

ISSN 1859 - 4735



TẠP CHÍ DƯỢC LIỆU

JOURNAL OF MEDICINAL MATERIALS

SỐ 4 - TẬP 31

8/2026

VIỆN DƯỢC LIỆU
NATIONAL INSTITUTE OF MEDICINAL MATERIALS

3B Quang Trung, phường Cửa Nam, thành phố Hà Nội - Việt Nam
TEL: (+84-24) 38247058 FAX: (+84-24) 39348740
Email: tapchiduoclieu@nimm.org.vn; tapchiduoclieu@gmail.com

TẠP CHÍ DƯỢC LIỆU (Bản in và Bản điện tử)

BAN BIÊN TẬP (Nhiệm kỳ 2025-2030)

(Kèm theo Quyết định số 666/QĐ-VDL ngày 24/4/2025 của Viện trưởng Viện Dược liệu)

TỔNG BIÊN TẬP

PGS.TS. Đỗ Thị Hà

I. Tiểu ban Dược liệu - Dược học cổ truyền

- **PGS.TSKH. Nguyễn Minh Khởi - Trưởng Ban**
- PGS.TS. Nguyễn Thượng Dong - Ủy viên
- GS.TS. Nguyễn Minh Đức - Ủy viên
- GS.TS. Trần Công Luận - Ủy viên
- GS.TS. Won Keun Oh - Ủy viên
- PGS.TS. Trần Hùng - Ủy viên
- PGS.TS. Nguyễn Thị Bích Thu - Ủy viên
- PGS.TS. Phương Thiện Thương - Ủy viên
- PGS.TS. Phan Minh Giang - Ủy viên
- PGS.TS. Lê Nguyễn Thành - Ủy viên
- PGS.TS. Lê Việt Dũng - Ủy viên
- PGS.TS. Nguyễn Quốc Huy - Ủy viên
- PGS.TS. Nguyễn Thu Hằng - Ủy viên
- TS. Trần Minh Ngọc - Ủy viên
- TS. Nguyễn Văn Tài - Ủy viên
- PGS.TS. Lê Đình Chi - Ủy viên
- TS. Nguyễn Tuấn Hiệp - Ủy viên.

II. Tiểu ban Dược lý - Dược lâm sàng

- **PGS.TS. Phạm Thị Nguyệt Hằng - Trưởng Ban**
- PGS.TSKH. Đỗ Trung Đàm - Ủy viên
- PGS.TS. Nguyễn Thị Thu Hương - Ủy viên
- GS.TS. William R. Folk - Ủy viên
- PGS.TS. Phạm Thị Vân Anh - Ủy viên
- PGS.TS. Nguyễn Thùy Dương - Ủy viên
- PGS.TS. Lê Văn Minh - Ủy viên
- TS. Trần Thị Hiền - Ủy viên.

III. Tiểu ban Nông Sinh

- **TS. Nguyễn Văn Khiêm - Trưởng Ban**
- TS. Phan Thúy Hiền - Ủy viên
- PGS.TS. Nguyễn Văn Tập - Ủy viên
- PGS.TS. Phạm Thanh Huyền - Ủy viên
- GS.TS. Trần Thế Bách - Ủy viên.

IV. Tiểu ban Thư ký - Trị sự

- **PGS.TS. Lê Nguyễn Thành - Trưởng Ban**
- TS. Lê Thị Xoan - Thư ký chuyên môn
- CN. Nguyễn Thị Minh Lộc - Thư ký trị sự.

Trang	NGHIÊN CỨU KHOA HỌC	Page	SCIENTIFIC RESEARCH
257	Thành phần hóa học của cây bồ công anh thấp thu hái tại Việt Nam- Trần Huyền Trang, Đỗ Hoàng Anh, Lê Hồng Văn Anh, Nguyễn Thị Thu, Nguyễn Thị Hằng, Vũ Thị Diệp, Nguyễn Trà My, Lê Nguyễn Thành, Đỗ Thị Hà	257	Chemical Constituents from <i>Taraxacum officinale</i> F.H. Wigg. Collected in Vietnam- Tran Huyen Trang, Do Hoang Anh, Le Hong Van Anh, Nguyen Thi Thu, Nguyen Thi Hang, Vu Thi Diep, Nguyen Tra My, Le Nguyen Thanh, Do Thi Ha
265	Linalool-3,7-oxid- β -D-glucopyranosid và các flavonoid từ cúc hoa vàng - Nguyễn Thị Duyên, Trần Thị Tuyết, Bùi Khắc Hiếu, Nguyễn Thị Huệ, Bùi Hồng Cường, Lưu Phương Anh, Phạm Văn Công	265	Linalool-3,7-Oxide- β -D-Glucopyranoside and Flavonoids from <i>Chrysanthemum indicum</i> L.- Nguyen Thi Duyen, Tran Thi Tuyet, Bui Khac Hieu, Nguyen Thi Hue, Bui Hong Cuong, Luu Phuong Anh, Pham Van Cong
270	Phân lập, tinh chế và thiết lập chất chuẩn 5,7-dimethoxyflavon từ thân rễ ngải đen - Nguyễn Văn Bình, Hoàng Thị Thanh Thảo, Lê Quang Thảo, Đỗ Thị Hà, Đoàn Cao Sơn	270	Isolation, Purification and Establishment of 5,7-Dimethoxyflavone as a Reference Standard from <i>Kaempferia parviflora</i> Wall. ex Baker- Nguyen Van Binh, Hoang Thi Thanh Thao, Le Quang Thao, Do Thi Ha, Doan Cao Son
281	Nghiên cứu xây dựng phương pháp định lượng đồng thời acteosid và isoacteosid trong rễ bạch đồng nữ bằng phương pháp HPLC-DAD - Nguyễn Đình Quân, Nguyễn Lâm Hồng	281	Simultaneous Determination of Acteoside and Isoacteoside in the Roots of <i>Clerodendrum chinense</i> var. <i>simplex</i> by HPLC-DAD- Nguyen Dinh Quan, Nguyen Lam Hong
288	Phát triển phương pháp định lượng 16 acid amin trong củ khoai mỡ tím bằng HILIC-MS/MS - Cao Công Khánh, Nguyễn Quang Hùng, Nguyễn Văn Khoa, Mạc Thị Thanh Hoa, Trần Thị Xuân Lộc, Lê Thị Hồng Hào, Nguyễn Thị Kiều Anh	288	Development of a Method for the Quantification of 16 Amino Acids in Purple Yam (<i>Dioscorea alata</i> L.) Tubers Using HILIC-MS/MS - Cao Cong Khanh, Nguyen Quang Hung, Nguyen Van Khoa, Mac Thi Thanh Hoa, Tran Thi Xuan Loc, Le Thi Hong Hao, Nguyen Thi Kieu Anh
298	Tối ưu hóa quy trình chiết xuất polyphenol và flavonoid từ lá hồng bằng phương pháp xử lý enzym kết hợp chiết nước - Lê Minh Khuong, Lê Hoàng Vũ, Huỳnh Hồng Nha Uyên, Nguyễn Thị Tố Uyên, Trần Thị Hoài Linh, Trịnh Thị Diệp	298	Optimization of the Extraction Process of Polyphenols and Flavonoids from Persimmon Leaves (<i>Diospyros kaki</i> Thunb.) by Enzyme Pretreatment Combined with Alkaline Aqueous Extraction - Le Minh Khuong, Le Hoang Vu, Huynh Hong Nha Uyen, Nguyen Thi To Uyen, Tran Thi Hoai Linh, Trinh Thi Diep
306	Sàng lọc một số cao chiết dược liệu dựa trên khả năng tăng sinh tế bào nhũ bì nang tóc người (hPDCs) và hoạt tính chống oxy hóa <i>in vitro</i> - Phạm Minh Hiếu, Phạm Thị Nguyệt Hằng, Phạm Anh Tùng, Phí Đình Uy, Đinh Thị Minh, Nguyễn Thị Phương, Nguyễn Thị Huệ, Nghiêm Tiến Chung, Vũ Xuân Bách, Lê Nguyễn Lâm Tùng	306	Screening of some Medicinal Plant Extracts with Hair Growth-Promoting Potential Based on Human Dermal Papilla Cell Proliferation and <i>in vitro</i> Antioxidant Activities - Pham Minh Hieu, Pham Thi Nguyet Hang, Pham Anh Tung, Phi Dinh Uy, Dinh Thi Minh, Nguyen Thi Phuong, Nguyen Thi Hue, Nghiem Tien Chung, Vu Xuan Bach, La Nguyen Lam Tung
314	Đánh giá sàng lọc hoạt tính ức chế xanthin oxidase <i>in vitro</i> của một số cao chiết dược liệu - Nguyễn Thị Phương, Nguyễn Thị Huệ, Lê Thị Xoa, Nguyễn Văn Hiệp, Phí Đình Uy, Nguyễn Thị Minh Nguyệt, Phạm Thị Nguyệt Hằng	314	Screening the Anti-Xanthine Oxidase Activities <i>in vitro</i> of some Herbal Extracts - Nguyen Thi Phuong, Nguyen Thi Hue, Le Thi Xoa, Nguyen Van Hiep, Phi Dinh Uy, Nguyen Thi Minh Nguyet, Pham Thi Nguyet Hang
324	Nghiên cứu đánh giá một số hoạt tính liên quan đến mụn trứng cá và chống viêm tại chỗ của các kim tiền trên mô hình thực nghiệm - Đinh Thị Minh, Lê Thị Kim Ngân, Đinh Thị Huyền Trang, Phạm Minh Hiếu, Võ Trần Ngọc Duyên, Nguyễn Ngọc Thanh, Lê Thị Xoa, Phạm Thị Nguyệt Hằng	324	Study on the Anti-Acne and Topical Anti-Inflammatory Effects of <i>Calendula officinalis</i> L. in Experimental Models - Dinh Thi Minh, Le Thi Kim Ngan, Dinh Thi Huyen Trang, Pham Minh Hieu, Vo Tran Ngoc Duyen, Nguyen Ngoc Thanh, Le Thi Xoa, Pham Thi Nguyet Hang
331	Hoạt tính chống oxy hóa và kháng viêm <i>in vitro</i> của lá trà và mối liên quan với hàm lượng polyphenol và flavonoid toàn phần - Nguyễn Thị Thu Hương, Nguyễn Đông Nhi, Võ Thành Nhân, Lê Hồ Ngọc Trân, Lý Hải Triều	331	<i>In vitro</i> Antioxidant and Anti-Inflammatory Activities of <i>Syzygium cumini</i> (L.) Skeels Leaves and Correlation with Total Polyphenol and Flavonoid Contents - Nguyen Thi Thu Huong, Nguyen Dong Nhi, Vo Thanh Nhan, Le Ho Ngoc Tran, Ly Hai Trieu
342	Nghiên cứu bào chế hệ tiểu phân nano rutin bằng phương pháp nghiền bi - Hoàng Thị Diệu Hằng, Đào Anh Hoàng, Nguyễn Ngọc Chiến, Nguyễn Thị Sen, Lương Thị Lan, Luyện Bích Phương, Vũ Trường Duy, Trịnh Thị Khánh	342	Formulation and Evaluation of Rutin Nanoparticles Using the Ball Milling Method - Hoang Thi Dieu Hang, Dao Anh Hoang, Nguyen Ngoc Chien, Nguyen Thi Sen, Luong Thi Lan, Luyn Bích Phuong, Vu Truong Duy, Trinh Thi Khanh
351	Bổ sung loài kinh quốc Guguin có giá trị làm thuốc cho khu hệ thực vật Việt Nam - Phạm Ngọc Khánh, Nguyễn Văn Hiếu, Hoàng Diệu Linh	351	An Addition of the Medicinal Species <i>Colquhounia seguinii</i> Vanhot. to the Flora of Vietnam - Pham Ngoc Khanh, Nguyen Van Hieu, Hoang Dieu Linh

