

Xây dựng phương pháp định lượng các vitamin tan trong nước trong thuốc và thực phẩm bổ sung bằng điện di mao quản

Phạm Thị Thanh Hà¹, Phan Mai Phương¹,
Nguyễn Thị Thanh Nhài²

¹Trường đại học Dược Hà Nội;

²Trường cao đẳng Dược Trung ương Hải Dương

Đặt vấn đề

Trên thị trường hiện nay, các chế phẩm thuốc và thực phẩm bổ sung chứa đa thành phần vitamin rất phổ biến. Sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) là kỹ thuật phân tích phổ biến nhất để định lượng các chế phẩm này, vì có thể tách và định lượng đồng thời nhiều thành phần^[1,2]. Điện di mao quản (capillary electrophoresis, CE) cũng có khả năng tách và định lượng đồng thời các chất, nhưng so với HPLC, lại tiết kiệm được chi phí và thời gian phân tích hơn. Kỹ thuật này đã được sử dụng khá phổ biến ở nước ngoài, nhưng cho tới nay, chỉ có 1 bài báo trong nước nghiên cứu định lượng vitamin bằng CE, và mới định lượng trong dạng bào chế đơn giản nhất là thuốc tiêm^[3]. Mục tiêu của nghiên cứu này là xây dựng phương pháp định lượng đồng thời một số (ít nhất 5) vitamin tan trong nước hay gặp bằng CE, và ứng dụng cho một số loại chế phẩm thuốc và thực phẩm bổ sung thường gặp.

Nguyên vật liệu, thiết bị và phương pháp nghiên cứu

Hóa chất - thuốc thử

Natri tetraborat, natri dodecyl sulfat (SDS), natri dihydrophosphat, natri hydrophosphat, natri hydrocarbonat, β -cyclodextrin, hydroxyl propyl- β -cyclodextrin, nước cất siêu tinh khiết.

Các chất chuẩn đối chiếu: Thiamin hydroclorid (vitamin B₁), riboflavin (vitamin B₂), pyridoxin hydroclorid (vitamin B₆), acid folic (vitamin B₉), nicotinamid (vitamin PP) và acid ascorbic (vitamin C): Viện Kiểm nghiệm thuốc trung ương). Mẫu thử: Một số chế phẩm ngoài thị trường như thuốc tiêm becozym, siro BcomplexC, siro kid plus, viên nén medtrivit-B, viên bao obimin, viên nang cứng bcomplexC.

Thiết bị nghiên cứu

- Thiết bị điện di mao quản Agilent CE system 9001 (Hewlett Packard, USA) gắn detector DAD, được điều khiển bằng phần mềm Chemstation.

- Bộ lọc nước siêu tinh khiết Elga (Đức)
- Máy đo pH Metrohm (Đức)
- Máy lắc xoay Labinco (Hà Lan)
- Máy lắc siêu âm
- Bình đun cách thủy

Phương pháp nghiên cứu

Khảo sát 2 kiểu điện di: điện di mao quản vùng (CZE) và sắc ký điện động mixen (MEKC). Một số thông số CE sẽ được khảo sát (hệ đệm, pH, nhiệt độ, điện thế, bước sóng phát hiện...) và phương pháp cuối cùng sẽ được thẩm định trước khi đưa vào ứng dụng.

Kết quả và bàn luận

Cách pha dung dịch chuẩn

Vitamin B₂ được cân và hòa tan bằng nước nóng trong bình cách thủy ở 80°C trong 20 phút, vitamin B₉ được hòa tan trong dung dịch natri hydrocarbonat 10 mM. Sau đó, cân toàn bộ các vitamin còn lại và thêm các dung dịch chuẩn B₂ và B₉ ở trên, pha loãng bằng nước cất sao cho có nồng độ vitamin B₁, B₂, B₆, B₉, PP và C trong dung dịch chuẩn hỗn hợp lần lượt tương ứng là 0,15; 0,25; 0,10; 0,20 và 0,30 mg/ml.

Khảo sát điều kiện điện di

Cột mao quản: chiều dài tổng L_t 40 cm, đường kính trong 50 μ m.

Điện thế: thay đổi điện thế trong khoảng 8 – 25 kV, tùy theo từng hệ đệm dùng, để không chế dòng điện I $\leq$ 100 μ A.

