Trần Thiên Thắng, Phan Việt Hưng và cộng sự (2021), "khảo sát tỷ lệ trẻ từ 18-36 tháng có biểu hiện rối loạn phổ tự kỷ bằng thang điểm m-chat tại trường mầm non ở thành phố cà mau 2020", Tạp chí Y Học Việt Nam, Tập 502(1) <https://doi.org/10.51298/vmj.v502i1.574>
9. Nguyễn Đức Trí, Trần Diệp Tuấn, (2014), "Nghiên cứu tỷ lệ M-CHAT dương tính Một khảo sát tại cộng đồng trẻ học mầm non từ 16-36 tháng trong Quận Ninh Kiều, thành phố Cần Thơ", Tạp chí nghiên cứu y học TP. Hồ Chí Minh, 18, tr.454-458.
10. Nguyễn Minh Phương, Phan Việt Hưng, Trần Thiên Thắng, Lê Hoàng Mỹ, Thái Huỳnh Ngọc Trần, Võ Văn Thi (2023) "khảo sát tỷ lệ trẻ từ 18 tháng đến 36 tháng có nguy cơ rối loạn phổ tự kỷ bằng thang điểm M-Chat-R/F và một số yếu tố liên quan tại các trường mầm non ở tỉnh cà mau năm 2022" . Tạp chí Y Dược học Cần Thơ, 62, 207-214. <https://doi.org/10.58490/ctump.2023i62.1400>

XÂY DỰNG QUY TRÌNH ĐỊNH LƯỢNG ĐỒNG THỜI MIMOSIN, COIXOL VÀ KALI SORBAT TRONG CAO CHIẾT BÀI THUỐC TỪ DƯỢC LIỆU XẤU HỒ, VÔNG NEM, HẬU PHÁC NAM, CAM THẢO NAM BẰNG SẮC KÝ LỎNG HIỆU NĂNG CAO (HPLC-PDA)

Hứa Hoàng Oanh¹, Nguyễn Thị Thanh Vân¹,
Lê Thị Thanh Nga², Chung Khang Kiệt¹, Phan Văn Hồ Nam¹

TÓM TẮT

Mở đầu: mimosin và coixol là hợp chất có hoạt tính sinh học được lựa chọn làm chất điểm chỉ cho cao chiết bài thuốc điều trị mất ngủ. **Mục tiêu:** xây dựng quy trình định lượng đồng thời mimosin, coixol, kali sorbat trong cao chiết bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao. **Đối tượng và phương pháp nghiên cứu:** Nghiên cứu khảo sát tìm ra điều kiện sắc ký và quy trình xử lý mẫu cho hiệu suất thu hồi chất phân tích cao và ổn định. **Thẩm định quy trình định lượng**

theo Hướng dẫn của ICH. **Kết quả:** đã xây dựng được quy trình định lượng đồng thời ba hợp chất mimosin, coixol và kali sorbat với dung môi chiết HCl 0.2 N, siêu âm trong 20 phút, chiết 2 lần. Cột sắc ký Shimpack GIST C₁₈ (25cm × 4,6mm; 5μm); pha động đẳng dòng chứa acetonitril và đệm natri n-octansulfonat 2 g/L chỉnh pH 1,8 bằng acid phosphoric tỉ lệ (8:92), bước sóng phát hiện 277nm, nhiệt độ buồng cột 40°C, thể tích tiêm 20μl. Quy trình đạt yêu cầu thẩm định theo ICH với khoảng tuyển tính rộng, đạt yêu cầu về độ đúng và độ chính xác theo AOAC. **Kết luận:** quy trình đã xây dựng có thể được áp dụng để kiểm tra chất lượng cao chiết tại cơ sở.

Từ khóa: xấu hổ, cam thảo nam, mimosin, coixol, kali sorbat.

SUMMARY

DEVELOPMENT AND VALIDATION OF A HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY

¹Đại học Y Dược TP.HCM

²Bệnh viện Y học cổ truyền TP.HCM

Chủ trách nhiệm chính: Phan Văn Hồ Nam

Email: phanvanhonam@ump.edu.vn

Ngày nhận bài: 22.9.2023

Ngày phản biện khoa học: 17.11.2023

Ngày duyệt bài: 01.12.2023

METHOD FOR SIMULTANEOUS QUANTIFICATION OF MIMOSINE, COIXOL AND POTASSIUM SORBATE IN HERBAL PREPARATION FROM FOUR HERBS MIMOSA PUDICA, ERYTHRINA VARIEGATA, SCOPARIA DULCIS, CINNAMOMUM INERS

