

ESTABLISHMENT OF IN-HOUSE SPECIFICATIONS OF “NHAT GAN LINH” CAPSULES

Pham Xuan Phong¹, Chu Van Men^{2*}, Chu Duc Thanh², Tran Thi Tuyet Nhung¹

¹Military Institute of Traditional Medicine - 442 Kim Giang, Dai Kim, Hoang Mai, Hanoi, Vietnam

²Vietnam Military Medical University - 160 Phung Hung, Phuc La Ward, Ha Dong, Hanoi, Vietnam

Received: 11/09/2023

Revised: 31/10/2023; Accepted: 04/12/2023

ABSTRACT

Objectives: To establish the in-house specifications of “Nhat gan linh” capsules have been established.

Materials and Methods: Investigate the in-house specifications of Nhat gan linh capsules including criteria: appearance, loss on drying, disintegration test, dosage uniformity, identification, quantitative assay, heavy metals and microbial limits.

Results: Appearance: Hard capsules with brown color, bitter sweet; Loss on drying: no more than 6%; Test for disintegration: less than 15 minutes; Uniformity of dosage units: the average drug in capsules about 500mg ± 7.5%. Identification: qualitative assay of berberin and saikosaponin A in Nhat gan linh capsules using HPLC. Quantitative assay: the content of berberin and saikosaponin A each capsule not less than 40 and 2 mg/capsule, respectively. Heavy metals: not more than 10 ppm. Microbial limit: Satisfaction of Vietnamese Pharmacopoeia (Appendix 13.6- level 4).

Conclusions: The study has successfully developed the in-house specifications of Nhat gan linh capsules.

Key words: Nhat gan linh, berberin, saikosaponin A, in-house specifications.

*Corresponding author

Email address: chuvanmen@gmail.com

Phone number: (+84) 353 212 500

<https://doi.org/10.52163/yhc.v65i1.877>



NGHIÊN CỨU XÂY DỰNG TIÊU CHUẨN CƠ SỞ VIÊN NANG NHẤT GAN LINH

Phạm Xuân Phong¹, Chủ Văn Mến^{2*}, Chủ Đức Thành², Trần Thị Tuyết Nhung¹

¹Viện Y học cổ truyền Quân đội - 442 Đ. Kim Giang, Đại Kim, Hoàng Mai, Hà Nội, Việt Nam

²Học viện Quân y - 160 Đ. Phùng Hưng, P. Phúc La, Hà Đông, Hà Nội, Việt Nam

Ngày nhận bài: 11 tháng 09 năm 2023

Chỉnh sửa ngày: 31 tháng 10 năm 2023; Ngày duyệt đăng: 04 tháng 12 năm 2023

TÓM TẮT

Mục tiêu: Xây dựng tiêu chuẩn chất lượng của viên nang Nhất gan linh.

Phương pháp nghiên cứu: Khảo sát chỉ tiêu chất lượng của viên nang Nhất gan linh theo Dược điển Việt Nam V bao gồm về hình thức cảm quan, mất khối lượng do làm khô, độ rã, độ đồng đều khối lượng, định tính, định lượng, giới hạn kim loại nặng và độ nhiễm khuẩn.

Kết quả: Viên nang Nhất gan linh lành lặn, bột thuốc đồng nhất, màu nâu, vị hơi đắng; mất khối lượng do làm khô không quá 6%; độ rã không quá 15 phút; độ đồng đều khối lượng không quá 7,5%; khối lượng trung bình bột thuốc trong nang 500 mg \pm 7,5%. Đồng thời viên nang Nhất gan linh thể hiện các phản ứng định tính của berberin và saikosaponin A; hàm lượng berberin và saikosaponin A trong viên lần lượt không dưới 40 và 2 mg/viên; giới hạn kim loại nặng không quá 10 ppm; độ nhiễm khuẩn đạt mức 4 theo tiêu chuẩn ĐDVN V.

Kết luận: Nghiên cứu này đã khảo sát, đánh giá và xây dựng được tiêu chuẩn cơ sở của viên nang Nhất gan linh bao gồm các chỉ tiêu chất lượng: hình thức cảm quan, mất khối lượng do làm khô, độ đồng đều khối lượng, định tính, định lượng, giới hạn kim loại nặng và độ nhiễm khuẩn.

Từ khóa: Nhất gan linh, berberin, saikosaponin A, tiêu chuẩn cơ sở.