PHÂN LẬP, TINH CHẾ VÀ THIẾT LẬP CHẤT CHUẨN 5,7-DIMETHOXYFLAVON TỪ THÂN RỄ NGẢI ĐEN

Nguyễn Văn Bình¹, Hoàng Thị Thanh Thảo¹, Lê Quang Thảo¹, Đỗ Thị Hà², Đoàn Cao Sơn^{1,*}

¹Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương; ²Viện Dược liệu

*Email: doancaoson.nidqc@gmail.com

Nhận bài: 06/3/2026

Chấp nhận đăng: 18/8/2026

Tóm tắt

Chất chuẩn 5,7-dimethoxyflavon (DMF) được thiết lập từ nguyên liệu chiết xuất và phân lập từ thân rễ loài ngải đen (*Kaempferia parviflora* Wall. ex Baker) theo hướng dẫn của Tổ chức Y tế Thế giới (WHO), ISO 17034 và ISO Guide 35 về thiết lập chất chuẩn. Bột thân rễ phơi khô của ngải đen được chiết hồi lưu với ethanol 80% ở 70°C, sau đó cất loại hết dung môi. Thêm nước vào cặn rồi chiết phân bố lần lượt với *n*-hexan, dicloromethan và ethyl acetat. Phân đoạn dicloromethan được thu lấy, cất loại dung môi và phân lập trên cột sắc ký pha thuận, pha đảo để thu được hợp chất tinh khiết. Cấu trúc hợp chất được khẳng định là 5,7-dimethoxyflavon bằng các phương pháp phổ NMR, IR, MS và UV-Vis. Chất chuẩn được thiết lập bằng phương pháp cân bằng khối lượng, thu được nguyên liệu chất chuẩn có giá trị ấn định hàm lượng 99,40%, độ không đảm bảo đo mở rộng $\pm 0,03\%$ (hệ số phủ $k = 2$), ổn định trong vòng 12 tháng.

Từ khóa: 5,7-Dimethoxyflavon; Ngải đen.

Summary

Isolation, Purification and Establishment of 5,7-Dimethoxyflavone as a Reference Standard from *Kaempferia parviflora* Wall. ex Baker

The 5,7-dimethoxyflavone (DMF) reference standard was established using material extracted and isolated from the rhizomes of *Kaempferia parviflora* Wall. ex Baker in accordance with the World Health Organization guidelines, ISO 17034, and ISO Guide 35 guidelines. The dried rhizome powder was extracted under reflux with 80% ethanol at 70°C, followed by complete evaporation of the solvent. Water was added to the residue, which was then sequentially partitioned with *n*-hexane, dichloromethane, and ethyl acetate. The dichloromethane fraction was collected and evaporated to dryness, then subjected to normal-phase and reversed-phase column chromatography to obtain the pure compound. Its structure was confirmed as 5,7-dimethoxyflavone by NMR, IR, MS, and UV-Vis spectroscopy. The reference standard was established using the mass balance method, yielding a material with an assigned content of 99.40% and an expanded measurement uncertainty of $\pm 0.03\%$ (coverage factor $k = 2$), stable for 12 months.

Keywords: 5,7-Dimethoxyflavone; *Kaempferia parviflora*.

1. Đặt vấn đề

Ngải đen (*Kaempferia parviflora* Wall. ex Baker) đã được biết đến với nhiều tác dụng sinh học quan trọng như chống viêm [1], kháng khuẩn [2], bảo vệ dạ dày [3]... và được sử dụng rộng rãi trong các sản phẩm bảo vệ sức khỏe, trong đó nhiều sản phẩm đang lưu hành trên thị trường Việt Nam. Cho đến nay, chưa có chuyên luận chính thức nào về kiểm tra chất lượng ngải đen trong Dược điển Việt Nam cũng như trong dược điển các nước, khiến việc kiểm tra chất lượng nguyên liệu ngải đen và các sản phẩm chứa ngải đen gặp nhiều khó khăn.

Trước yêu cầu ngày càng chặt chẽ về kiểm tra chất lượng nguyên liệu dược liệu và sản phẩm bảo vệ sức khỏe chứa cao dược liệu – chẳng hạn hướng dẫn của Cơ quan Quản lý Dược phẩm châu Âu (EMA) về chất lượng thuốc dược liệu/thuốc cổ truyền [4] yêu cầu định lượng các thành phần có hoạt tính điều trị hoặc sinh học (chất đánh dấu hoạt tính – chất lượng) hoặc thành phần hóa học thuộc dược liệu (chất đánh dấu hóa học) – việc sẵn có chất chuẩn là cần thiết trong phân tích định tính và/hoặc định lượng các chất đánh dấu khi kiểm nghiệm các loại mẫu này.

5,7-Dimethoxyflavon (DMF) là một flavonoid dễ tan trong dicloromethan, tan trong dimethyl sulfoxid và ít tan trong nước, có hàm lượng cao trong thân rễ ngải đen và được chứng minh có nhiều hoạt tính sinh học quan trọng, góp phần vào các tác dụng của ngải đen [5]. Theo hướng dẫn của Tổ chức Y tế Thế giới (WHO), DMF đủ điều kiện để đồng thời đóng vai trò chất đánh dấu hóa học (chemical marker) và chất đánh dấu chất lượng (quality marker) liên quan tới tác dụng sinh học trong đánh giá chất lượng ngải đen và các chế phẩm công bố chứa ngải đen [6]. Tuy nhiên, nguồn chất chuẩn DMF tại Việt Nam hiện vẫn còn hạn chế. Xuất phát từ nhu cầu thực tiễn đó, nghiên cứu này được thực hiện nhằm chiết xuất và thiết lập chất chuẩn DMF từ thân rễ ngải đen đáp ứng yêu cầu của chất chuẩn sử dụng trong kiểm nghiệm.

2. Đối tượng, nguyên liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Đối tượng nghiên cứu

Nguyên liệu để chiết xuất và phân lập DMF phục vụ thiết lập chất chuẩn là thân rễ ngải đen thu hái tại xã Pù Luông, tỉnh Thanh Hóa vào tháng 8/2022 (mẫu tiêu bản ký hiệu DV-270822, được

giám định tên khoa học tại Viện Dược liệu với tên khoa học là *Kaempferia parviflora* Wall. ex Baker trước khi sử dụng nghiên cứu). Thân rễ tươi được rửa sạch, thái lát mỏng, sấy ở 55°C đến khô và xay thành bột; bột được bảo quản trong túi nilon kín (bột KP).

2.2. Thiết bị và hóa chất

2.2.1. Thiết bị:

Các thiết bị sử dụng (tại Viện Dược liệu, Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương và Viện Hóa học – Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam): máy cắt quay Buchi Rotavapor R-220 và R-200; bộ hứng phân đoạn DC-1200; cân phân tích Mettler Toledo MS105; cân kỹ thuật Mettler Toledo MS3002TS; bể siêu âm Elma S100H; hệ sắc ký lỏng điều chế LC-20A (Shimadzu, Nhật Bản) với cột điều chế RP-18 (250 × 20 mm, 5 μm, YMC, Nhật Bản); máy cộng hưởng từ hạt nhân Bruker AM 600 FT-NMR; máy phổ hồng ngoại IS50 (Thermo Fisher Scientific, Mỹ); hệ khối phổ LC-MS Agilent 6530 Accurate-Mass Q-TOF (Agilent, Mỹ); hệ HPLC Agilent 1260 với detector PDA và Shimadzu LC-30C với detector PDA. Việc đóng chất chuẩn DMF vào lọ được thực hiện thủ công trong buồng thao tác kín khí (glove-box). Dụng cụ thủy tinh và thiết bị phụ trợ đạt cấp độ và dung tích phù hợp cho từng thao tác.