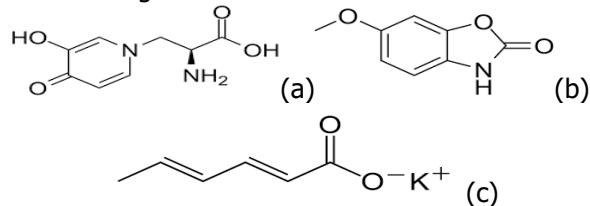
Background: Herbal preparation from four herbs Mimosa pudica, Erythrina variegata, Scoparia dulcis, Cinnamomum iners have sedative effects, treat insomnia, help reduce anxiety and depression effectively. The chemical components present in medicinal herbs such as mimosine and coixol are biologically active substances which is chosen as chemical marker for the herbal extract. Potassium sorbate was added to the formula as preservative ingredient. **Objectives:** This study was conducted to develop a method for simultaneous quantification of mimosine, coixol, potassium sorbate in herbal preparation from four medicinal herbs by high performance liquid chromatography (HPLC). **Method:** Sample preparation methods and HPLC conditions were screened and selected. The quantitation method was validated on its system suitability, specificity, linearity, precision and accuracy. **Results:** Hydrochloride acid 0.2 N was selected as extraction solvent, extraction time is 20 minutes, number of extraction is two times. The optimized HPLC condition employed Shimpack GIST C₁₈ (25 cm × 4.6 mm; 5 µm), a detection wavelength of 277 nm, a column temperature of 40 °C, a flow rate of 1 ml/min, and an injection volume of 20 µl. The mobile phases included acetonitrile and 2.0 g/L sodium n-octanesulfonate adjusted to pH 1.8 by phosphoric acid at ratio 8:92. There was good correlation between peak areas and mimosine, coixol, potassium sorbate concentrations ($r^2 = 0.9997, 0.9999, 0.9996$). The RSD values of within-day and inter-day precision, the recovery percentages met requirements according to AOAC guideline. **Conclusion:** The proposed method could be applied for quality control of the herbal preparation.

Keywords: mimosine, coixol, potassium sorbate, HPLC-PDA, Herba Mimosa pudicae, Herba et Radix Scopariae.

I. ĐẶT VĂN ĐỀ

Mất ngủ là một chứng rối loạn giấc ngủ phổ biến, là một vấn đề sức khỏe cộng đồng. Hiện nay, nghiên cứu tìm kiếm các dược liệu có tác dụng an thần, điều trị mất ngủ đang là vấn đề cấp thiết, giúp cải thiện chất lượng cuộc sống của người bệnh. Bài thuốc có thành phần từ bốn vị thuốc nam là Xấu hổ 20 gram, Vông nem 6 gram, Hậu phác nam 8 gram, Cam thảo nam 16 gram được Bác sĩ Võ Đình Hưng sử dụng điều trị có hiệu quả qua nhiều năm trên bệnh nhân mất ngủ. Một số nghiên cứu cho thấy tác dụng của cây Xấu hổ đối với việc giảm lo âu, trầm cảm, tăng cường trí nhớ. Các nghiên cứu cho thấy Cam thảo nam có tác dụng an thần, giải lo âu. Vông nem có các nghiên cứu cho thấy tác dụng

giải lo âu và chống trầm cảm. Các thành phần hóa học có trong dược liệu từ bài thuốc như mimosin là chất có trong Xấu hổ, coixol là chất có tác dụng sinh học trong Cam thảo nam. Các chất này được sử dụng làm chất điểm chỉ để kiểm nghiệm bài thuốc. Bên cạnh đó, cao chiết có sử dụng chất bảo quản kali sorbat đã được thêm vào với hàm lượng không quá 0,2%, dẫn đến phải kiểm nghiệm giới hạn chất bảo quản. Do đó, chúng tôi tiến hành xây dựng và thẩm định quy trình định lượng đồng thời mimosin, coixol và kali sorbat trong cao chiết bài thuốc.



Hình 1. Cấu trúc hóa học của mimosin (a), coixol (b) và kali sorbat (c)

II. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Nguyên liệu. Cao chiết bài thuốc từ 04 dược liệu Xấu hổ (Herba Mimosae Pudicae), Cam thảo nam (Herba et Radix Scopariae), Hậu phác nam (Cortex Cinnamomi), Vông nem (Folium Erythrinae variegatae) được cung cấp bởi Bệnh viện Y học Cổ truyền TP. HCM, với độ ẩm của 03 lô 001, 002, 003 lần lượt là 37,30%; 37,87%; 36,81%. Lô 001 được sử dụng làm mẫu thẩm định quy trình định lượng mimosin, coixol và kali sorbat.

2.2. Hóa chất, thiết bị. Chất đối chiếu mimosin hàm lượng nguyên trạng (NT) 99,84% cung cấp bởi TargetMoi; coixol hàm lượng 98,30% cung cấp bởi Chengdu Biopurify Phytochemicals và kali sorbat hàm lượng NT 99,9% cung cấp bởi Viện Kiểm nghiệm thuốc TP.HCM. Methanol, acetonitrile, natri octansulfonat (Fisher, Mỹ) và nước cất 2 lần đạt tiêu chuẩn dùng cho HPLC; H₃PO₄ 85%, HCl 37% (Merck, Đức) đạt chuẩn phân tích.

