

Xây dựng quy trình định lượng đồng thời Vinpocetin và Piracetam trong thực phẩm bảo vệ sức khỏe hỗ trợ chức năng tuần hoàn não bằng phương pháp HPLC

Development of a method for simultaneous qualification of Vinpocetine and Piracetam in health supplement products that support cerebral circulation by HPLC

Hoàng Thị Lan Hương*, Nguyễn Thị Diễm Hồng
Hoang Thi Lan Huong*, Nguyen Thi Diem Hong

*Trung tâm Kiểm nghiệm thuốc, mỹ phẩm, thực phẩm Thừa Thiên Huế
Drug, cosmetic and food quality control center of Thua Thien Hue province.*

(Ngày nhận bài: 31/5/2022, ngày phản biện xong: 8/6/2022, ngày chấp nhận đăng: 3/7/2022)

Tóm tắt

Xây dựng quy trình phân tích đồng thời Vinpocetin và Piracetam trong các mẫu thực phẩm bảo vệ sức khỏe (TPBVSK) hỗ trợ chức năng tuần hoàn não bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC). Điều kiện sắc ký: Cột C18 (250x4,6mm,5µm), pha động là hỗn hợp acetonitril - kali dihydrophosphat 0,02M có chứa 0,2% triethylamin (pH 6,0)–(80:20), tốc độ dòng 1ml/phút, bước sóng phát hiện 225nm, thể tích tiêm 20µl. Phương pháp được thẩm định các chỉ tiêu độ đặc hiệu, tính phù hợp hệ thống, khoảng tuyến tính, độ chính xác, độ đúng, giới hạn phát hiện, giới hạn định lượng theo hướng dẫn của ICH. Quy trình sau khi thẩm định được ứng dụng để định lượng một số mẫu TPBVSK trên thị trường.

Từ khóa: Vinpocetin; Piracetam; Thực phẩm bảo vệ sức khỏe; Sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC).

Abstract

Development of a method for simultaneous analysis of Vinpocetine and Piracetam in health supplement products that support cerebral circulatory function by high performance liquid chromatography (HPLC). Chromatography conditions: Column C18 (250x4.6mm,5µm), using an acetonitrile - 0.02M potassium dihydrophosphate mixture containing 0.2% triethylamine (pH 6.0) (80:20) as mobile phase, flow rate 1ml/min, detection wavelength 225nm, injection volume 20µl. The method was validated for specificity, system suitability, linear interval, accuracy, precision, limit of detection, limit of quantification according to the guidelines of ICH. The process after validation is applied to quantify some health supplement samples on the market.

Keywords: Vinpocetine; Piracetam; Health supplement; High performance liquid chromatography (HPLC).

1. Đặt vấn đề

Thực phẩm chức năng (TPCN) được chia làm các loại: thực phẩm bổ sung, thực phẩm bảo vệ sức khỏe (TPBVSK), thực phẩm dinh

dưỡng y học và thực phẩm dùng cho chế độ ăn đặc biệt. Nổi bật trong các sản phẩm TPBVSK hiện nay phải nhắc đến các sản phẩm cải thiện chức năng tuần hoàn não, giảm tình trạng sa sút

*Corresponding Author: Hoang Thi Lan Huong, Drug, cosmetic and food quality control center of Thua Thien Hue province, 17 Truong Dinh Street, Vinh Ninh Ward, Hue City, Viet Nam.

Email: lanhuong.kiemnghiem@gmail.com

trí tuệ, mất ngủ, đau đầu, hoa mắt, chóng mặt... Thông thường, các sản phẩm này thường chứa các hoạt chất: Vinpocetin, Piracetam, vitamin B6, cinarizin... và/hoặc thêm một số thành phần dược liệu. Tuy nhiên, chất lượng của những loại sản phẩm này thì không phải ai cũng biết rõ, nhất là trong tình hình mà hàng nghìn sản phẩm nội, ngoại nhập tràn lan trên thị trường như hiện nay.

Vì vậy, việc kiểm soát chất lượng các hoạt chất trong các đối tượng TPBVSK là rất cần thiết, góp phần nâng cao hiệu quả công tác kiểm nghiệm, phát triển kỹ thuật phân tích để áp dụng thuận lợi hơn tại các phòng thí nghiệm.

2. Thực nghiệm

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

2.1.1. Thiết bị

- Máy sắc ký lỏng hiệu năng cao Shimadzu Series 20A – Nhật Bản

- Cột phenomenex C18 (250 x 4,6mm; 5 μ m)

- Cân phân tích 4 chữ số Shimadzu (d = 0,01mg)

- Máy đo pH Mettler Toledo

- Các thiết bị phụ trợ khác như máy siêu âm, máy lắc tròn...