2.2.2. Hóa chất:

Chất đối chiếu DMF mua từ PhytoLab (Đức), lô PRF20082101, độ tinh khiết 99,14%. Toàn bộ hóa chất, dung môi dùng cho chiết xuất và phân lập đạt chuẩn phòng thí nghiệm; hóa chất, dung môi dùng cho phân tích đạt cấp phù hợp yêu cầu của từng kỹ thuật. Phân đoạn sắc ký cột được thực hiện trên *silica gel* pha thuận (Merck); phân lập DMF trên cột điều chế C18 (250 × 20 mm, 5 μm, YMC, Nhật Bản); đánh giá độ tinh khiết sắc ký và tạp chất của DMF phân lập trên cột phân tích C18 (250 × 4,6 mm, 5 μm, Phenomenex, Mỹ).

2.3. Phương pháp

2.3.1. Chiết xuất, phân lập và khẳng định cấu trúc nguyên liệu DMF từ ngải đen:

a. Chiết xuất DMF từ ngải đen

Quá trình chiết được thực hiện dựa trên kết quả khảo sát sơ bộ (được tóm tắt ở phần a, mục 3.1.1). Với mỗi mẻ chiết, 1,5 kg bột KP được chiết 3 lần, mỗi lần với 9 lít hỗn hợp ethanol – nước (80 : 20, tt/tt) bằng đun hồi lưu cách thủy ở 70°C trong 2,5 giờ. Gộp dịch chiết, cất thu hồi dung môi dưới áp suất giảm (< 200 mbar) sử dụng máy cắt quay ở 65°C, tốc độ quay 25 vòng/phút đến khi còn khoảng 1/10 thể tích ban đầu. Tiếp tục cô trên cách thủy ở 65°C đến khi thu được cao đặc mềm.

b. Phân lập DMF từ cao chiết

Quá trình phân lập được thực hiện dựa trên kết quả khảo sát sơ bộ (được tóm tắt ở phần a, mục 3.1.1). Trong mỗi lần phân lập, phân tán 200 – 250 g cao đặc mềm trong 600 mL nước, chuyển vào bình gạn và chiết phân bố với 600 mL *n*-hexan; loại lớp *n*-hexan, tiếp tục chiết lớp nước với 600 mL dicloromethan. Thu riêng lớp dicloromethan, cất loại dung môi dưới áp suất giảm đến khi thu được cao đặc của phân đoạn dicloromethan.

Cao đặc phân đoạn dicloromethan được trộn đều với *silica gel* 60 (tỷ lệ 1 : 2, kl/kl), nạp lên cột sắc ký thủy tinh chứa *silica gel* 60 ở kích thước cột thích hợp và rửa giải bằng các hỗn hợp dicloromethan – methanol có tỷ lệ thể tích khác nhau (chứa từ 100% đến 0% dicloromethan). Hứng riêng dịch rửa giải của mỗi phân đoạn hỗn hợp dung môi. Sự có mặt của DMF trong các phân đoạn được phát hiện bằng sắc ký lớp mỏng đối chiếu với chất chuẩn DMF (bản mỏng *silica gel* GF₂₅₄; pha động dicloromethan – acetone (9 : 1, tt/tt); phát hiện dưới đèn UV 254 nm). Các phân đoạn thu được với hỗn hợp dicloromethan – methanol (20 : 1, tt/tt), cất loại dung môi thu cần giàu DMF.

DMF được phân lập từ cần giàu DMF trên cột sắc ký điều chế C18 với pha động methanol – nước (55 : 45, tt/tt), tốc độ dòng 8 mL/phút trên hệ sắc ký lỏng điều chế; thể tích tiêm 600 μL; theo dõi bằng detector UV-Vis ở 264 nm để phát hiện pic DMF. Thu phân đoạn tương ứng pic DMF và cất loại dung môi thu DMF phân lập. DMF phân lập từ các mẻ được gộp và trộn đều tạo thành nguyên liệu DMF.

c. Khẳng định cấu trúc nguyên liệu DMF

Cấu trúc của DMF phân lập được trong nguyên liệu được khẳng định bằng cách đo phổ NMR, IR, MS và UV-Vis và đối chiếu kết quả thu được với dữ liệu phân tích tương ứng của chất chuẩn đối chiếu DMF.

2.3.2. Kiểm tra chất lượng nguyên liệu DMF:

Tiêu chuẩn đánh giá chất lượng nguyên liệu DMF phân lập được gồm các chỉ tiêu và yêu cầu cần đạt sau:

a. *Tính chất*: Bột kết tinh màu vàng nhạt, quan sát bằng mắt thường dưới ánh sáng tự nhiên.

b. Định tính

(i) HPLC: Trong nội dung thử tạp chất liên quan, thời gian lưu và phổ UV-Vis của pic chính trên sắc ký đồ dung dịch thử phải tương đồng với thời gian lưu và phổ UV-Vis của pic DMF trên sắc ký đồ dung dịch đối chiếu R1.

(ii) IR: phổ hồng ngoại của chất phân lập phải tương đồng với phổ của chất chuẩn đối chiếu DMF.

c. Tạp chất bay hơi

Không quá 0,5%, xác định bằng phân tích nhiệt trọng lượng (TGA) theo chương trình: nâng từ 25°C lên 115°C với tốc độ 10°C/phút, giữ ở 115°C trong 120 phút.

d. Tro toàn phần

Không quá 0,5%; thử với 0,2 g mẫu (Phương pháp 2, Phụ lục 9.8, ĐBVN VI) [7].

e. Tạp chất liên quan

- *Giới hạn*: Không quá 1,0% với mỗi tạp chất riêng lẻ và không quá 2,0% với tổng tạp chất.

- *Điều kiện sắc ký*: Định tính DMF và xác định tạp chất liên quan của nguyên liệu DMF được thực hiện bằng phương pháp HPLC xây dựng nội bộ đã thẩm định theo ICH [8] và AOAC International [9] (Kết quả thẩm định được trình bày ở mục 3.2.1). Phương pháp sử dụng cột C18 (250 × 4,6 mm, 5 μm) duy trì ở 35°C; pha động methanol – nước (75 : 25, tt/tt); tốc độ dòng 1,0 mL/phút; thể tích tiêm 20 μL; detector PDA ghi sắc ký đồ tại bước sóng 263 nm; thời gian phân tích bằng 4 lần thời gian lưu của pic DMF.

- Chuẩn bị mẫu:

+ Dung dịch thử: Chứa chính xác khoảng 0,5 mg DMF/mL trong methanol.

+ Dung dịch đối chiếu R1: pha trong methanol, chứa khoảng 0,5 mg DMF chuẩn/mL.

+ Dung dịch đối chiếu R2: pha loãng chính xác 1,0 mL dung dịch thử bằng methanol vừa đủ 100 mL (nồng độ DMF danh nghĩa ~5 μg/mL).

+ Mẫu trắng: methanol.

+ Dung dịch thử độ đặc hiệu: Để thẩm định phương pháp, dung dịch phân hủy cường bức được chuẩn bị bằng cách hòa khoảng 10 mg nguyên liệu DMF trong 8 mL methanol và thêm 4 mL acid hydrocloric 0,2 M hoặc thêm 4 mL natri hydroxyd 0,1 M và sấy ở 105°C trong 30 phút, trung hòa, để nguội và bổ sung methanol vừa đủ định mức; thêm 12 mL hydrogen peroxid 2,0% để yên 1 giờ trước khi tiêm; hai mẫu còn lại sử dụng nguyên liệu, sấy ở 105°C trong 5 giờ hoặc chiếu tia UV (200 – 400 nm) trong 24 giờ trước khi hòa tan và pha loãng vừa đủ trong 20,0 mL methanol để thử nghiệm.

Pic DMF trên sắc ký đồ dung dịch thử được định danh bằng cách so sánh thời gian lưu và phổ UV-Vis với pic chính trên sắc ký đồ dung dịch đối

chiếu R1. Phép thử có giá trị khi đạt tiêu chí độ thích hợp hệ thống khi RSD (%) diện tích pic DMF của dung dịch đối chiếu R2 không quá 2,0% sau 6 lần tiêm liên tiếp.