Máy HPLC Shimadzu LC-2030C 3D plus, detector PDA (Nhật), cột sắc ký Shim-pack GIST C₁₈ (250 × 4,6 mm; 5 µm) và tiền cột Shim-pack GIST C₁₈ (10 × 4,0 mm; 5 µm) (Shimadzu, Nhật). Cân phân tích độ nhạy 0,01 mg (Mettler, Thụy Sĩ), bể siêu âm Elma (Đức). Các dụng cụ phòng thí nghiệm và dụng cụ chính xác được hiệu chuẩn định kỳ theo GLP và ISO 17025:2017.

2.3. Phương pháp nghiên cứu

2.3.1. Khảo sát điều kiện sắc ký

Thẩm định bước sóng phát hiện. Dựa vào phổ UV-Vis của mimosin, coixol, kali sorbat, lựa

chọn bước sóng phát hiện phù hợp

Thăm dò và lựa chọn điều kiện pha động. Thăm dò một số điều kiện để lựa chọn tỷ lệ dung môi pha động tách được pic mimosin, coixol, kali sorbat với các thông số của pic thỏa các yêu cầu của phương pháp HPLC: Các pic hoạt chất tinh khiết, tách hoàn toàn (độ phân giải $\geq 1,5$), hệ số bắt đối nằm trong khoảng 0,8 – 1,5 và số đĩa lý thuyết biểu kiến > 2000 .

Hệ thống sắc ký: Hệ thống Shimadzu LC-2030C 3D plus.

Detector: PDA; Phát hiện: bước sóng được chọn

Cột: Shimpack GIST C18 ($250 \times 4,6\text{mm}; 5\mu\text{m}$); Tiền cột Shimpack GIST C18 ($10 \times 4,0\text{mm}; 5\mu\text{m}$).

Nhiệt độ cột: 40°C ; Thể tích tiêm: $20\mu\text{l}$; Tốc độ dòng: 1 ml/phút

Pha động: A-Acetonitril; B-đệm pH 1,8 (đệm natri heptansulfonat ở điều kiện I hoặc đệm natri octansulfonat ở điều kiện II, III)

Đệm pH 1,8: Natri heptansulfonat (hoặc natri octansulfonat) 2g/L , chỉnh pH 1,8 bằng acid phosphoric đậm đặc.

Bảng 1. Khảo sát điều kiện định lượng đồng thời mimosin, coixol, kali sorbat

Điều kiện sắc ký	Thời gian (phút)	Kênh A (%)	Kênh B (%)
I	0-3	5	95
	3-5	5-8	95-92
	5-15	8-10	92-90
	15-25	10-20	90-80
	25-49	20	80
	49-50	20-5	80-95
	50-55	5	95
II	0-55	10	90
III	0-70	8	92

Khảo sát quy trình xử lý mẫu

Khảo sát dung môi chiết: Nước, MeOH, MeOH - nước (1:1), ACN, ACN - nước (1:1), HCl 0,1 N, HCl 0,2 N, HCl 0,3 N.

Khảo sát thời gian chiết: 10 phút, 20 phút, 30 phút.

Khảo sát số lần chiết: 1 lần, 2 lần, 3 lần.

Lựa chọn điều kiện chiết sao cho hàm lượng mimosin, coixol, kali sorbat cao nhất.

Quy trình định lượng đồng thời mimosin, coixol, kali sorbat trong cao bài thuốc

Từ kết quả khảo sát ở trên tiến hành xây dựng quy trình định lượng đồng thời mimosin, coixol, kali sorbat trong dịch chiết.

Thẩm định quy trình định lượng đồng thời mimosin, coixol, kali sorbat trong cao bài thuốc

Tiến hành thẩm định và đánh giá các thông số thẩm định của phương pháp định lượng bằng HPLC theo ICH Q2(R1)^[6] gồm các thông

số: Tính tương thích hệ thống, tính đặc hiệu, tính tuyển tính, độ chính xác, độ đúng, giới hạn định lượng và giới hạn phát hiện và ảnh hưởng độ pha loãng.

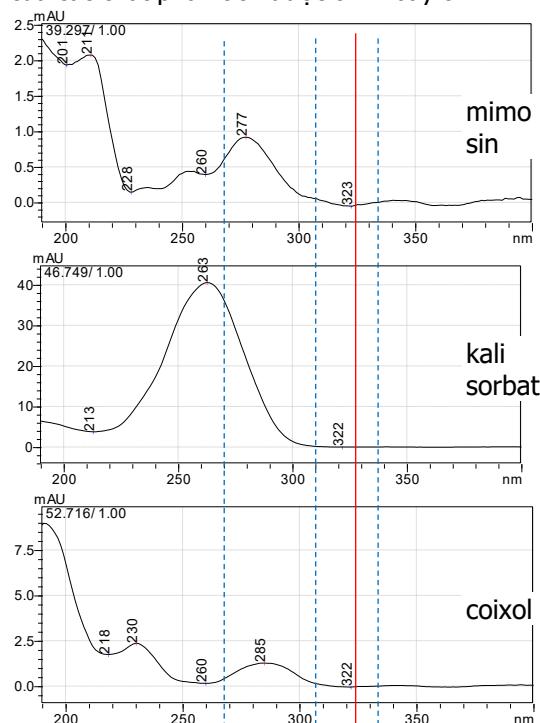
Ứng dụng quy trình định lượng trên mẫu thực