- Dụng cụ thủy tinh chính xác như bình định mức, pipet loại A

2.1.2. Hóa chất, chất chuẩn

- Hóa chất: loại tinh khiết dùng cho HPLC của Merck: acetonitril, methanol, kali dihydrophosphat, triethylamin, acid phosphoric, amoni acetat, nước cất...

- Chất chuẩn: Vinpocetin; số lô: WS.0215239.02; hàm lượng: 98,77% (nguyên trạng); Piracetam; số lô: 0217291.02; hàm lượng: 100,15% (nguyên trạng) của Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương.

2.2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu:

2.2.1. Đối tượng nghiên cứu:

- Dung dịch chuẩn: dung dịch chất chuẩn các loại

- Mẫu nền: Qua khảo sát các loại mẫu TPBVSK có tác dụng hỗ trợ tuần hoàn não, đã chọn được 1 mẫu có chứa nhiều thành phần hoạt chất (hóa dược và dược liệu) nhưng không chứa Vinpocetin và Piracetam làm nền mẫu nghiên cứu (NC01).

- Một số mẫu TPBVSK có chứa Vinpocetin và/hoặc Piracetam (T01-T10)

2.2.2. Phương pháp nghiên cứu:

- Khảo sát ảnh hưởng của các yếu tố đến phép xác định đồng thời 2 chất phân tích bằng HPLC theo phương pháp đơn biến, sử dụng cột C18 (250 x 4,6mm; 5 μ m), dùng acetonitril làm dung môi pha mẫu.

- Dung dịch chuẩn gốc:

+ Dung dịch chuẩn Vinpocetin: Cân chính xác khoảng 25mg chất chuẩn Vinpocetin vào bình định mức dung tích 100ml, thêm 70ml dung môi pha mẫu, lắc đến tan hoàn toàn, thêm dung môi pha mẫu tới vạch, trộn đều, được dung dịch chuẩn gốc Vinpocetin có nồng độ khoảng 0,25mg/ml.

+ Dung dịch chuẩn Piracetam: Cân chính xác khoảng 80mg chất chuẩn Piracetam vào bình định mức dung tích 100ml, thêm 70ml dung môi pha mẫu, lắc đến tan hoàn toàn, thêm dung môi pha mẫu tới vạch, trộn đều, được dung dịch chuẩn gốc Piracetam có nồng độ khoảng 0,8mg/ml.

- Dung dịch chuẩn hỗn hợp: Dung dịch chuẩn hỗn hợp có nồng độ Vinpocetin (5 μ g/ml) và Piracetam (400 μ g/ml) trong acetonitril.

- Mẫu trắng: Cân chính xác một lượng bột viên nang cứng NC01 cho vào bình định mức 50ml, thêm 35ml dung môi pha mẫu, lắc kỹ trong khoảng 30 phút, định mức bằng dung môi pha mẫu. Lọc qua màng lọc 0,45 μ m.

- Mẫu tự tạo: Cân chính xác một lượng bột viên nang cứng NC01 cho vào bình định mức 50ml; thêm 1,0ml dung dịch chuẩn Vinpocetin 0,25mg/ml và 25,0ml dung dịch chuẩn Piracetam 0,8mg/ml, lắc kỹ để hòa tan, định mức bằng dung môi pha mẫu. Lọc qua màng lọc 0,45 μ m.

Kiểm tra tính thích hợp của hệ thống: Tiến hành sắc ký với dung dịch chuẩn hỗn hợp, thứ tự rửa giải của 2 pic lần lượt là Piracetam và Vinpocetin, độ phân giải 2 pic lớn hơn 2,0; độ lệch chuẩn tương đối của các diện tích pic từ 6 lần tiêm lặp lại dung dịch chuẩn hỗn hợp không được lớn hơn 2,0%.

Tiêm 20 μ l dung dịch mẫu trắng, mẫu tự tạo, dung dịch chuẩn hỗn hợp và dung dịch thử vào

hệ thống sắc ký. Ghi lại sắc ký đồ và đáp ứng của pic chính trong dung dịch chuẩn hỗn hợp, mẫu tự tạo và dung dịch thử.