Tạp chất của nguyên liệu DMF được tính theo công thức:

$$\text{Tạp đơn (\%)} = S_{\text{tạp}} / S_{\text{R2}}$$

Trong đó, $S_{\text{tạp}}$ là diện tích pic tạp trên sắc ký đồ dung dịch thử; S_{R2} là diện tích pic DMF trên sắc ký đồ của dung dịch đối chiếu R2. Bỏ qua các pic tương ứng với pic của mẫu trắng (nếu có) và pic có diện tích dưới LOQ.

f. Hàm lượng DMF (% kl/kl): không dưới 95,0% tính theo nguyên trạng

Hàm lượng DMF được tính từ kết quả các chỉ tiêu c, d, e theo công thức:

$$C_{\text{DMF}}(\%) = [100\% - \text{tro toàn phần}(\%) - \text{tạp bay hơi}(\%)] \times \frac{(100\% - \text{tổng tạp}(\%))}{100\%}$$

2.3.3. Thiết lập chất chuẩn DMF:

Thực hiện thiết lập chuẩn theo hướng dẫn của ISO 17034 [10], ISO Guide 35 [11] và thường quy Thiết lập chất chuẩn, chất đối chiếu của Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương.

a. Đóng lọ và đánh giá tính đồng nhất của lọ

Nguyên liệu DMF được đóng vào lọ thủy tinh và hàn kín, mỗi lọ chứa 10 mg, tổng 100 lọ; mỗi lọ được mã hóa bằng một số ngẫu nhiên duy nhất từ 1 đến 100. Chọn ngẫu nhiên 12 lọ để đánh giá tính đồng nhất của quá trình đóng gói (mỗi lọ cân chính xác khoảng 5 mg x 02 lần pha mẫu). Quá trình đóng gói thực hiện trong buồng glove-box kín khí ở nhiệt độ phòng, độ ẩm tương đối trong buồng ~4%, các lọ được nạp khí nitơ tinh khiết 99,99%.

b. Đánh giá liên phòng thí nghiệm

Xác định độ tinh khiết sắc ký (CP): chọn ngẫu nhiên 12 lọ, gửi đến 2 phòng thí nghiệm đạt GLP và ISO/IEC 17025 (mỗi phòng 6 lọ) để xác định mức tạp chất liên quan của DMF. Tổng tạp của mỗi phòng được tính theo công thức ở mục 2.3.2.e. Độ tinh khiết sắc ký được xác định bằng cách lấy 100% trừ đi tổng tạp chất liên quan. Hai giá trị CP (%) được đánh giá thống kê bằng kiểm định T (T-test); nếu khác biệt không có ý nghĩa thống kê thì tổng tạp (%) của chất chuẩn là trung bình hai giá trị. Độ không đảm bảo đo của CP (%) (u_{CP}) được tính theo loại A ở mức tin cậy 95%:

$$u = s/\sqrt{n}$$

Trong đó, s là độ lệch chuẩn của n giá trị từ 2 phòng ($n = 12$).

Xác định tạp chất bay hơi: chọn ngẫu nhiên 3 lọ, xác định bằng TGA; giá trị dùng để tính giá trị ấn định là trung bình 3 kết quả; độ không đảm bảo đo (u_{BH}) tính theo loại A ở mức tin cậy 95%.

Tro toàn phần: do kết quả tro toàn phần của nguyên liệu DMF không bị ảnh hưởng bởi quá trình đóng gói và không thay đổi khi bảo quản trong lọ, phép thử được thực hiện trực tiếp trên nguyên liệu DMF trước khi đóng gói, dùng 3 phần khác nhau; giá trị dùng để tính giá trị ấn định là trung bình 3 kết quả; độ không đảm bảo đo (u_{tro}) tính theo loại A ở mức tin cậy 95%.

Giá trị ấn định về hàm lượng DMF (%) của chất chuẩn được tính theo công thức ở mục 2.3.2.f. Độ không đảm bảo đo của giá trị ấn định được tính:

$$u = \sqrt{u_{CP}^2 + u_{tro}^2 + u_{BH}^2 + u_{DN}^2}$$

Trong đó, u_{DN} là giá trị độ không đảm bảo đo được tính từ độ không đồng nhất của mẫu (Mục 3.3.1).

Độ không đảm bảo đo mở rộng: $U = u \times 2$ ($k = 2$).

3. Kết quả và Bàn luận

3.1. Chiết xuất, phân lập và xác định cấu trúc nguyên liệu DMF

3.1.1. Chiết xuất, phân lập:

a. Khảo sát sơ bộ

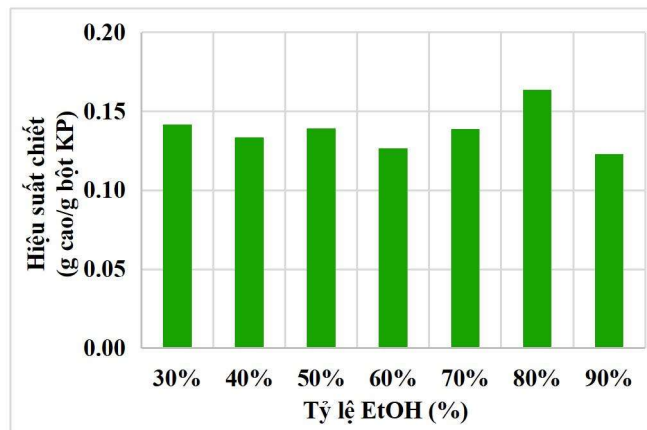
Quá trình chiết DMF từ ngải đen

Điều kiện chiết DMF từ ngải đen được xác định thông qua khảo sát lần lượt các yếu tố: dung môi chiết, kỹ thuật chiết, tỷ lệ bột KP/dung môi và số lần chiết; mỗi yếu tố được đánh giá dựa trên hiệu suất chiết, tính theo tỷ lệ khối lượng cao đặc mềm (hoặc cao khô kiệt) trên khối lượng bột đưa vào chiết.

Về dung môi chiết, khoảng 20 g bột KP được chiết hồi lưu cách thủy ở 70°C trong 2,5 giờ với 100 mL hỗn hợp ethanol – nước ở các tỷ lệ từ 30 : 70 đến 90 : 10 (tt/tt). Kết quả cho thấy hỗn hợp ethanol – nước (80 : 20, tt/tt) cho hiệu suất chiết cao nhất (Hình 1).

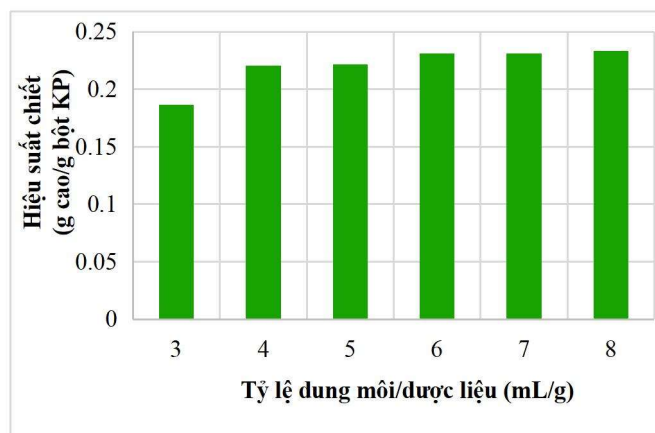
Về kỹ thuật chiết, khoảng 20 g bột KP được chiết với 100 mL ethanol – nước (80 : 20, tt/tt) theo hai kỹ thuật: chiết hồi lưu ở 70°C trong 2,5 giờ và ngâm ở nhiệt độ phòng trong 48 giờ. Chiết hồi lưu

cho hiệu suất khoảng 0,17% (kl/kl), cao hơn so với chiết ngâm (khoảng 0,12%). Do đó, kỹ thuật chiết hồi lưu được lựa chọn.



Hình 1. Kết quả khảo sát lựa chọn dung môi chiết

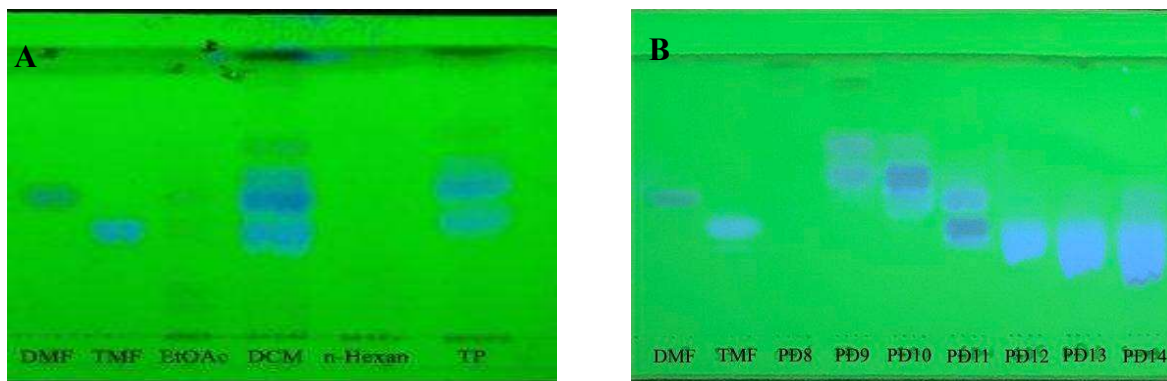
Về tỷ lệ bột KP/dung môi, khoảng 20 g bột KP được chiết hồi lưu cách thủy ở 70°C trong 2,5 giờ với hỗn hợp ethanol – nước (80 : 20, tt/tt) ở các tỷ lệ từ 3 đến 8 mL/g bột KP. Tỷ lệ 6 mL/g bột KP cho hiệu suất chiết phù hợp nhất (Hình 2).



Hình 2. Kết quả khảo sát tỷ lệ dung môi chiết so với lượng bột KP đầu vào

Về số lần chiết, khoảng 20 g bột KP được chiết hồi lưu từ 1 đến 4 lần, mỗi lần với 120 mL ethanol – nước (80 : 20, tt/tt) trong 2,5 giờ; dịch chiết được gộp và cô đến cao đặc mềm. Kết quả cho thấy chiết 3 lần là thích hợp nhất.