Sử dụng quy trình đã thẩm định để ứng dụng định lượng trên 03 lô cao chiết.

III. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. Khảo sát điều kiện sắc ký

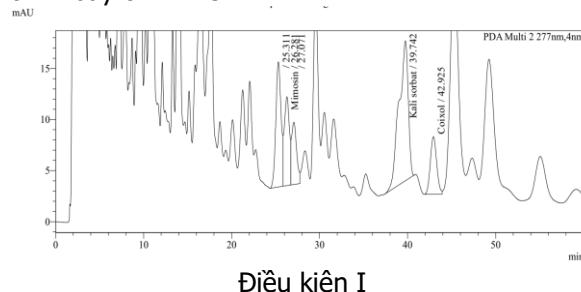
Khảo lụa chọn bước sóng phát hiện. Phổ UV của các chất phân tích được trình bày ở Hình 2.



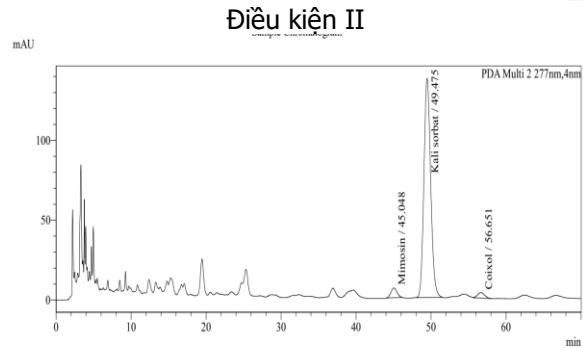
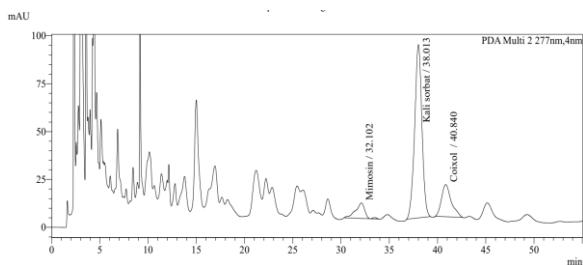
Hình 2. Phổ UV của mimosin, kali sorbat và coixol

Nhận xét: Phổ UV cho thấy bước sóng hấp thụ cực đại của mimosin, coixol, kali sorbat lần lượt là 277 nm, 230 nm và 285 nm, 263 nm. Để phát hiện đồng thời cả 3 hoạt chất, lựa chọn bước sóng phát hiện 277 nm.

Khảo sát chương trình rửa giải. Kết quả khảo sát chương trình rửa giải pha động được trình bày ở Hình 3.



Điều kiện I



QuantitativeResult						
PDA	Name	Ret. Time	Area	Tailing Factor	Theoretical Plate(USP)	Resolution(USP)
	Mimosin	45.048	337251	1.073	14473	--
	Kali sorbat	49.475	8573020	1.135	14555	2.822
	Coixol	56.651	228239	--	16082	4.187
			9138509			

ĐIỀU KIỆN III

Hình 3. Sắc ký đồ khảo sát chương trình rửa giải pha động quy trình định lượng cao chiết

Nhận xét: ở điều kiện I và II, pic các chất phân tích chưa tách hoàn toàn khỏi pic lân cận. Ở điều kiện III, các pic tách hoàn toàn và đạt các thông số sắc ký. Lựa chọn dung môi pha động theo điều kiện III.

3.2. Khảo sát quy trình xử lí mẫu

Bảng 2. Kết quả khảo sát lựa chọn dung môi chiết

Dung môi chiết	Diện tích pic trung bình (mAU*giây), n = 2		
	mimosin	kali sorbat	coixol
ACN 50%	0	5445131	202996
ACN	0	2515082	51692
H ₂ O	163547	4835201	124820
HCl 0,2 N	193548	4769645	133002
MeOH	13002	4908623	149171
MeOH 50%	85502	5098751	153950

Bảng 3. Kết quả khảo sát lựa chọn nồng độ acid hydrochlorid

Nồng độ HCl	Diện tích pic trung bình (mAU*giây), n = 2		
	mimosin	kali sorbat	coixol
HCl 0,1 N	183183	4537148	161556
HCl 0,2 N	184277	4557559	167237
HCl 0,3 N	208682	4601607	163825