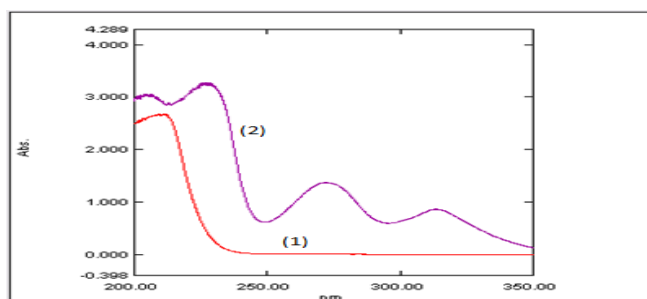
Thẩm định phương pháp theo ICH [2], gồm tính đặc hiệu, tính phù hợp hệ thống, giới hạn phát hiện và giới hạn định lượng, khoảng nồng độ tuyến tính, độ đúng và độ chính xác.

3. Kết quả và bàn luận

3.1. Khảo sát ảnh hưởng của các yếu tố

3.1.1. Xác định bước sóng phát hiện

Tiến hành đo độ hấp thụ quang (Abs) của các dung dịch chuẩn Vinpocetin và Piracetam trong dải bước sóng từ 200 – 350nm.



Hình 3.1. Phổ UV - Vis của Piracetam (1), Vinpocetin (2)

Từ Hình 3.1 cho thấy: trong khoảng bước sóng 200 – 230nm là khoảng hấp thụ quang chung của hai chất, có thể chọn bất kỳ bước sóng nào trong khoảng 200 – 230nm để phân tích đồng thời Piracetam và Vinpocetin. Do đó, bước sóng 225nm nằm trong khoảng này được chọn cho các nghiên cứu tiếp theo.

3.1.2. Ảnh hưởng của thành phần pha động

Dựa vào khối lượng phân tử, cấu trúc hóa học, tính chất hòa tan, tính phân cực của Vinpocetin và Piracetam, kết hợp tham khảo các tài liệu liên quan [1],[3],[4],[5] để tiến hành khảo sát 5 hệ thành phần pha động cho quy trình phân tích với điều kiện thí nghiệm: dung dịch hỗn hợp với nồng độ Piracetam khoảng 400 μ g/ml, nồng độ Vinpocetin khoảng 5 μ g/ml;

hệ thống HPLC sử dụng cột pha đảo C18 (250 x 4,6mm; 5 μ m); detector DAD ở bước sóng 225nm, tốc độ dòng pha động 1,0ml/phút; thể tích tiêm mẫu 20 μ l.

- Hệ (a): Amoni acetat 1,54% - acetonitril (40:60)

- Hệ (b): Methanol – nước (10:90)

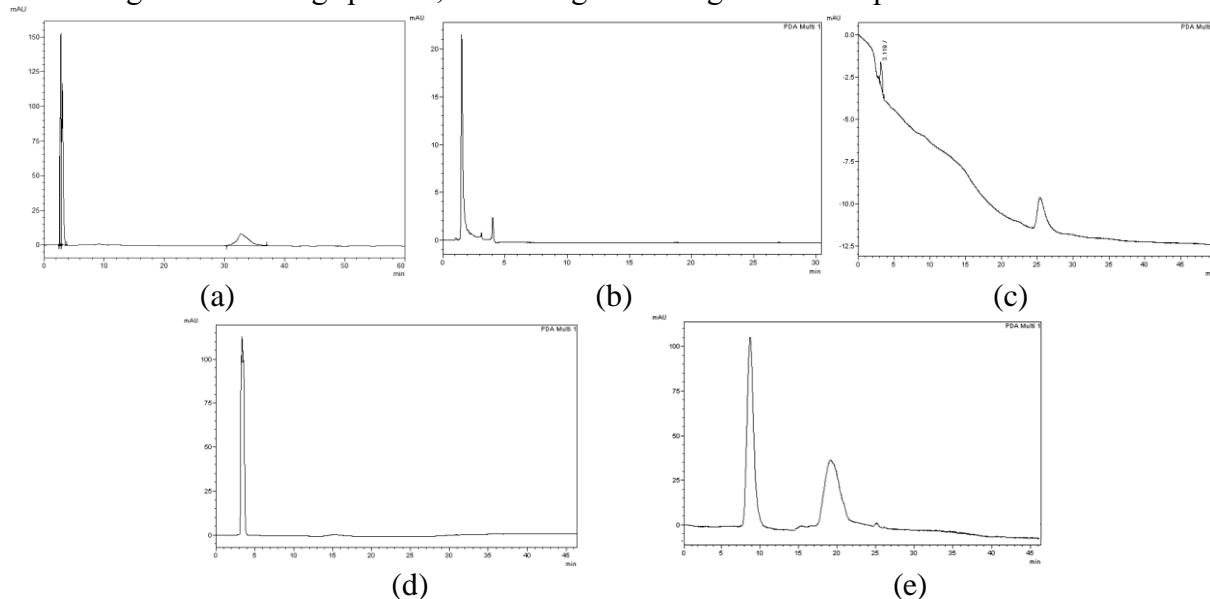
- Hệ (c): Kali dihydrophosphat 0,05M (pH 3,5)– methanol (50:50)