Tiêm mẫu: thủy động lực, 50 mbar $\times$ 3 giây

Bước sóng phát hiện: lựa chọn theo $\lambda_{\max}$ của từng chất, phát hiện đồng thời ở 5 bước sóng: 200 nm, 230 nm, 270 nm, 290 nm và 370 nm.

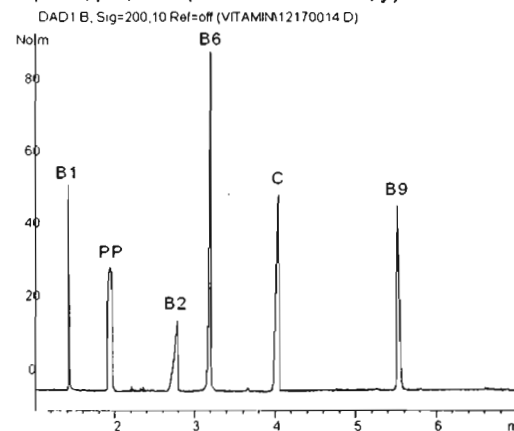
Hệ đệm: Các hệ đệm được khảo sát là 3 hệ đệm CZE (phosphat 25 mM pH 3,00; phosphat 25 mM pH 7,00 và borat 25 mM pH 9,00); và một hệ đệm MEKC (borat 25 mM, SDS 30 mM)³.

Tại pH acid và trung tính, các chất tách không tốt và một số chất không phát hiện được. Hệ đệm với SDS cho dòng điện không ổn định và khả năng tách cũng không cải thiện nhiều, do đó, đệm pH 9,00 được lựa chọn.

Nhiệt độ: Khảo sát 15, 20, 25 và 30°C. Nhiệt độ 25 và 30°C cho thời gian phân tích dài và đường nền rất nhiễu, còn 15 và 20°C cho kết quả tách tốt trong thời gian ngắn. Để thuận tiện trong mọi điều kiện thời tiết, nhiệt độ 20°C được lựa chọn.

Chất phụ gia: Một số chất phụ gia được khảo sát: cyclodextrin (α -, β - và hydroxypropyl- β -CD), chất diện hoạt (SDS ở 3 nồng độ 20, 25 và 30 mM), và các dung môi hữu cơ (methanol, acetonitril). Tuy nhiên, kết quả không được cải thiện nhiều. Bên cạnh đó, sau khi điều chỉnh điện thế phù hợp, kết quả tách đã khá tốt, nên không tiến hành khảo sát thêm.

Quy trình rửa mao quản: Sau khi khảo sát 5 quy trình khác nhau, quy trình rửa với 0,5 phút NaOH 0,1 M; 1 phút nước; 2 phút đệm nền cho kết quả lặp lại tốt (sau 15 mẫu chạy).



Hình 1: Điện di đồ hỗn hợp chuẩn 6 vitamin tại điều kiện đã lựa chọn

Kết luận: Điều kiện phân tích được lựa chọn là:

Kích thước mao quản: đường kính 50 μ m, Lt=40 cm (Le=31,5 cm). Nhiệt độ mao quản: 20°C. Hệ đệm: Borat 25 mM, pH 9,00. Điện thế: 20 kV (cho I $\approx$ 60 μ A). Tiêm mẫu: 50 mbar $\times$ 3 giây. Bước sóng phát hiện: 200 nm, 230 nm, 270 nm,

290 nm và 370 nm. Điều kiện rửa: 0,5 phút NaOH 0,1 M; 1 phút nước; 2 phút đệm nền.

Với điều kiện điện di ở trên, các vitamin được chia tách và phát hiện khá tốt, thể hiện trên điện di đồ ở hình 1.

Thẩm định phương pháp

Tính chọn lọc: Tiêm từng dung dịch chuẩn đơn thành phần và dung dịch chuẩn hỗn hợp, ghi lại phổ hấp thụ của tất cả các pic và chồng phổ các pic tương ứng. Kết quả hệ số phù hợp nằm trong khoảng 0,996-0,999, chứng tỏ pic tinh khiết. Về khả năng tách: Trong hình 2, B₂ và B₆ là hai pic gần nhau nhất, vẫn có R_s=11, chứng tỏ phương pháp có hiệu lực tách rất tốt, độ chọn lọc cao. Ngoài ra, trong quá trình tiến hành định lượng, chúng tôi còn xác định được vitamin B₅ và vitamin B₁₂ cũng được tách tốt khỏi bằng phương pháp này, và hoàn toàn có thể định lượng được, nhưng do không có các chất chuẩn, nên phần định lượng 2 vitamin B₅ và B₁₂ sẽ không được đưa vào phần thẩm định phương pháp ở nghiên cứu này.