Bảng 4. Kết quả khảo sát thời gian chiết

Thời gian chiết	Diện tích pic trung bình (mAU*giây), n = 2		
	mimosin	kali sorbat	coixol
10 phút	170321	4257624	149113
20 phút	184277	4557559	167237
30 phút	191457	4555226	156440

Bảng 5. Kết quả khảo sát số lần chiết

Số lần chiết	Diện tích pic trung bình (mAU*giây), n = 2		
	mimosin	kali sorbat	coixol
1 lần	175467	4074687	131761
%	89,52	89,27	87,38
2 lần	20538	473253	19026
%	10,48	10,37	12,62
3 lần	0	16272	0
%	0	0,36	0

Nhận xét: Từ kết quả khảo sát, điều kiện xử lý mẫu lựa chọn là: dung môi chiết mẫu HCl 0,2 N, thời gian chiết 20 phút, chiết 2 lần.

Quy trình định lượng đồng thời mimosin, coixol, kali sorbat trong cao chiết bài thuốc

Mẫu trắng, dung môi pha mẫu: HCl 0,2 N

Mẫu chuẩn: Cân chính xác lần lượt 2 mg chuẩn mimosin; 2 mg chuẩn coixol; 16 mg chuẩn kali sorbat vào bình định mức 20 ml, hòa tan và định mức đến vạch bằng HCl 0,2 N. Hút chính xác 5 ml dung dịch trên pha loãng thành 100 ml bằng HCl 0,2 N. Dung dịch thu được có nồng độ mimosin, coixol và kali sorbat lần lượt khoảng 5 µg/ml; 5 µg/ml và 40 µg/ml.

Mẫu thử: Cân chính xác khoảng 0,5 g mẫu thử vào bình nón 100 ml, thêm 10 ml HCl 0,2 N, lắc siêu âm 20 phút, tráng dịch chiết qua bình định mức 25 ml. Tiếp tục bước chiết như trên một lần nữa, gộp dịch chiết, tráng rửa bình nón và định mức đến vạch, lắc đều. Lọc qua màng lọc 0,22 µm.

Điều kiện sắc ký: Cột Shimpack GIST C18 (250 × 4,6 mm; 5 µm), bước sóng phát hiện 277 nm, nhiệt độ cột 40 °C, tốc độ dòng 1 ml/phút, thể tích tiêm mẫu 20 µl.

Pha động: acetonitril – đệm pH 1,8 (8:92)

Đệm pH 1,8: natri 1-octansulfonat 2 g/L, chỉnh pH 1,8 bằng acid phosphoric đậm đặc.

Cách tiến hành: Tiêm riêng biệt mẫu trắng, dung dịch chuẩn, dung dịch thử. Dựa vào diện tích pic thu được trên sắc ký đồ của dung dịch thử, dung dịch chuẩn. Hàm lượng mimosin, coixol, kali sorbat (µg/g) trong cao chiết được tính theo công thức:

$$X (\mu\text{g/g}) = \frac{S_t \times C \times 25}{S_c \times m_t}$$

S_t , S_c : Diện tích pic mimosin/coixol/kali sorbat tương ứng của mẫu thử và mẫu chuẩn

m : Khối lượng cân của mẫu thử (đã trừ độ ẩm) (g)

C: Nồng độ mimosin/coixol/kali sorbat trong mẫu chuẩn ($\mu\text{g/ml}$)

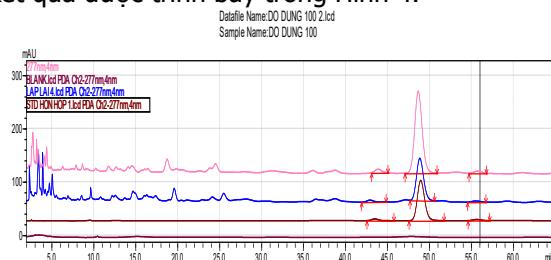
3.3. Thẩm định quy trình định lượng

Bảng 6. Kết quả thẩm định tính tương thích hệ thống

Chất nghiên cứu	Số đĩa lý thuyết ($N \geq 2000$)	Hệ số kéo đuôi ($0,8 \leq As \leq 1,5$)	%RSD diện tích pic ($\leq 2,0$)	%RSD thời gian lưu ($\leq 2,0$)	Độ phân giải ($Rs \geq 1,5$)
Mimosin	14138	1,099	0,48	0,90	-
Kali sorbat	14608	1,147	0,05	0,37	4,709
Coixol	14894	1,090	1,62	0,48	3,695