Từ các kết quả trên, điều kiện chiết DMF từ ngải đen được lựa chọn là: chiết hồi lưu cách thủy ở 70°C bằng dung môi ethanol – nước (80 : 20, tt/tt) với tỷ lệ 6 mL/g bột KP, chiết 3 lần, mỗi lần 2,5 giờ (mục 2.3.1).



Hình 3. Kết quả khảo sát lựa chọn phân đoạn để phân lập sơ bộ DMF (A) và lựa chọn phân đoạn sau khi phân lập trên sắc ký cột pha thuận (B).

Quá trình phân lập sơ bộ DMF từ cao chiết

Để lựa chọn phân đoạn phù hợp cho việc phân lập DMF từ cao chiết, trong nghiên cứu sơ bộ khoảng 20 g cao đặc mềm đã được phân tán trong 60 mL nước rồi chiết lần lượt với 60 mL của các dung môi *n*-hexan, dicloromethan và ethyl acetat. Lọc dịch chiết với từng dung môi và lọc nước còn lại được kiểm tra phát hiện DMF bằng sắc ký lớp mỏng đối chiếu với chất chuẩn DMF (sử dụng bản mỏng *silica gel* GF₂₅₄; pha động dicloromethan – acetone (9 : 1, tt/tt); phát hiện vết bằng quan sát bản mỏng dưới đèn UV 254 nm). Qua đó xác định DMF được phân tán nhiều trong dịch chiết với dicloromethan (Hình 3, A).

Quá trình phân lập bằng tách phân đoạn trên cột sắc ký pha thuận

Khoảng 8 g cao phân đoạn dicloromethan được thêm dần 16 g *silica gel* 60 vào và trộn đều đến khi tạo được dạng khô tơi. Mẫu cao phân tán trong *silica gel* sau đó được chuyển lên cột nhồi thủy tinh (đường kính 6,2 cm, chiều dài 100 cm) để tiếp tục tách phân đoạn. Rửa giải với hỗn hợp dung môi

dicloromethan – MeOH (tỷ lệ lần lượt là 100:0, 50:1, 30:1, 20:1, 10:1 và 0:100, tt/tt), hứng dịch rửa giải vào ống nghiệm, mỗi ống 5 mL. Kiểm tra các phân đoạn bằng sắc ký lớp mỏng cho thấy DMF được rửa giải ở tỷ lệ dung môi dicloromethan – MeOH là 20 : 1 (tt/tt) (tương ứng PD11 trong Hình 3, B).

Quá trình tinh chế trên cột sắc ký lỏng điều chế pha đảo

Khảo sát sơ bộ cho thấy sử dụng cột sắc ký điều chế pha đảo C18 với pha động là hỗn hợp methanol – nước (55:45, tt/tt) tốc độ dòng 8 mL/phút cho phép tách riêng DMF khỏi các hợp chất khác của PD11.

b. Kết quả chiết xuất, phân lập

Quy trình ở mục 2.3.1 được áp dụng trên 3 mẻ nguyên liệu ngải đen. Kết quả (Bảng 1) cho thấy quy trình cho hiệu suất DMF phân lập ổn định (455 – 512 mg/kg nguyên liệu), phù hợp làm quy trình thường quy để sản xuất DMF từ ngải đen phục vụ thiết lập chuẩn.

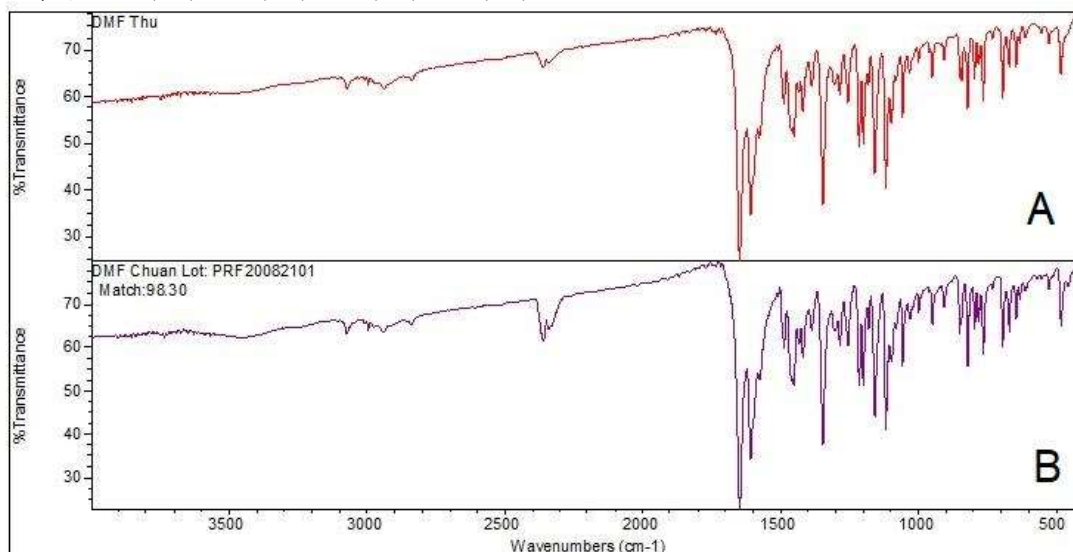
Bảng 1. Tổng hợp kết quả chiết xuất và phân lập DMF

Bước / chỉ tiêu	Mẻ 1	Mẻ 2	Mẻ 3
1. Chiết xuất từ nguyên liệu ngải đen			
Khối lượng nguyên liệu (kg)	1,55	1,51	1,53
Khối lượng cao dicloromethan (g)	170,78	190,69	180,56
2. Phân đoạn cao DCM trên cột <i>silica gel</i>			
Cao giàu DMF thu được (g)	7,80	8,24	7,27
3. Phân lập DMF trên hệ HPLC điều chế			
Khối lượng DMF phân lập (mg)	705,6	773,7	745,4

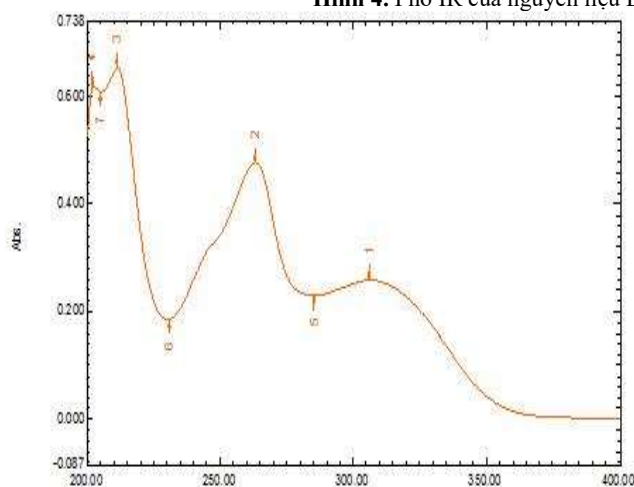
3.1.2. Xác định cấu trúc

Phổ IR của nguyên liệu DMF (Hình 4, A) có $\nu_{\max}$ (cm⁻¹) tại 1647,52; 1607,95; 1346,22; 1158,22,

phù hợp với phổ của chất chuẩn đối chiếu DMF (hệ số tương đồng 98,30%, Hình 4, B).



Hình 4. Phổ IR của nguyên liệu DMF (A) và mẫu chuẩn DMF (B)



Hình 5. Phổ UV-Vis của hợp chất DMF

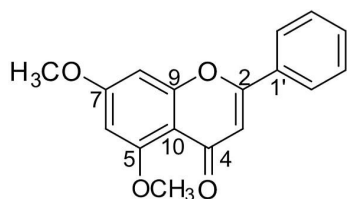
Phổ UV-Vis (trong MeOH, Hình 5): $\lambda_{\max}$ tại 211,2 nm; 263,2 nm và 305,8 nm.

Phổ ESI-MS: m/z 283,4 [M+H]⁺.

¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃) δ_H (ppm): 7,86 (2H, m, H-2', H-6'); 7,49 (3H, m, H-3', H-4', H-5'); 6,67 (1H, s, H-3); 6,57 (1H, d, $J = 1,8$ Hz, H-8); 6,38 (1H, d, $J = 2,4$ Hz, H-6); 3,96 (3H, s, 5-OCH₃); 3,91 (3H, s, 7-OCH₃).

¹³C-NMR (150 MHz, CDCl₃) δ_C (ppm): 177,6 (C-4); 164,1 (C-7); 161,0 (C-5); 160,7 (C-2); 159,9 (C-9); 131,6 (C-1'); 131,2 (C-4'); 128,9 (C-3', C-5'); 126,0 (C-2', C-6'); 109,4 (C-10); 109,1 (C-3); 96,2 (C-6); 92,9 (C-8); 56,4 (7-OCH₃); 55,8 (5-OCH₃).