- Hệ (d): Triethylamin 0,2g/l (pH 6,5) – acetonitril (85:15)

- Hệ (e): Kali dihydrophosphat 0,02M có chứa 0,2% triethylamin (pH 3,5) – acetonitril (20:80)

Kết quả khảo sát thành phần pha động ở Hình 3.2 cho thấy: Hệ dung môi (e) cho đủ 2 pic và thời gian lưu không quá dài, hình dáng

pic chưa cân đối nhưng có khả năng cải thiện được. Do đó, hệ dung môi (e) được chọn cho các nghiên cứu tiếp theo.



Hình 3.2. Sắc đồ khảo sát các hệ pha động

3.1.3. Ảnh hưởng của pH

Tiến hành khảo sát ảnh hưởng của pH pha động đối với pha động (e) đã chọn, pha động được điều chỉnh pH đến 3,5; 4,5; 6,0 bằng acid phosphoric.

Qua kết quả khảo sát, ở pH pha động 3,5, pic Vinpocetin có hình dáng chưa cân đối, thời gian lưu còn dài, ảnh hưởng đến thời gian phân

tích khi tiến hành trên mẫu thực tế. Ở pH 4,5, hai pic của Piracetam và Vinpocetin khá cân đối, tuy nhiên thời gian phân tích vẫn còn khá dài, đường nền chưa ổn định. pH pha động 6,0 cho hai pic cân đối, thời gian lưu không quá dài, phù hợp để phân tích trên mẫu thực tế. Do đó, pH 6,0 được chọn cho các nghiên cứu tiếp theo. Từ đó thu được điều kiện thí nghiệm như sau:

Bảng 3.1. Điều kiện sắc ký đã xây dựng

Cột	C18 (250 x 4,6mm; 5µm), phân tích ở nhiệt độ phòng thí nghiệm
Pha động	Hỗn hợp kali dihydrophosphat 0,02M có chứa 0,2% triethylamin (pH 6,0) – acetonitril (20:80)
Detector	DAD 225nm
Tốc độ dòng	1,0ml/phút
Thể tích tiêm	20µl

3.2. Xây dựng quy trình phân tích và xác nhận giá trị sử dụng của phương pháp

3.2.1. Xây dựng quy trình xử lý mẫu

Kết quả khảo sát trên một số dung môi hòa tan mẫu như nước acid, nước, ethanol, methanol, acetonitril, methanol – nước, acetonitril –

nước,... cho thấy: dung môi acetonitril thích hợp để hòa tan Vinpocetin và Piracetam trong mẫu rắn. Tuy nhiên, đối với các mẫu dạng viên nang mềm, việc sử dụng dung môi acetonitril không thể phân tán đều chế phẩm, kéo theo việc hoạt chất không được hòa tan hết. Vì vậy, phải sử dụng dung môi n-hexan để hòa tan chế phẩm,

loại dầu mỡ, sau đó dùng acetonitril để tách lấy Vinpocetin và Piracetam.

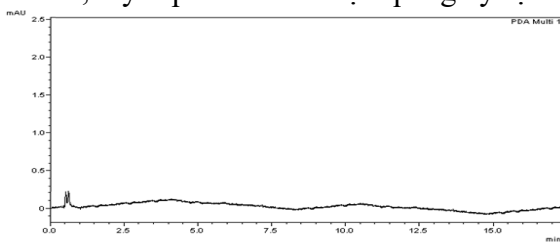
Quy trình xử lý mẫu được tiến hành như sau: Cân chính xác một lượng chế phẩm tương ứng với khoảng 40mg Piracetam (hoặc 0,5mg Vinpocetin) vào bình nón dung tích 250ml, thêm 50ml n-hexan, siêu âm khoảng 15 phút, thêm vào 50ml acetonitril, lắc kỹ trong khoảng 30 phút. Chuyển hỗn hợp vào bình gạn, loại bỏ lớp n-hexan, lấy lớp acetonitril lọc qua giấy lọc

vào bình định mức 100ml, định mức bằng acetonitril. Lọc qua màng lọc 0,45µm để tiêm sắc ký.