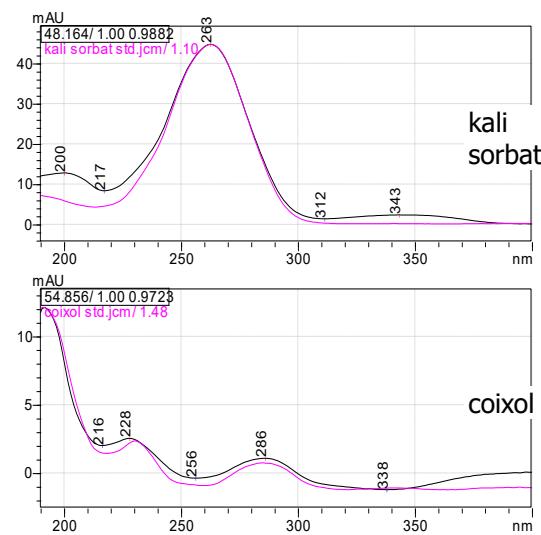
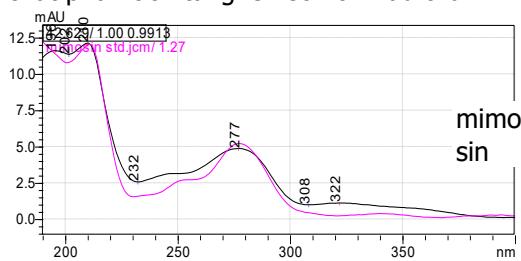
Nhận xét: Các thông số đều đạt các yêu cầu về tính tương thích hệ thống.

Tính đặc hiệu. Tiến hành sắc ký mẫu trắng, mẫu chuẩn, mẫu thử và mẫu thử thêm chuẩn, kết quả được trình bày trong Hình 4.



Hình 4. Sắc ký đồ khảo sát tính đặc hiệu của các chất phân tích trong cao chiết (theo thứ tự từ trên xuống: mẫu thử thêm chuẩn, mẫu thử, mẫu chuẩn, mẫu trắng)

Nhận xét: Mẫu trắng không cho pic trùng với thời gian lưu của mimosin, coixol, kali sorbat trong mẫu chuẩn. Sắc ký đồ dung dịch thử cho các pic có thời gian lưu tương ứng với thời gian lưu của mimosin, coixol, kali sorbat trong dung dịch chuẩn. Các pic chất phân tích tách hoàn toàn trong mẫu chuẩn và mẫu thử. Sắc ký đồ mẫu thử thêm chuẩn có chiều cao và diện tích pic chất phân tích tăng lên so với mẫu thử.



Hình 5. Kết quả chia phô UV các chất phân tích giữa mẫu thử và mẫu chuẩn

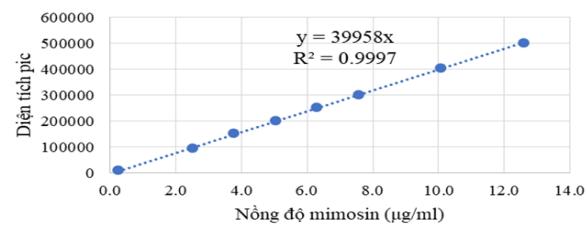
(Chú thích: màu hồng là mẫu chuẩn, màu đen là mẫu thử)

Tính tuyến tính. Kết quả khảo sát tính tuyến tính và phân tích hồi tròn bày ở Bảng 7 và Hình 6, cho thấy trong khoảng nồng độ khảo sát, có sự tương quan tuyến tính giữa nồng độ các chất phân tích và diện tích pic (R^2 đều lớn hơn 0,995). Mức độ tương quan tốt, độ tuyến tính chặt chẽ. Hệ số a có ý nghĩa, hệ số b không có ý nghĩa.

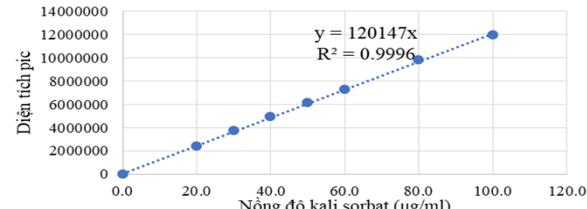
Bảng 7. Kết quả thẩm định tính tuyến tính

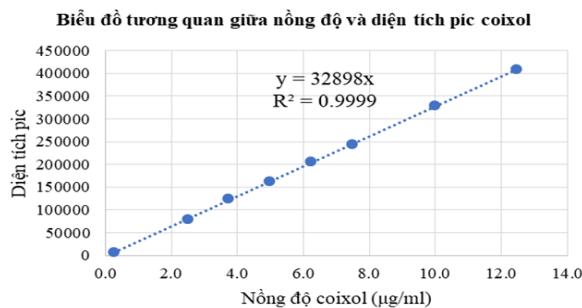
Chất phân tích	Khoảng tuyến tính ($\mu\text{g/ml}$)	Phương trình hồi quy	Giá trị R^2
Mimosin	0,25 – 12,61	$\hat{y} = 39958x$	0,9997
Coixol	0,25 – 12,47	$\hat{y} = 32898x$	0,9999
Kali sorbat	0,10 – 100,02	$\hat{y} = 120147x$	0,9996