Khẳng định cấu trúc hợp chất DMF: Phổ ¹H-NMR của **DMF** chỉ ra tín hiệu proton của 2 nhóm methoxy tại δ_H 3,96 (5-OCH₃) và 3,91 (7-OCH₃); 2 proton *meta* của vòng A tại δ_H 6,38 (1H, d, $J = 2,4$ Hz, H-6) và 6,57 (1H, d, $J = 1,8$ Hz, H-8); 1 proton singlet của vòng C tại δ_H 6,67 (1H, s, H-3) và 5 proton của vòng B tại δ_H 7,86 (2H, m, H-2', H-6') và 7,49 (3H, m, H-3', H-4', H-5'), gợi ý vòng B bị thế ở vị trí 1'. Dữ liệu phổ ¹H-NMR gợi ý **DMF** là 5,7-dimethoxyflavon. Phổ ¹³C-NMR và HSQC của **DMF** cho thấy 15 tín hiệu ứng với 17 carbon, trong đó có 1 keton [δ_C 177,6 (C-4)]; 2 carbon methoxy [δ_C 56,4 (7-OCH₃) và 55,8 (5-OCH₃)]; 8 carbon CH [δ_C 109,1 (C-3), 96,2 (C-6), 92,9 (C-8), 126,0 (C-2', C-6'), 128,9 (C-3', C-5') và 131,2 (C-4')] và 6 carbon C [δ_C 160,7 (C-2), 161,0 (C-5), 164,1 (C-7), 159,9 (C-9), 109,4 (C-10) và 131,6 (C-1')] phù hợp với cấu trúc dự đoán. Vị trí của 2 nhóm methoxy được xác định tại C-5 và C-7 thông qua tương tác HMBC giữa proton δ_H 3,96 và H-6 (δ_H 6,38) với C-5 (δ_C 161,0); và giữa proton δ_H 3,91, H-6 (δ_H 6,38) và H-8 (δ_H 6,57) với C-7 (δ_C 164,1). Phổ ESI-MS của **DMF** cho pic ion giả phân tử tại m/z 283,4 [M+H]⁺ (C₁₇H₁₅O₄). Từ những phân tích trên kết hợp với tài liệu [12], có thể kết luận rằng hợp chất đang nghiên cứu chính là **5,7-dimethoxyflavon** (Hình 6).



Hình 6. Công thức cấu tạo của hợp chất DMF

3.2. Kiểm tra chất lượng nguyên liệu DMF

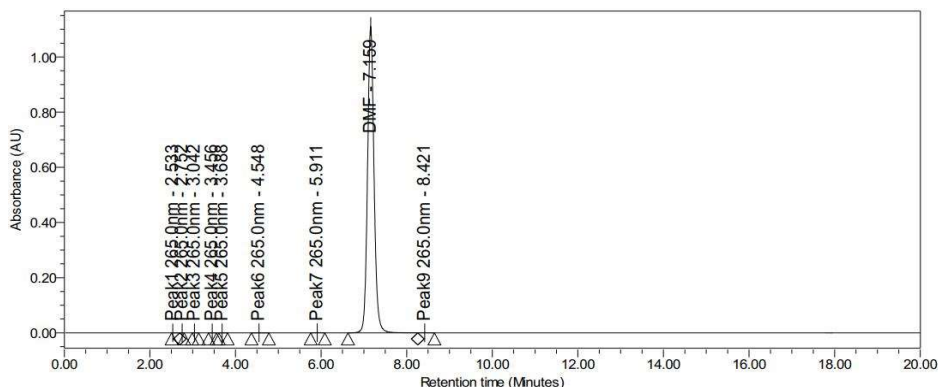
3.2.1. Xây dựng và thẩm định phương pháp HPLC đánh giá tạp chất liên quan của nguyên liệu DMF:

Phổ UV-Vis của DMF trong methanol có ba cực đại hấp thụ tại khoảng 211,2, 263,2 và 305,8 nm, trong đó độ hấp thụ tại vùng 263 nm cao gấp khoảng hai lần so với tại 306 nm và thấp hơn tại 211 nm. Mặc dù 211 nm cho tín hiệu mạnh nhất nhưng đây là vùng tử ngoại xa, nơi pha động và tạp nền hấp thụ mạnh, làm độ nhiễu đường nền cao – bất lợi cho phép thử tạp chất liên quan vốn cần phát hiện các pic ở mức vết; kết quả khảo sát xác nhận đường nền tại 211 nm

nhiều hơn hẳn so với vùng 263 nm, trong khi 306 nm tuy nền sạch nhưng độ nhạy thấp. Do đó, sắc ký đồ được ghi ở 263 nm, là điểm cân bằng tối ưu giữa độ nhạy và tỷ số tín hiệu/nhiều.

DMF là flavon methoxy hóa thân dầu, phù hợp sắc ký pha đảo trên cột C_{18} ($250 \times 4,6$ mm, 5 μ m); hệ pha động methanol – nước được chọn vì tương thích với dung môi hòa tan mẫu và phù hợp điều kiện thường quy, với tỷ lệ 75 : 25 (tt/tt) đưa DMF ra ở thời gian lưu hợp lý và tách tốt khỏi các tạp liên quan. Nhiệt độ cột 35°C giúp ổn định thời gian lưu và độ phân giải; tốc độ dòng 1,0 mL/phút và thể tích tiêm 20 μ L bảo đảm hiệu lực tách cùng độ nhạy ở mức vết mà không quá tải cột; thời gian phân tích đặt bằng 4 lần thời gian lưu của pic DMF để không bỏ sót các tạp kém phân cực lưu giữ mạnh hơn.

Với điều kiện phân tích đã lựa chọn, sắc ký đồ của mẫu thử DMF khi phân tích cho các tạp tách hoàn toàn khỏi pic chính, pic chính có độ tinh khiết đạt 100% (Hình 7).



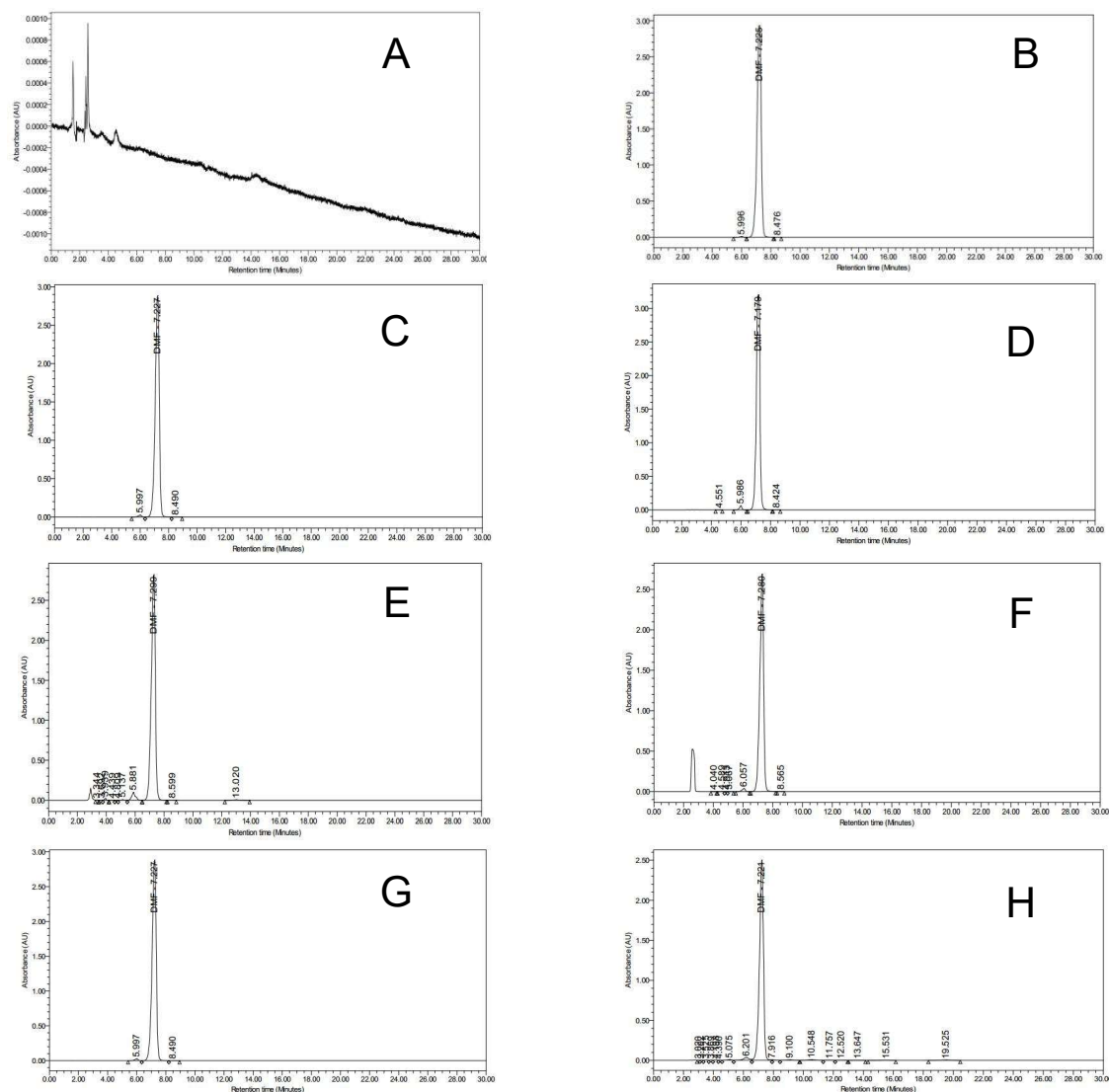
Hình 7. Sắc ký đồ phân tích mẫu thử DMF

Tiếp tục thẩm định phương pháp phân tích theo yêu cầu của ICH [8] và AOAC International [9] về độ thích hợp hệ thống, tính đặc hiệu, tính tuyến tính, độ đúng, độ chính xác và giới hạn định lượng.

Kết quả tóm tắt ở Bảng 2; các sắc ký đồ đại diện ở Hình 8. Kết quả cho thấy phương pháp phù hợp với mục đích sử dụng.