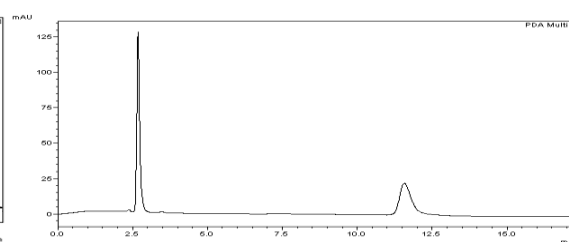
3.2.2. Xác nhận giá trị sử dụng của phương pháp xác định đồng thời Piracetam và Vinpocetin

✓ Tính đặc hiệu

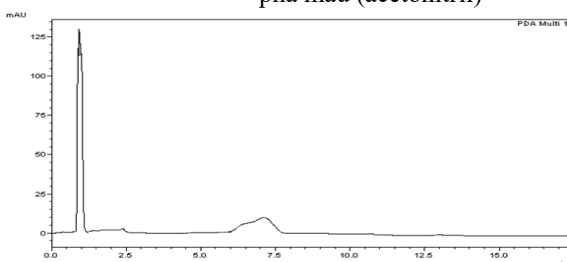
Tiến hành tiêm vào hệ thống sắc ký lần lượt các dung dịch sau: dung môi pha mẫu, dung dịch mẫu trắng, mẫu tự tạo, chuẩn hỗn hợp



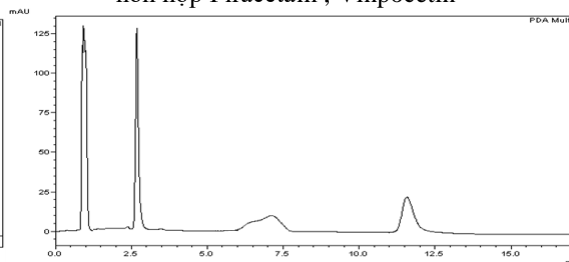
Hình 3.3. Sắc đồ của dung môi pha mẫu (acetonitril)



Hình 3.4. Sắc đồ của mẫu chuẩn hỗn hợp Piracetam, Vinpocetin



Hình 3.5. Sắc đồ của mẫu trắng



Hình 3.6. Sắc đồ của mẫu tự tạo

Kết quả thu được cho thấy: trên sắc ký đồ của dung môi pha mẫu (hình 3.3) và sắc ký đồ của mẫu trắng (mẫu không chứa hoạt chất – hình 3.5) không xuất hiện pic Piracetam và Vinpocetin; trên sắc ký đồ mẫu chuẩn hỗn hợp và mẫu tự tạo xuất hiện rõ ràng hai pic của Piracetam khoảng 2,5 phút và Vinpocetin khoảng 11,5 phút, không bị chồng pic với các thành phần khác có trong mẫu. Như vậy,

phương pháp nghiên cứu có tính đặc hiệu đối với cả hai chất Piracetam và Vinpocetin.

✓ Tính phù hợp hệ thống

Tính phù hợp hệ thống được đánh giá thông qua độ lệch chuẩn tương đối (RSD) của thời gian lưu (tR), diện tích pic (A), hệ số đuôi (Tf), số đĩa lý thuyết (N) và độ phân giải (R) thu được trong sắc ký đồ của dung dịch chuẩn hỗn hợp.

Bảng 3.2. Kết quả khảo sát tính phù hợp hệ thống

TN	Piracetam				Vinpocetin				
	tR	A	Tf	N	tR	A	Tf	N	R
1	2,577	894878	1,719	2781	12,795	611221	1,407	3465	19,19
2	2,582	895545	1,707	2745	12,576	623007	1,428	3468	19,01
3	2,590	897006	1,713	2751	12,380	621853	1,414	3548	19,03
4	2,589	895988	1,714	2776	12,236	627042	1,420	3567	18,99
5	2,583	892284	1,708	2828	12,370	617680	1,390	3563	19,13

6	2,586	894500	1,719	2851	12,527	611454	1,403	3590	19,30
TB	2,585	895034	1,713	2789	12,481	616352	1,408	3541	19,13
RSD	0,19	0,18	0,30	1,52	1,57	1,04	0,95	1,52	0,64

✓ Giới hạn phát hiện và giới hạn định lượng là tín hiệu hay nồng độ thấp nhất trên một

Giới hạn phát hiện (LOD) được xác định dựa vào quy tắc “3σ” theo phương pháp bình phương tối thiểu và giới hạn định lượng (LOQ)

đường chuẩn tin cậy và thường được chấp nhận: $LOQ \approx 3,3LOD$.