Biểu đồ tương quan giữa nồng độ và diện tích pic mimosin



Biểu đồ tương quan giữa nồng độ và diện tích pic kali sorbat





Hình 6. Biểu đồ tương quan giữa nồng độ và diện tích pic các chất phân tích

Độ lặp lại và độ chính xác trung gian

Bảng 8. Kết quả thẩm định độ lặp lại và độ chính xác trung gian

STT	Hàm lượng mimosin ($\mu\text{g/g}$)		Kết quả gộp TB: 379,18 ($\mu\text{g/g}$) RSD: 1,44% ANOVA: $p = 0,605 > 0,05$	
	Ngày 1	Ngày 2		
1	387,64	371,84		
2	382,06	386,54		
3	382,74	383,14		
4	374,86	377,93		
5	372,40	372,72		
6	380,60	377,65		
TB	380,05	378,30		
%RSD	1,46	1,52		
STT	Hàm lượng kali sorbat ($\mu\text{g/g}$)			
	Ngày 1	Ngày 2		
1	3034,01	3057,68		
2	3038,89	3032,40		
3	3028,22	3067,16		
4	3054,23	3011,04		
5	2990,08	3057,90		
6	3026,54	3030,67		
TB	3028,66	3042,81		
%RSD	0,71	0,71		
STT	Hàm lượng coixol ($\mu\text{g/g}$)			
	Ngày 1	Ngày 2		
1	354,25	336,02		
2	342,79	345,85		
3	344,15	341,72		
4	348,39	340,46		
5	336,24	344,49		
6	341,87	339,86		
TB	344,62	341,40		
%RSD	1,78	1,03		

Nhận xét: % RSD lặp lại và độ chính xác trung gian ($n = 6$), %RSD gộp ($n = 12$) của hai chất phân tích có hàm lượng dưới 1000 ppm là mimosin và coixol đều nhỏ hơn 3,7%. %RSD lặp

lại và độ chính xác trung gian ($n = 6$), % RSD gộp ($n = 12$) của chất phân tích có hàm lượng dưới 1% là kali sorbat đều nhỏ hơn 2,7%.

Sử dụng trắc nghiệm ANOVA cho thấy giá trị về hàm lượng từng chất phân tích giữa hai ngày không khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$). Như vậy, quy trình định đạt yêu cầu về độ lặp lại và độ chính xác trung gian.

Độ đúng

Bảng 9. Kết quả độ thẩm định độ lặp lại và độ chính xác trung gian

Mức nồng độ	Độ thu hồi (%)	Độ thu hồi trung bình (%)	%RSD		
mimosin					
Yêu cầu: độ thu hồi trung bình từ 95% - 105%					
80%	99,63	99,51	1,09		
	98,37				
	100,53				
100%	98,99	100,07	1,44		
	99,50				
	101,71				
120%	98,69	98,64	0,11		
	98,72				
	98,53				
kali sorbat					
Yêu cầu: độ thu hồi trung bình từ 97% - 103%					
80%	98,91	98,91	1,02		
	97,90				
	99,92				
100%	97,34	99,34	1,79		
	99,96				
	100,74				
120%	96,09	98,26	1,93		
	99,10				
	99,60				
coixol					
Yêu cầu: độ thu hồi trung bình từ 95% - 105%					
80%	98,43	98,23	0,46		
	97,71				
	98,54				
100%	100,69	100,62	0,11		
	100,68				
	100,49				
120%	99,54	100,97	1,30		
	101,27				
	102,11				

Nhận xét: Kết quả cho thấy độ thu hồi ở cả ba mức nồng độ đều đạt yêu cầu; % RSD ở mỗi mức nồng độ đều thấp hơn 2,0%. Quy trình định đường đạt yêu cầu về độ đúng.

Giới hạn định lượng, giới hạn phát hiện

Giới hạn phát hiện, giới hạn định lượng tương ứng với mức nồng độ của các chất

phân tích cho giá trị S/N tối thiểu bằng 3,
10. Kết quả được trình bày ở Bảng 10.

Bảng 10. Kết quả thẩm định giới hạn phát hiện, giới hạn định lượng

Chất phân tích	Giới hạn phát hiện ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	Giới hạn định lượng ($\mu\text{g}/\text{ml}$)
Mimosin	0,10	0,25
Coixol	0,10	0,25
Kali sorbat	0,04	0,10

Ảnh hưởng của độ pha loãng. Mẫu thử được thêm chuẩn ở nồng độ khoảng 400% để thu được tổng nồng độ chất phân tích trong mẫu là 500%. Tiến hành xử lý mẫu theo quy trình, sau đó hút pha loãng 5 lần với dung môi pha loãng là HCl 0,2 N. Thực hiện trên 6 dung dịch độc lập. Kết quả độ thu hồi (%) và độ lặp lại (RSD%) được trình bày ở Bảng 11.