*Tác giả liên hệ

Email: chuvanmen@gmail.com

Điện thoại: (+84) 353 212 500

<https://doi.org/10.52163/yhc.v65i1.877>

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Tại Việt Nam (2012) xơ gan là nguyên nhân gây tử vong đứng hàng thứ 9, gây ra hơn 14 nghìn ca tử vong (chiếm 2,7 % tổng số ca tử vong). Bên cạnh đó, Việt Nam là một trong 3 quốc gia nằm ở phía Tây Thái bình Dương có tỷ lệ nhiễm viêm gan virút cao nhất, ước tính khoảng 8,7 triệu người mắc viêm gan B và 1 triệu người mắc viêm gan C mạn tính (năm 2016); trong đó, tỷ lệ bệnh nhân viêm gan mạn tính chuyển thành xơ gan cao.

Xu hướng điều trị xơ gan bằng các bài thuốc cổ truyền đang được sử dụng rộng rãi, có rất nhiều bài thuốc điều trị xơ gan điển hình như bài “Nhất quán tiễn” và “Trư linh thang”. Dựa vào hai bài thuốc trên, nhóm nghiên cứu của Viện Y học cổ truyền Quân đội đã tiến hành nâng cấp bài thuốc với 15 loại dược liệu: Sa sâm, Sinh địa, Đương quy, Xuyên luyện tử, Trư linh, Bạch linh, Mật nhân, Trạch tả, Râu ngô, Hoàng bá, Mẫu đơn bì, Sơn thù, Chỉ thực, Sài hồ và Bạch thược với tên gọi “Nhất gan linh”. Dạng bào chế viên nang Nhất gan linh dựa trên bài thuốc trên cũng đã được tiến hành nghiên

cứ xây dựng công thức, hoàn thiện quy trình bào chế tạo ra chế phẩm điều trị xơ gan tiện dụng, ổn định cao.

Để có cơ sở đánh giá chất lượng, góp phần nâng cao độ ổn định và hiệu quả điều trị của sản phẩm, nghiên cứu này được tiến hành với mục tiêu xác định, đánh giá một số chỉ tiêu của viên nang Nhất gan linh đã bào chế được, làm cơ sở cho những nghiên cứu tiếp theo để đánh giá tác dụng trên động vật thực nghiệm.

2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng, vật liệu nghiên cứu

2.1.1. Đối tượng nghiên cứu

Viên nang Nhất gan linh được bào chế dựa trên bài thuốc Nhất gan linh bao gồm các dược liệu: Sa sâm, Sinh địa, Đương quy, Xuyên luyện tử, Trư linh, Bạch linh, Mật nhân, Trạch tả, Râu ngô, Hoàng bá, Mẫu đơn bì, Sơn thù, Chỉ thực, Sài hồ, Bạch thược với tỉ lệ thành phần được trình bày trong bảng 1.

Bảng 1. Thành phần dược liệu bài thuốc Nhất gan linh

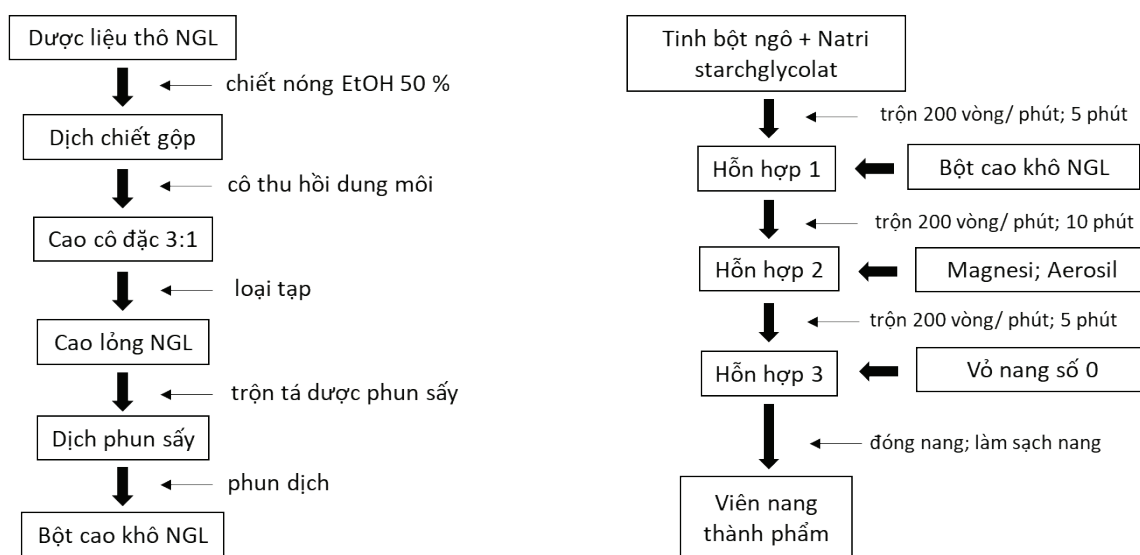
TT	Thành phần	Tỉ lệ % (kl/kl)
1	Sa sâm	6,1
2	Sinh địa	9,1
3	Đương quy	7,3
4	Xuyên luyện tử	3,7
5	Trư linh	6,1
6	Bạch linh	9,1
7	Trạch tả	9,1
8	Râu ngô	9,1
9	Hoàng bá	6,1
10	Mẫu đơn bì	6,1
11	Sơn thù	3,7
12	Chỉ thực	6,1
13	Sài hồ	4,9
14	Mật nhân	6,1
15	Bạch thược	7,3