Bảng 3.3. Kết quả xác định giới hạn phát hiện và giới hạn định lượng

Tên	Nồng độ (µg/ml)	Diện tích (mAU.s)	Phương trình hồi quy tuyến tính, hệ số tương quan r	LOD	LOQ
Piracetam	8,01	6627	$Y = 1063,1x - 1333,4$ $r = 0,9993$	1,63	5,43
	16,02	16515			
	24,04	24115			
	32,05	32739			
	40,06	41104			
Vinpocetin	0,10	4982	$Y = 55077,9x - 526,6$ $r = 0,9999$	0,01	0,03
	0,20	12227			
	0,30	15996			
	0,40	21150			
	0,50	26866			

✓ Khoảng tuyến tính

Chuẩn bị một dãy dung dịch chuẩn hỗn hợp có nồng độ Piracetam từ 8,01 – 961,44µg/ml, Vinpocetin từ 0,10 – 11,90µg/ml.

Từ các kết quả thu được, tính toán và xử lý số liệu bằng phương pháp hồi quy tuyến tính (bình phương tối thiểu) để xác định khoảng tuyến tính của phương pháp.

Bảng 3.4. Kết quả xác định khoảng tuyến tính

STT	Piracetam		Vinpocetin	
	Nồng độ (µg/ml)	Diện tích (mAU.s)	Nồng độ (µg/ml)	Diện tích (mAU.s)
1	8,01	6627	0,10	4982
2	16,02	16515	0,20	10300
3	24,04	24115	0,30	15996
4	32,05	32739	0,40	23192
5	40,06	41104	0,50	26866
6	80,12	92718	0,99	59332
7	160,24	181948	1,98	122184
8	320,48	360129	3,97	250878
9	480,72	539945	5,95	382562
10	640,96	719575	7,93	512583
11	801,20	894878	9,92	623007

12	961,44	1089118	11,90	769613
	Y = 1128,1x - 1902,1 r ≈ 1		Y = 64418x - 3431,5 r = 0,9999	

Kết quả thu được cho thấy: trong một khoảng nồng độ khảo sát rất rộng có sự phụ thuộc tuyến tính rất chặt chẽ giữa diện tích pic Piracetam/Vinpocetin với nồng độ của Piracetam/Vinpocetin với hệ số tương quan gần bằng 1.

✓ Độ chính xác

- *Độ lặp lại*: Độ lặp lại của phương pháp được đánh giá qua RSD khi định lượng đồng thời hỗn hợp các chất trong mẫu thực phẩm bảo vệ sức khỏe T01 có số lô: 010619; ngày sản xuất: 040619; hạn dùng: 040622; hàm lượng nhãn: Vinpocetin 5mg/viên, Piracetam 400mg/viên. Tiến hành 6 thí nghiệm lặp lại và mỗi thí nghiệm tiêm mẫu lặp lại 3 lần để lấy diện tích pic trung bình.

Dung dịch chuẩn: Sử dụng dãy dung dịch chuẩn trong phần khảo sát khoảng tuyến tính, phương trình hồi quy tuyến tính.

Dung dịch thử: Cân chính xác một lượng chế phẩm tương ứng với khoảng 40mg Piracetam (hoặc 0,5mg Vinpocetin) vào bình nón dung tích 250ml, thêm 50ml n-hexan, siêu âm khoảng 15 phút, thêm vào 50ml acetonitril, lắc kỹ trong khoảng 30 phút. Chuyển hỗn hợp vào bình gạn, loại bỏ lớp n-hexan, lấy lớp acetonitril lọc qua giấy lọc vào bình định mức 100ml, định mức bằng acetonitril. Lọc qua màng lọc 0,45µm.

Kết quả thu được ở Bảng 3.5 cho thấy phương pháp có độ lặp lại khá tốt với các giá trị RSD đối với Piracetam là 1,10% và đối với Vinpocetin là 1,34%.

Bảng 3.5. Kết quả khảo sát độ lặp lại

STT	Piracetam			Vinpocetin	
	Lượng mẫu (g)	Diện tích (mAU.s)	Hàm lượng (mg/g)	Diện tích (mAU.s)	Hàm lượng (mg/g)
1	0,0893	486949	485,26	281657	4,96
2	0,0915	488171	474,78	282201	4,85
3	0,0918	488377	473,43	280150	4,80
4	0,0905	490185	482,00	283438	4,92
5	0,0908	490534	480,75	284512	4,92
6	0,0900	491764	486,23	284112	4,96
TB		480,41		4,90	
RSD (%)		1,10		1,34	

✓ Độ chính xác trung gian

Xác định độ chính xác trung gian bằng cách xác định hàm lượng các hoạt chất trong 6 mẫu thử T01 bởi kiểm nghiệm viên khác, vào thời

điểm khác. Kết quả được trình bày trong Bảng 3.6 cho thấy phương pháp có độ chính xác cao theo hướng dẫn của ICH.