Bảng 1: Kết quả khảo sát độ lặp lại

Mẫu	S_{hc} của các pic ($S_{hc}=S/t_m$)					
	B ₁	B ₂	B ₆	B ₉	PP	C
1	25,3	23,6	47,3	28,6	63,8	43,3
2	25,0	24,2	47,2	29,1	63,9	43,7
3	25,1	24,4	50,0	29,2	65,3	41,8
4	25,6	23,0	50,3	29,2	62,9	41,0
5	25,6	23,7	49,2	30,0	63,6	42,0
6	25,5	23,2	49,8	29,4	64,7	42,6
7	24,9	23,5	49,9	29,8	66,3	43,2
8	25,5	23,3	50,0	29,2	63,4	41,5
9	26,9	24,4	50,2	31,0	68,9	43,8
10	25,8	22,1	47,4	27,5	64,3	41,6
RSD %	2,18	2,91	2,65	3,09	2,74	2,37

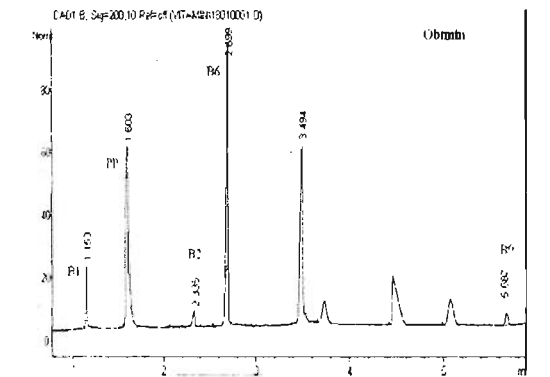
Độ lặp lại: Phân tích 10 mẫu chuẩn hỗn hợp, tính RSD% của diện tích pic hiệu chỉnh S_{hc} ($S_{hc}=S/t_m$) của từng chất. Ba chất (acid sorbic, acid salicylic và acid benzoic) được khảo sát làm chuẩn nội. Kết quả cho thấy RSD% giảm không đáng kể khi dùng chuẩn nội, mà có trường hợp còn tăng (acid salicylic). Khi không có chuẩn nội, RSD% cũng đã khá tốt (2,18 - 3,09%) (bảng 1). Do đó, chúng tôi quyết định không tiếp tục khảo sát tìm chuẩn nội.

Độ đúng: Được tiến hành trên chế phẩm Obimin bằng phương pháp thêm, phần trăm tìm

lại được tính bằng nồng độ thu hồi so với nồng độ thêm vào. Điện di đồ từ chế phẩm obimin được trình bày ở hình 3. Kết quả trong bảng 2 chứng tỏ phương pháp có độ đúng đảm bảo (96 - 101%).

Bảng 2: Kết quả khảo sát độ đúng

Vitamin	C thêm (µg/ml)	C thu hồi (µg/ml)	% tìm lại
B1	80,0	77,6	96,1
B2	55,0	54,9	99,4
B6	55,0	55,6	101,0
B9	52,0	49,9	96,0
PP	50,0	48,5	96,6
C	158,0	158,8	100,7



Hình 2: Điện di đồ chế phẩm obimin

Độ nhạy: Xác định giới hạn phát hiện (LOD) và giới hạn định lượng (LOQ). Giới hạn định lượng với 4 chất trong hỗn hợp là đạt yêu cầu, chỉ với B₂ và PP là còn hơi cao (50 và 40 µg/ml) (bảng 3).

Bảng 3: LOD và LOQ của các vitamin

Vitamin	B ₁	B ₂	B ₆	B ₉	C	PP
LOD	1,5	17,5	1,5	3,5	4,0	10
LOQ	4,5	50	4,5	10	12,3	40

Hàm lượng thể hiện theo µg/ml.

Khoảng nồng độ tuyến tính: Khảo sát trên chuẩn hỗn hợp các vitamin ở 5 nồng độ khác nhau (bảng 4).