Quy trình bào chế viên nang Nhất gan linh bao gồm 2 giai đoạn chính: 1. bào chế bột cao khô Nhất gan linh, 2. bào chế viên nang thành phẩm. Công thức viên nang Nhất gan linh thành phẩm được trình bày trong bảng 2. Quy trình bào chế viên nang Nhất gan linh được mô tả chi tiết trong hình 1.

Bảng 2. Thành phần công thức viên nang Nhất gan linh

TT	Thành phần	Khối lượng cho 1 viên
1	Bột cao khô Nhất gan linh	500 mg
2	Tinh bột ngô	35 mg
3	Natri starchglycolat	35 mg
4	Aerosil	4 mg
5	Magnesi tearat	10 mg
Tổng cộng		584 mg

Hình 1. Sơ đồ quy trình bào chế viên nang Nhất gan linh



A) Quy trình bào chế bột cao khô NGL

B) Quy trình bào chế thành phẩm viên nang NGL

2.1.2. Hóa chất và dung môi

- Chất chuẩn: saikosaponin A (Sigma Aldrich); berberin (Sigma Aldrich).
- Methanol, acetonitril, acid formic (Merck)...: đạt tiêu chuẩn phân tích HPLC.
- Ethanol 96%, methanol và các hóa chất, dung môi, thuốc thử đạt tiêu chuẩn phân tích và ĐDVN V.

2.1.3. Thiết bị

- Hệ thống HPLC Alliance Waters 2695D, 4 kênh dung

môi, autosampler, có buồng gia nhiệt cột, detector UV 2487, phần mềm Empower, cân phân tích Sartorius (độ chính xác 0,1 mg), cân kỹ thuật Adam - Mỹ (độ chính xác 0,01g).

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Đánh giá một số chỉ tiêu của viên nang Nhất gan linh theo tiêu chuẩn của ĐDVN V gồm có các chỉ tiêu sau:

- Hình thức: Thử bằng cảm quan.

- *Mất khối lượng do làm khô*: Lấy 20 viên nang bất kỳ, bóc bỏ phần vỏ nang thu lấy phần bột đóng trong nang, trộn đều. Lấy khoảng 2g bột rồi thử theo Phụ lục 9.6 của ĐĐVN V.

- *Độ rã*: Tiến hành theo phương pháp thử độ rã viên nén và viên nang (Phụ lục 11.6, ĐĐVN V).

- *Độ đồng đều khối lượng viên*: Thử theo Phụ lục 11.3 của ĐĐVN V

- *Định tính*: sử dụng phương pháp HPLC để định tính saikosaponin A và berberin

+ Cột sắc ký SunFire C18 (250×4,6 mm; 5 μm).

+ Detector UV đo ở λ = 254 nm.

+ Pha động: đệm phosphat pH 6,3 (100%), đệm phosphat pH=7 (100%) và đệm phosphat pH=4,5 : MeOH (9:1)

+ Tốc độ dung môi pha động là 1,0 ml/phút.

+ Thể tích tiêm bơm mẫu 10 μl.