Bảng 3.6. Kết quả khảo sát độ chính xác trung gian

STT	Piracetam	Vinpocetin
-----	-----------	------------

	Lượng mẫu (g)	Diện tích (mAU.s)	Hàm lượng (mg/g)	Diện tích (mAU.s)	Hàm lượng (mg/g)
Đường chuẩn	$y = 1125,6x - 736,4$ (r = 0,9999)			$y = 68851x - 9665,6$ (r = 0,9998)	
1	0,0901	490016	483,92	288128	4,80
2	0,0899	489961	484,95	289450	4,83
3	0,0905	489967	481,74	290547	4,82
4	0,0911	490210	478,80	288156	4,75
5	0,0900	490011	484,46	296387	4,94
6	0,0896	482464	479,14	289631	4,85
TB	482,17			4,83	
RSD (%)	0,56			1,31	
2KNV(n=12)	TB = 481,29 mg/g; RSD = 0,86%			TB = 4,87 mg/g; RSD = 1,46%	

✓ Độ đúng

Độ đúng của phương pháp được đánh giá thông qua độ thu hồi khi phân tích mẫu thêm chuẩn vào mẫu thực phẩm bảo vệ sức khỏe T01 được thêm chuẩn ở 3 mức nồng độ 80%, 100%, 120% của hàm lượng Vinpocetin, Piracetam trong viên.

Ở mỗi mức nồng độ, phân tích 3 lần riêng biệt và đối với mỗi lần thí nghiệm tiêm mẫu lặp lại 3 lần để thu được diện tích pic trung bình.

Độ thu hồi (Rev) được tính theo công thức:

$$Re\ v(\%) = \frac{(C_2 - C_1) \times 100}{C_0}$$

Trong đó:

C₀: nồng độ của chất chuẩn thêm vào mẫu (µg/ml);

C₂: nồng độ chất phân tích xác định được trong mẫu đã thêm chuẩn (µg/ml);

C₁: nồng độ chất phân tích xác định được trong mẫu khi chưa thêm chuẩn (µg/ml).

- *Dung dịch chuẩn Vinpocetin*: Cân chính xác 24,5mg chất chuẩn Vinpocetin vào bình định mức dung tích 50ml, thêm 35ml dung môi pha mẫu, lắc đến tan hoàn toàn, thêm dung môi pha mẫu tới vạch, trộn đều.

- *Dung dịch chuẩn Piracetam*: Cân chính xác 91,0mg chất chuẩn Piracetam vào bình định mức dung tích 100ml, thêm 70ml dung môi pha mẫu, lắc đến tan hoàn toàn, thêm dung môi pha mẫu tới vạch, trộn đều.

- *Dung dịch mẫu thêm chuẩn hỗn hợp Piracetam và Vinpocetin 80%, 100% và 120% của hàm lượng trong viên*: Cân chính xác một lượng chế phẩm tương ứng với khoảng 40mg Piracetam (hoặc 0,5mg Vinpocetin) lần lượt vào 9 bình nón dung tích 250ml, thêm 50ml n-hexan, siêu âm khoảng 15 phút, rồi thêm vào 3 bình nón đầu 40,0ml dung dịch chuẩn Piracetam ; 1,6ml dung dịch chuẩn Vinpocetin tương ứng nồng độ 80%; thêm vào 3 bình tiếp theo 50,0ml dung dịch chuẩn Piracetam ; 2,0ml dung dịch chuẩn Vinpocetin tương ứng nồng độ 100%; thêm vào 3 bình cuối 60,0ml dung dịch chuẩn Piracetam ; 2,4ml dung dịch chuẩn Vinpocetin tương ứng nồng độ 120%, lắc kỹ trong khoảng 30 phút. Chuyển hỗn hợp vào bình gạn, loại bỏ lớp n-hexan, lấy lớp acetonitril lọc qua giấy lọc vào bình định mức 100ml, định mức bằng acetonitril. Lọc qua màng lọc 0,45µm.