Bảng 2. Tóm tắt kết quả thẩm định phương pháp

Chỉ tiêu	Yêu cầu	Kết quả
Độ thích hợp hệ thống (dung dịch R2)	t_R , (n=6): $RSD \leq 1,0\%$; S_{pic} (n=6): $RSD \leq 2,0\%$	t_R : $RSD = 0,1\%$; S_{pic} : $RSD = 1,0\%$
Độ đặc hiệu	(1) Mẫu trắng: không có pic tại t_R DMF; (2) Dung dịch thử: t_R pic chính trùng t_R của DMF (dung dịch R1); (3) Dung dịch phân hủy: pic sản phẩm phân hủy (nếu có) tách tốt, pic DMF tinh khiết	Đáp ứng yêu cầu (Hình 8A–H)
Giới hạn phát hiện	S/N của pic DMF ≥ 3	0,08 μ g/mL (0,016% nồng độ dung dịch thử)
Giới hạn định lượng	S/N của pic DMF ≥ 10	0,28 μ g/mL (0,056% nồng độ dung dịch thử)
Tính tuyến tính	Khoảng: từ LOQ đến $\geq 120\%$ giới hạn tạp (ICH Q2(R2)); $r \geq 0,998$ Thử tại các điểm: 0,281 μ g/mL (LOQ); 0,525 μ g/mL; 1,06 μ g/mL; 5,34 μ g/mL và 27,9 μ g/mL	0,281–27,9 μ g/mL; $r = 0,99998$
Độ đúng	Tỷ lệ thu hồi 90–107% tại 27,9 μ g/mL và 80–110% tại các mức khác.	Đạt (độ thu hồi tại LOQ: 85,2%; các mức khác 95,4–102,0%)
Độ chính xác	(1) Độ lặp lại: RSD tổng tạp (n=6) $\leq 7,3\%$; (2) Độ chính xác trung gian: RSD tổng tạp (n=12) $\leq 11\%$.	(1) Tổng tạp: 0,48%; $RSD = 4,8\%$; (2) Tổng tạp: 0,50%; $RSD = 6,4\%$.



Hình 8. Sắc ký đồ đại diện thẩm định tính đặc hiệu (A: mẫu trắng; B: dung dịch thử; C: dung dịch đối chiếu; D: phân hủy acid; E: phân hủy kiềm; F: phân hủy H₂O₂; G: phân hủy nhiệt; H: phân hủy UV).

3.2.2. Kết quả kiểm tra chất lượng nguyên liệu DMF: Chất lượng nguyên liệu DMF được kiểm tra theo các chỉ tiêu ở mục 2.3.2; kết quả (Bảng 3) cho thấy nguyên liệu đạt tiêu chuẩn đề ra.

Bảng 3. Kết quả kiểm tra chất lượng nguyên liệu DMF

Chỉ tiêu	Yêu cầu	Kết quả
Tính chất	Bột kết tinh màu vàng nhạt	Đạt
Định tính	IR: phổ trùng phổ chất chuẩn đối chiếu DMF; HPLC: t _R pic DMF trùng dung dịch đối chiếu	Đúng
Tạp chất bay hơi	Không quá 0,5%	Đạt (0,05%)
Tro toàn phần	Không quá 0,5%	Đạt (0,06%)
Tạp chất liên quan	Tạp đơn ≤ 1,0%; tổng tạp ≤ 2,0%	Đạt (tạp đơn 0,13% và 0,35%; tổng tạp 0,49%)
Hàm lượng	Hàm lượng DMF (C ₁₇ H ₁₄ O ₄) ≥ 95,0%, tính theo nguyên trạng	Đạt (99,40%)

3.3. Thiết lập chất chuẩn DMF

3.3.1. Đánh giá tính đồng nhất:

Tính đồng nhất của lô chất chuẩn được đánh giá bằng phương pháp tạp chất liên quan (HPLC): 12 lọ được chọn ngẫu nhiên, mỗi lọ được chuẩn bị và phân tích độc lập 2 lần. Đại lượng đánh giá là độ

tinh khiết sắc ký (TKSK = 100 – tổng tạp chất), tính từ tỷ lệ diện tích pic nên không phụ thuộc khối lượng cân mẫu, loại được ảnh hưởng của sai số cân và thể tích tiêm. Kết quả được trình bày ở Bảng 4.

Bảng 4. Kết quả đánh giá tính đồng nhất bằng phương pháp tạp chất liên quan

TT	Lọ số	Tổng tạp lần 1 (%)	Tổng tạp lần 2 (%)	TKSK trung bình (%)
1	3	0,49	0,47	99,52
2	8	0,46	0,50	99,52
3	11	0,51	0,47	99,51
4	19	0,44	0,50	99,53
5	26	0,52	0,49	99,50
6	33	0,47	0,49	99,52
7	43	0,48	0,48	99,52
8	51	0,45	0,46	99,55
9	64	0,45	0,49	99,53
10	71	0,44	0,44	99,56
11	73	0,50	0,51	99,50
12	86	0,48	0,50	99,51
TKSK trung bình (%)				99,52
RSD (%)				0,02

Số liệu được xử lý bằng phân tích phương sai một chiều (yếu tố: lọ) nhằm tách phương sai giữa

các lọ khỏi phương sai giữa hai lần chuẩn bị trong cùng một lọ (Bảng 5).

Bảng 5. Kết quả phân tích phương sai (ANOVA) đánh giá tính đồng nhất

Nguồn biến thiên	Tổng bình phương (SS)	Bậc tự do (đf)	Trung bình bình phương (MS)
Giữa các lọ	0,007712	11	0,000701
Trong lọ (giữa 2 lần chuẩn bị)	0,005350	12	0,000446
F = 1,57; F lý thuyết (0,05; 11; 12) = 2,72; p = 0,22			

Giá trị F = 1,57 nhỏ hơn F lý thuyết = 2,72 (p = 0,22) cho thấy khác biệt về độ tinh khiết giữa các lọ không có ý nghĩa thống kê ở mức tin cậy 95%; lô chất chuẩn đạt yêu cầu đồng nhất theo ISO Guide 35 [11].

Độ lệch chuẩn giữa các lọ, sử dụng làm thành phần độ không đảm bảo đo do độ không đồng nhất (u_{DN}) trong thành phần độ không đảm bảo đo của giá trị ấn định, được tính theo công thức:

$$u_{DN} = \sqrt{MS_{giữa} - MS_{trong}} = 0,0113\%$$

3.3.2. Đánh giá liên phòng về độ tinh khiết sắc ký:

Độ tinh khiết sắc ký (TKSK) của chất chuẩn DMF được xác định bằng phương pháp tạp chất liên quan đã thẩm định (mục 3.2.1): 12 lọ chọn ngẫu nhiên được phân tích tại 2 phòng thí nghiệm đạt GLP và ISO/IEC 17025 thuộc Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương là Khoa Nghiên cứu và Phát triển (PTN1) và Khoa Kiểm nghiệm Đông dược – Dược liệu (PTN2), mỗi PTN 06 lọ. Trong đó, PTN2 đóng vai trò xác nhận độc lập kết quả của phòng thiết lập. TKSK của mỗi mẫu được tính theo TKSK = 100 – tổng tạp chất (%). Kết quả được trình bày ở Bảng 6.

Bảng 6. Kết quả xác định độ tinh khiết sắc ký của chất chuẩn DMF tại 2 phòng thí nghiệm.

Mẫu (lọ)	TKSK – PTN 1 (%)	TKSK – PTN 2 (%)
1	99,52	99,48
2	99,52	99,54
3	99,51	99,45
4	99,50	99,49
5	99,52	99,51
6	99,51	99,52
Trung bình (%)	99,51	99,50
Gộp 2 PTN (n = 12): TKSK trung bình = 99,51%; RSD = 0,02%; $u_{CP} = 0,007\%$; $T_{in} = 1,12 < T_{tc} = 2,23$		

Kết quả hai phòng được so sánh bằng kiểm định T (Student). Giá trị tính được $T_{in} = 1,12$ nhỏ hơn giá trị tới hạn $T_{tc} = 2,23$ ($\alpha = 0,05$), cho thấy trung bình TKSK của hai phòng khác nhau không có ý nghĩa thống kê ở mức tin cậy 95%. Do đó TKSK của chất chuẩn DMF được lấy bằng trung bình chung của 12 giá trị, là 99,51%, với độ không đảm bảo đo loại A là $u_{CP} = s/\sqrt{12} = 0,007\%$.

Trong trường hợp này, giá trị ấn định của chất chuẩn được xác định bằng phương pháp cân bằng khối lượng tại phòng thiết lập, phòng thứ hai đóng

vai trò xác nhận độc lập; nghiên cứu chưa thực hiện đánh giá đặc trưng hóa liên phòng đầy đủ (thường là ≥ 6 phòng), nên u_{CP} chủ yếu phản ánh độ chụm của phương pháp phân tích.

3.3.3. Xác định giá trị ấn định:

Tạp chất bay hơi được xác định bằng phương pháp phân tích nhiệt trọng lượng (TGA) trên 3 lọ chọn ngẫu nhiên (Bảng 7). Tro toàn phần được xác định trên nguyên liệu trước đóng gói với 3 phần khác nhau, do chỉ tiêu này không phát sinh trong quá trình đóng gói và không thay đổi khi bảo quản.