Bảng 4: Khoảng nồng độ tuyến tính và hệ số tương quan hồi quy trong định lượng các vitamin

Vitamin	C (µg/ml)	R
B ₁	60 - 600	0,998
B ₂	50 - 500	0,999
B ₆	42 - 420	0,998
B ₉	10 - 100	0,998
PP	30 - 300	0,995
C	86 - 860	0,990

Kết quả cho thấy có sự tương quan tuyến tính giữa S_{hc} và nồng độ của các vitamin trong khoảng khảo sát.

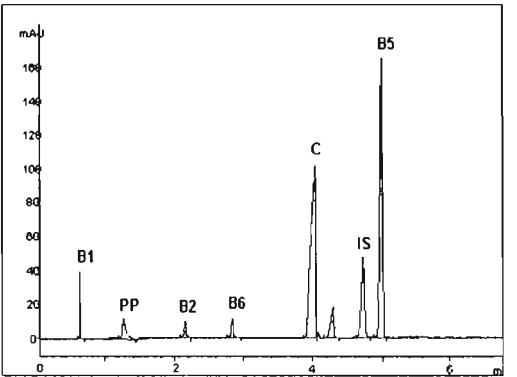
Độ ổn định: Dung dịch chuẩn được tiến hành điện di tại các thời điểm: 0; 30; 60; 90; 120; 150; 180; 240; 300; 360; 420 và 480 phút sau khi pha. **Kết quả:** Nồng độ vitamin C sau 5 giờ đã giảm đi đáng kể (~10%), vitamin B₉ giảm <5% sau 8 giờ, các vitamin còn lại đều bền vững sau 8 giờ. Để cải thiện độ ổn định của vitamin C, Na₂S₂O₃ và Na₂S₂O₅ được thử làm chất ổn định. Na₂S₂O₃ có tác dụng tốt hơn, giúp vitamin C ổn định trong vòng 8 giờ.

Định lượng trong chế phẩm

Thuốc tiêm: Pha loãng dung dịch thuốc tiêm đến nồng độ phù hợp rồi đem định lượng ngay. Định lượng chế phẩm becozym song song bằng phương pháp CZE này và phương pháp MEKC^[3], kết quả tương đương nhau (bảng 5), nhưng phương pháp CZE ổn định, đơn giản và nhanh hơn (thời gian phân tích bằng 1/5) so với phương pháp cũ.

Siro: Với siro đơn giản như BcomplexC: Pha loãng mẫu bằng nước nóng 80°C (hoặc 80 ml NaHCO₃ 10 mM, nếu có B₉), đặt trong cách thủy ở 80°C trong 15 phút, siêu âm 5 phút, để nguội, thêm nước cất đến vạch, lắc đều, lọc qua màng 0,2 µm, siêu âm 2 phút.

Với các siro phức tạp như Kid Plus, sau bước chiết bằng nước nóng như trên, lắc dung dịch với 2 ml n-hexan trong 10 phút, lấy lớp nước, lọc qua giấy rồi qua màng 0,2 µm, siêu âm.



Hình 3: Điện di đồ mẫu chế phẩm BcomplexC

Hình 3 thể hiện điện di đồ của chế phẩm siro BcomplexC. Với chế phẩm này, xác định được pic vitamin B₅, nhưng do không có chất chuẩn đối chiếu, nên chỉ được định tính. Kết quả định lượng trình bày trong bảng 5.

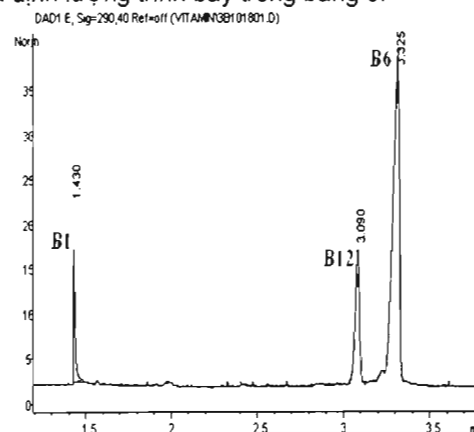
Bảng 5: Kết quả định lượng trong chế phẩm