Bảng 3.7. Kết quả khảo sát độ đúng (n=3)

Mức thêm chuẩn	Piracetam in				Vinpocetin			
	Lượng mẫu (g)	Độ thu hồi (%)	Trung bình (%)	RSD (%)	Lượng mẫu (g)	Độ thu hồi (%)	Trung bình (%)	RSD (%)
120%	0,0893	100,94	101,26	0,36	0,0893	99,80	100,30	0,94
	0,0893	101,66			0,0893	101,39		
	0,0908	101,18			0,0908	99,72		
100%	0,0899	101,05	100,05	1,11	0,0899	100,52	100,72	0,56
	0,0889	100,26			0,0889	101,35		
	0,0899	98,85			0,0899	100,28		
80%	0,0888	98,65	99,06	0,37	0,0888	101,02	101,09	0,12
	0,0882	99,19			0,0882	101,01		
	0,0881	99,34			0,0881	101,23		

Nhận xét: Kết quả thu được ở Bảng 3.7 cho thấy: phương pháp đạt được độ đúng tốt với độ thu hồi của cả hai chất nằm trong khoảng từ 99,06% đến 101,26%; độ lệch chuẩn tương đối ở mỗi mức nồng độ đều nhỏ hơn 2,0%, đạt yêu cầu phân tích.

3. Ứng dụng định lượng Vinpocetin và Piracetam trong các mẫu TPBVSK trên thị trường

Các mẫu TPBVSK hỗ trợ chức năng tuần hoàn não được mua tại các nhà thuốc trên thị trường tỉnh Thừa Thiên Huế để phân tích đồng thời Piracetam và Vinpocetin.

Bảng 3.8. Kết quả phân tích Piracetam và Vinpocetin trong các mẫu thực tế

Mã số mẫu	Piracetam			Vinpocetin		
	Diện tích (mAU.s)	Hàm lượng (mg/viên)	Hàm lượng nhãn (mg/viên)	Diện tích (mAU.s)	Hàm lượng (mg/viên)	Hàm lượng nhãn (mg/viên)
T01	490534	425,9	400	284512	4,4	5
T02	53270	8,7	10	-	-	-
T03	249670	246,4	400	94823	1,7	5
T04	53264	12,7	15	-	-	-
T05	55526	13,3	15	-	-	-
T06	-	-	-	284112	4,5	5
T07	62837	12,1	10	-	-	-
T08	197558	72,5	80	89754	0,6	1
T09	53218	10,2	10	-	-	-
T10	-	-	-	90114	0,3	0.33

*Ghi chú: -: Không phát hiện hoặc dưới giới hạn phát hiện của phương pháp.

Tuy nhiên cứu này chưa thực hiện đầy đủ các dạng bào chế (dạng rắn, dạng lỏng và dạng dầu) do chưa tìm được đối tượng bào chế phù hợp đang có mặt trên thị trường nhưng bước đầu đã áp dụng thành công quy trình xây dựng được để phân tích Vinpocetin và Piracetam trong 10 mẫu TPBVSK có tác dụng tăng cường tuần hoàn não dạng viên nang mềm.

4. Kết luận

Đã xây dựng quy trình và thẩm định phương pháp định lượng đồng thời Vinpocetin và Piracetam trong đối tượng TPBVSK hỗ trợ chức năng tuần hoàn não bằng phương pháp HPLC với điều kiện sắc ký đơn giản, dễ dàng, tiết kiệm, có thể áp dụng được ở các phòng thí nghiệm. Phương pháp đã nghiên cứu có khoảng tuyến tính rộng, độ đúng tốt, độ chính xác cao, giới hạn phát hiện và giới hạn định lượng thấp.

Quy trình đã được áp dụng thành công để phân tích các mẫu đang lưu hành trên thị trường.

Tài liệu tham khảo

- [1] Hội đồng Dược điển Việt Nam (2017), *Dược điển Việt Nam V*, trang 769-770; 979-980
- [2] ICH (2003), Q1A (R2), Stability Testing of new drug substances and products.
- [3] El-Saharty YS (2008), *Simultaneous determination of Piracetam and vincamine by spectrophotometric and high-performance liquid chromatographic methods*, Journal of AOAC International, 91 (2): 311-321
- [4] John M. T. French, Matthew D. King, Owen M. McDougal (2016), *Quantitative determination of Vinpocetine in dietary supplements*, *Nat Prod Commun.*, 11(5): 607 – 609
- [5] Payal Patil, Mukesh Patil, Dipak D Patil (2018), *Development and Validation of RP-HPLC Method for Simultaneous Estimation of Piracetam and Vinpocetine*, *Asian Journal of Pharmaceutical Analysis*, Volume 8, Issue 2.