Bảng 11. Kết quả thẩm định ảnh hưởng của độ pha loãng

Chất phân tích	Độ thu hồi trung bình (%), $n = 6$	RSD%, $n = 6$
Mimosin	100,58	0,83
Coixol	100,47	1,44
Kali sorbat	99,07	0,18

Nhận xét: độ thu hồi trung bình ($n = 6$) của mimosin, coixol và kali sorbat nằm trong giới hạn 97% - 103% với %RSD đều nhỏ hơn 2,0. Như vậy, kết quả định lượng không bị ảnh hưởng bởi độ pha loãng (05 lần).

3.4. Ứng dụng quy trình phân tích trên mẫu cao chiết

Bảng 12. Kết quả định lượng mimosin, coixol, kali sorbat trên mẫu thực

Mẫu cao	Hàm lượng Trung bình \pm SD ($\mu\text{g}/\text{g}, n = 3$)		
	mimosin	coixol	kali sorbat
Lô 001	361,09 \pm 4,51	342,60 \pm 1,79	3060,32 \pm 19,91
Lô 002	379,95 \pm 4,28	325,36 \pm 5,56	3026,05 \pm 22,43
Lô 003	387,24 \pm 5,09	301,42 \pm 4,65	3122,23 \pm 39,20

Nhận xét: kết quả cho thấy quy trình đã xây dựng có thể áp dụng để kiểm tra chất lượng cao chiết bài thuốc từ 04 dược liệu.

IV. BÀN LUẬN

Kết quả khảo sát dung môi chiết trong quy trình xử lý mẫu thử phù hợp với lý thuyết: các hợp chất coixol và kali sorbat dễ tan trong các dung môi acetonitril và methanol, mimosin chỉ tan tốt trong dung môi nước. Khi dùng các hỗn hợp dung môi hữu cơ và nước, diện tích pic của

mimosin vẫn thấp hơn so với sử dụng nước hay HCl 0,2 N. Khó khăn chính trong việc định lượng các chất điểm chỉ từ cao chiết bài thuốc là thành phần phức tạp, nghiên cứu đã tiến hành khảo sát điều kiện sắc ký, lựa chọn tác nhân bắt cắp ion natri n-octansulfonat. Chương trình rửa giải đằng dòng cho các pic chất phân tích tách hoàn toàn. Việc xây dựng quy trình định lượng đồng thời ba hợp chất với quy trình xử lý mẫu đơn giản giúp tránh phải sử dụng nhiều quy trình khác nhau gây tốn kém thời gian, hóa chất.

V. KẾT LUẬN

Quy trình định lượng đồng thời mimosin, coixol và kali sorbat trong cao chiết bài thuốc bằng HPLC là quy trình lần đầu tiên công bố, đạt các yêu cầu đặt ra: quy trình xử lý mẫu đơn giản, điều kiện sắc ký tối ưu, quy trình thẩm định đạt theo quy định. Như vậy, quy trình định lượng có thể được ứng dụng vào công tác kiểm tra chất lượng cao chiết làm nguyên liệu sản xuất thành sản phẩm chăm sóc sức khỏe tại cơ sở.

VI. LỜI CẢM ƠN

Bài báo là một phần kết quả thuộc đề tài nghiên cứu cấp Sở Khoa học và Công nghệ Thành phố Hồ Chí Minh. Nhóm nghiên cứu xin chân thành cảm ơn Quỹ phát triển Khoa học và Công nghệ Thành phố Hồ Chí Minh đã hỗ trợ kinh phí cho việc thực hiện đề tài.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Bum, E Ngo, et al. (2004), "Anticonvulsant activity of *Mimosa pudica* decoction", Fitoterapia. 75(3-4), pp. 309-314.
2. Patro, Ganesh, Kumar Bhattamisra, Subrat, and Kumar Mohanty, Bijay (2016), "Effects of *Mimosa pudica* L. leaves extract on anxiety, depression and memory", Avicenna Journal of Phytomedicine. 6(6), pp. 696-710.
3. Moniruzzaman, Md, Rahman, Atikur, and Ferdous, Afia (2015), "Evaluation of sedative and hypnotic activity of ethanolic extract of *Scoparia dulcis* Linn", Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine. 2015.
4. Martins, Jeanette and Brijesh, S. (2020), "Anti-depressant activity of *Erythrina variegata* bark extract and regulation of monoamine oxidase activities in mice", Journal of Ethnopharmacology. 248, p. 112280.
5. Gomita Y, Ichimaru Y, Moriyama M, et al (1981), "Behavioral and EEG effects of coixol (6-methoxybenzoxazolone), one of the components in *Coix Lachryma-Jobi* L. var. ma-yuen Stapf". Nihon Yakurigaku zasshi Folia Pharmacologica Japonica. 77(3), p.245-259.
6. ICH Harmonised Guideline (2005), Validation of Analytical Procedures: Q2(R1).