Hàm lượng	B ₁	B ₂	B ₆	B ₉	PP	C
Thuốc tiêm Becozym						
Nhân	5,0	2,0	2,0	–	10,0	–
Thực	101,0	97,2	98,9	–	96,2	–
Siro BcomplexC						
Nhân	1,0	0,6	0,4	–	0,8	20,0
Thực	97,5	91,5	94,7	–	92,0	99,2
Viên nén MedtrivitB						
Nhân	10,0	–	15,0	–	–	–
Thực	102,1	–	97,8	–	–	–
Viên bao Obimin						
Nhân	10,0	2,5	15,0	1,0	20,0	100,0
Thực	98,0	95,0	96,7	93,0	92,0	96,9
Viên nang BcomplexC						
Nhân	15,0	10,0	5,0	–	50,0	100,0
Thực	96,0	93,2	98,4	–	93,0	97,9
Cốm Bio-acimin						
Nhân	0,5	0,5	0,5	–	–	–
Thực	91,0	90,6	105,7	–	–	–

* Hàm lượng: HL trên nhân có đơn vị tùy theo chế phẩm, hàm lượng thực tính theo % so với hàm lượng trên nhân.

– Không có trong chế phẩm

Viên nang cứng, viên nén, cốm: Cân một lượng bột viên/bột cốm phù hợp, chiết 3 lần bằng nước nóng 80°C, gộp dịch chiết và bột viên vào bình định mức, siêu âm 5 phút, để nguội, thêm nước đến vạch, lắc đều, lọc qua giấy lọc, rồi qua màng 0,2 µm. Với chế phẩm medtrivit-B, pic vitamin B₁₂, tương tự như B₅, chỉ có thể được định tính do không có chất chuẩn đối chiếu. Các kết quả định lượng trình bày trong bảng 5.



Hình 4: Điện di đồ chế phẩm MedtrivitB

Kết luận

Kết quả nghiên cứu đã thu được là:

- Xây dựng được phương pháp định lượng đồng thời 6 vitamin tan trong nước: B₁, B₂, B₆, B₉, C, PP bằng điện di mao quản.

- Thẩm định được phương pháp vừa xây dựng.

- Thiết lập được 3 quy trình định lượng 6 vitamin này trong 5 loại chế phẩm: thuốc tiêm, siro, viên nén, viên nang, cốm dinh dưỡng.

- Định lượng khảo sát một số chế phẩm theo các quy trình đã thiết lập.

Phương pháp đã xây dựng có thời gian phân tích ngắn, tiết kiệm chi phí, phương pháp xử lý mẫu đơn giản, đặc biệt nếu so với sắc ký lỏng, sẽ không gặp phải vấn đề về tắc cột do mẫu phân tích chưa được xử lý kỹ. Phương pháp có thể được ứng dụng để định lượng 6 vitamin này trong các chế phẩm thuốc và thực phẩm bổ sung khác tại các cơ sở kiểm nghiệm và sản xuất có thiết bị điện di mao quản.

Summary

A rapid, simple, repeatable and accurate analytical method using zone capillary electrophoresis with UV detection has been developed and validated for the simultaneous determination of six water-soluble vitamins (B₁, B₂, B₆, B₉, PP and C). The following conditions were used: column 40 cm L_t, 50 µm ID at 20°C, 25 mM borate buffer pH 9,00, 20 kV applied voltage. The validation data showed good repeatability, high accuracy, wide linearity range and very good selectivity of the method. With sodium thiosulfate was used as stabiliser for vitamin C, the sample is stable within a working day. Three analytical procedures were developed for the determination of the 6 vitamins in 5 different multi-vitamin preparations, and the analytical results indicated high feasibility of this method in quality control practice.

Tài liệu tham khảo

1. Thái Phan Quỳnh Như, Đào Hùng Phi, Nghiên cứu định lượng đồng thời các thuốc đa vitamin bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao, *Tạp chí Dược học* 5 (1993) 23-26.
2. Thái Phan Quỳnh Như, Đào Hùng Phi, Phạm Hồng Anh, Định lượng đồng thời các vitamin B₁, B₂, B₆, C, PP trong viên BC complex bằng phương pháp HPLC, *Thông báo Kiểm nghiệm* 3 (1993) 1-6.
3. Nguyễn Văn Tuyền, Trần Tích, Trần Tử An, Tống Thị Thanh Vương, Định lượng các vitamin B₁, B₂, B₆, PP trong chế phẩm thuốc tiêm Becozym bằng phương pháp điện di mao quản, *Tạp chí Dược học* 5-337 (2004) 20-22.