Bảng 7. Kết quả xác định tạp chất bay hơi và tro toàn phần

STT	Tạp chất bay hơi (%)	Tro toàn phần (%)
1	0,04	0,06
2	0,05	0,07
3	0,05	0,06
Trung bình (%)	0,05	0,06
RSD (%)	12,86	9,12
Độ không đảm bảo đo (loại A) u (%)	0,003	0,003

Từ độ tinh khiết sắc ký (mục 3.3.2) cùng kết quả tạp chất bay hơi và tro toàn phần, giá trị ấn định về hàm lượng DMF được tính theo cân bằng khối lượng:

$$X (\%) = 99,51\% \times \{[100\% - (0,05\% + 0,06\%)]/100\% \} = 99,40\%$$

Độ không đảm bảo đo của quá trình đặc trưng hóa (theo ISO 17034 [10]):

$$u = \sqrt{0,007^2 + 0,003^2 + 0,003^2 + 0,0113^2} = 0,014\%$$

Độ không đảm bảo đo mở rộng ($k = 2$, mức tin cậy 95%):

$$U = 2 \times u = 0,03\%$$

Như vậy, giá trị công bố trên phiếu kiểm nghiệm của chất chuẩn DMF: hàm lượng 99,40% $C_{17}H_{14}O_4$

Bảng 8. Kết quả theo dõi độ ổn định (trung bình theo mốc)

Mốc (tháng)	0	3	6	9	12
TKSK TB (%)	99,51	99,52	99,52	99,50	99,49
Tạp bay hơi TB (%)	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05

Hồi quy tuyến tính TKSK (vẫn được tính theo tổng tạp chất liên quan) theo thời gian cho độ dốc $b_1 = -0,0021\%/tháng$; kiểm định cho thấy độ dốc không có ý nghĩa thống kê ($t = -2,67$; $t(0,975; 3) = 3,18$; $p = 0,076$), tức là TKSK không thay đổi có ý nghĩa trong 12 tháng. Thành phần độ không đảm

(tính theo nguyên trạng); độ không đảm bảo đo mở rộng $U = \pm 0,03\%$ (hệ số phủ $k = 2$, mức tin cậy 95%); bảo quản ở $2 - 8^\circ C$, tránh ánh sáng trực tiếp.

3.3.4. Độ ổn định:

Độ ổn định được đánh giá theo thiết kế đăng thời của ISO Guide 35 [11]: các lọ được bảo quản ở $-20^\circ C$ và chuyển ngẫu nhiên 06 lọ sang bảo quản ở $2 - 8^\circ C$ tại các mốc thời gian (0, 3, 6, 9, 12 tháng), phân tích đồng loạt tại tháng 12; mỗi mốc dùng 3 lọ, mỗi lọ phân tích thành 02 phân tích độc lập cho độ tinh khiết sắc ký (HPLC) và 3 lọ cho tạp chất bay hơi (TGA). Kết quả trung bình theo mốc thời gian được trình bày ở Bảng 8.

bảo do độ ổn định ($u_{lis} = |s(b_1)| \times 12 = 0,0095\%$). Tạp chất bay hơi ổn định quanh 0,05% (độ dốc không có ý nghĩa), dự đoán 0,05% tại 12 tháng, dưới giới hạn 0,5%.

Xu hướng dự đoán của TKSK trong 12 tháng (0,025%) nhỏ hơn độ không đảm bảo đo mở rộng

của giá trị ấn định ($\pm 0,03\%$); không xuất hiện tạp phân hủy vượt giới hạn (tạp riêng lẻ $\leq 1,0\%$, tổng tạp $\leq 2,0\%$).

Như vậy, chất chuẩn DMF ổn định ở 2 – 8°C đến 12 tháng; hạn kiểm tra lại được ấn định là 12 tháng.

3.4. Bàn luận

Ngải đen hiện được sử dụng rộng rãi trong các sản phẩm bảo vệ sức khỏe, đặt ra yêu cầu cấp thiết về kiểm soát chất lượng đối với cả nguồn nguyên liệu và thành phẩm. Theo quy định hiện hành, công tác kiểm nghiệm đòi hỏi việc sử dụng các hợp chất tinh khiết làm chất chuẩn đánh dấu (marker) [4],[6]. Trong đó, DMF là một hợp chất mang cả hoạt tính sinh học và tính đặc trưng hóa học cao của ngải đen. Do đó, việc nghiên cứu phân lập và thiết lập chất chuẩn đối chiếu DMF từ thân rễ loài này là một nhu cầu thực tiễn phục vụ công tác kiểm nghiệm.

Nghiên cứu đã xây dựng được quy trình hoàn chỉnh để thiết lập chất chuẩn DMF từ thân rễ ngải đen gồm đầy đủ các giai đoạn: chiết xuất, phân lập, đánh giá chất lượng nguyên liệu và thiết lập chuẩn. Dữ liệu thực nghiệm trên 3 mẻ cho thấy quy trình ổn định về hiệu suất phân lập (455 – 512 mg/kg nguyên liệu), cho sản phẩm phân lập tinh khiết (độ tinh khiết sắc ký 99,51%), chất chuẩn sau khi đóng lọ ổn định trong tối thiểu 12 tháng, phù hợp làm chất chuẩn định tính và định lượng trong kiểm nghiệm. Quy trình này mang tính ứng dụng cao, cho phép các cơ sở kiểm nghiệm có đủ trang thiết bị tự thiết lập chất chuẩn cơ sở (working standard).

Mặc dù vậy, nghiên cứu vẫn tồn tại một số hạn chế nhất định. Thứ nhất, trong các thành phần sử dụng để tính toán giá trị ấn định mới chỉ có độ tinh khiết sắc ký được thực hiện tại hai phòng thí nghiệm đạt chuẩn ISO/IEC 17025, các thành phần còn lại mới phân tích tại một phòng thí nghiệm, chưa phải là một nghiên cứu liên phòng toàn diện. Thứ hai, kết quả hiện chỉ dựa trên một phương pháp phân tích duy nhất (cân bằng khối lượng), thiếu sự đối chứng với các phương pháp trực giao như quang phổ cộng hưởng từ hạt nhân định lượng (qNMR) hoặc nhiệt lượng kế quét vi sai (DSC). Những giới hạn này được đưa ra nhằm đảm bảo chất chuẩn được ứng dụng đúng phạm vi và giới hạn cho phép.

4. Kết luận

Nghiên cứu đã xây dựng được quy trình phân lập, tinh chế DMF từ thân rễ loài ngải đen (*Kaempferia parviflora* Wall. ex Baker) và thiết lập chất chuẩn DMF. Quy trình chiết xuất – phân lập DMF, tiêu chuẩn kiểm tra chất lượng nguyên liệu và phương pháp HPLC đánh giá độ tinh khiết sắc ký đã được xây dựng và thẩm định theo yêu cầu hiện hành. Chất chuẩn được khẳng định về cấu trúc, đánh giá đồng nhất theo ISO Guide 35 (phân tích phương sai một chiều) và thiết lập giá trị ấn định hàm lượng 99,40% với độ không đảm bảo đo mở rộng $U = \pm 0,03\%$ ($k = 2$), phù hợp cho mục đích sử dụng định tính và định lượng trong kiểm tra chất lượng các mẫu cần dùng chất chuẩn DMF.

Tài liệu tham khảo

1. Horigome S., Yoshida I., Tsuda A., Harada T., Yamaguchi A., Yamazaki K., Inohana S., Isagawa S., Kibune N., Satoyama T., Katsuda S., Suzuki S., Watai M., Hirose N., Mitsue T., Shirakawa H., Komai M., (2014), Identification and evaluation of anti-inflammatory compounds from *Kaempferia parviflora*, *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 78, 851-860.
2. Jeong D., Kim D. H., Chon J. W., Kim H., Lee S. K., Kim H. S., Yim J. H., Song K. Y., Kang I. B., Kim Y. J., Park J. H., Jang H. S., Kang S. H., Kim S. K., Seo K. H., (2016), Antibacterial effect of crude extracts of *Kaempferia parviflora* (Krachaidam) against *Cronobacter* spp. and enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) in various dairy foods: A preliminary study, *Journal of Milk Science and Biotechnology*, 34, 63-68.
3. Rujjanawate C., Kanjanapothi D., Amornlerdpison D., Pojanagaroon S. (2005), Anti-gastric ulcer effect of *Kaempferia parviflora*, *Journal of Ethnopharmacology*, 102, 120-122.
4. European Medicines Agency (2022), *Guideline on quality of herbal medicinal products/traditional herbal medicinal products*.
5. Mayangsari Y., Okudaira M., Mano C., Tanaka Y., Ueda O., Sakuta T., Suzuki Y., Yamamoto Y., Suzuki T., (2021), 5,7-Dimethoxyflavone enhances barrier function by increasing occludin and reducing claudin-2 in human intestinal Caco-2 cells, *Journal of Functional Foods*, 85, 104641.
6. World Health Organization (2017), *WHO Technical Report No.1003, Annex 1: WHO guidelines for selecting marker substances of herbal origin for quality control of herbal medicines*.
7. Bộ Y tế (2026), *Dược điển Việt Nam VI*, Nhà xuất bản Y học, Hà Nội, PL264.
8. International Council for Harmonisation (2023), *ICH Harmonised Guideline: Validation of Analytical Procedures Q2(R2)*.
9. AOAC International (2016), *AOAC Official Methods of Analysis, Appendix F: Guidelines for Standard Method Performance Requirements*.
10. ISO 17034:2016, *General requirements for the competence of reference material producers*, International Organization for Standardization, Geneva.
11. ISO Guide 35:2017, *Reference materials – Guidance for characterization and assessment of homogeneity and stability*, International Organization for Standardization, Geneva.
12. Sutthanut K., Sripanidkulchai B., Yenjai C., Jay M. (2007), Simultaneous identification and quantitation of 11 flavonoid constituents in *Kaempferia parviflora* by gas chromatography, *Journal of Chromatography A*, 1143, 227-233.