+ Chuẩn bị dung dịch chuẩn: Dung dịch chuẩn gốc của berberin và saikosaponin A được pha trong MeOH (100 μg/mL). Pha tạo dung dịch chuẩn trung gian hỗn hợp; pha loãng tạo dung dịch chuẩn làm việc tới nồng độ thích hợp.

+ Chuẩn bị dung dịch thử: Cân chính xác khoảng 1,500g bột viên nang, chiết với 50 ml dung môi và phương pháp chiết xuất đã lựa chọn, để nguội, lọc. Dịch chiết trước khi tiêm vào máy HPLC được lọc qua màng lọc 0,45 μm.

+ Mẫu trắng: Methanol

+ Berberin: Thời gian xuất hiện pic của Berberin trên mẫu thử và mẫu chuẩn là trùng nhau trên sắc ký đồ

+ Saikosaponin A: Thời gian xuất hiện pic của saikosaponin A trên mẫu thử và mẫu chuẩn là trùng nhau trên sắc ký đồ

- *Định lượng*: Định lượng saikosaponin A và berberin bằng phương pháp HPLC đã thẩm định.

Kiểm tra khả năng thích hợp của hệ sắc ký: tiêm và ghi

sắc ký đồ của dung dịch chuẩn. Độ lệch chuẩn tương đối (RSD) của diện tích pic trong 6 lần tiêm lặp lại dung dịch chuẩn không được lớn hơn 2,0%.

Tiêm riêng biệt 10 μl các dung dịch chuẩn và thử vào máy sắc ký. Tiến hành sắc ký theo điều kiện đã nêu, ghi thời gian lưu và diện tích pic trong sắc ký đồ dung dịch chuẩn và dung dịch thử. Lập đường chuẩn thể hiện mối tương quan giữa nồng độ và diện tích pic berberin và saikosaponin A thu được trên sắc ký đồ. Tính toán hàm lượng berberin và saikosaponin A của mẫu thử dựa theo đường chuẩn xây dựng được.

Hàm lượng berberin và saikosaponin A được tính theo công thức sau:

Tính kết quả:

$$HL \% = \frac{C_{ch} \times S_{th} \times 10^{-3} \times 10^4}{S_{ch} \times m_c \times (100 - h)}$$

Trong đó:

- C_{ch} là nồng độ dung dịch chuẩn, đơn vị: μg/ml.

- S_{ch} , S_{th} là diện tích pic chất phân tích khi phân tích mẫu chuẩn và mẫu thử.

- m_c : khối lượng dược liệu cân để định lượng, đơn vị: mg.

- h : độ ẩm của dược liệu (%); n : hệ số pha loãng.

- *Kim loại nặng*: Phương pháp AAS. Xác định giới hạn 4 kim loại nặng gồm: Cd, Hg, As, Pb. Thử theo phụ lục 9.4.11, ĐĐVN V.

- *Giới hạn nhiễm khuẩn*: Tiến hành thử theo ĐĐVN V, phụ lục 13.6 - “Thử giới hạn nhiễm khuẩn”, phương pháp đĩa thạch.

3. KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN

3.1. Cảm quan hình thức

Viên nang cứng Nhắt gan linh có chứa bột thuốc màu vàng nâu đồng nhất, vị đắng, mùi đặc trưng.

3.2. Độ đồng đều khối lượng



Bảng 3. Độ đồng đều khối lượng của viên nang cứng Nhất gan linh

Viên	Khối lượng (mg)	Viên	Khối lượng (mg)	Viên	Khối lượng (mg)
1	574,24	8	579,59	15	579,50
2	576,65	9	574,76	16	576,13
3	580,05	10	581,06	17	584,18
4	669,41	11	582,39	18	582,77
5	576,84	12	578,52	19	581,54
6	577,26	13	571,44	20	582,33
7	581,02	14	576,25		
KLTB = 583,30 mg; KLTB \pm 7,5 % = 539,55 – 627,04 mg					

Khối lượng trung bình của bột thuốc trong viên nang cứng Nhất gan linh đạt yêu cầu quy định chung là 583,30 mg. Các viên thử đều nằm trong giới hạn KLTB \pm 7,5 %. Như vậy, độ đồng đều khối lượng của viên nang cứng Nhất gan linh đạt yêu cầu quy định chung đối với chế phẩm viên nang cứng theo ĐDVN V.

3.3. Độ rã và mất khối lượng do làm khô

Bảng 4. Độ rã và mất khối lượng do làm khô của viên nang cứng Nhất gan linh

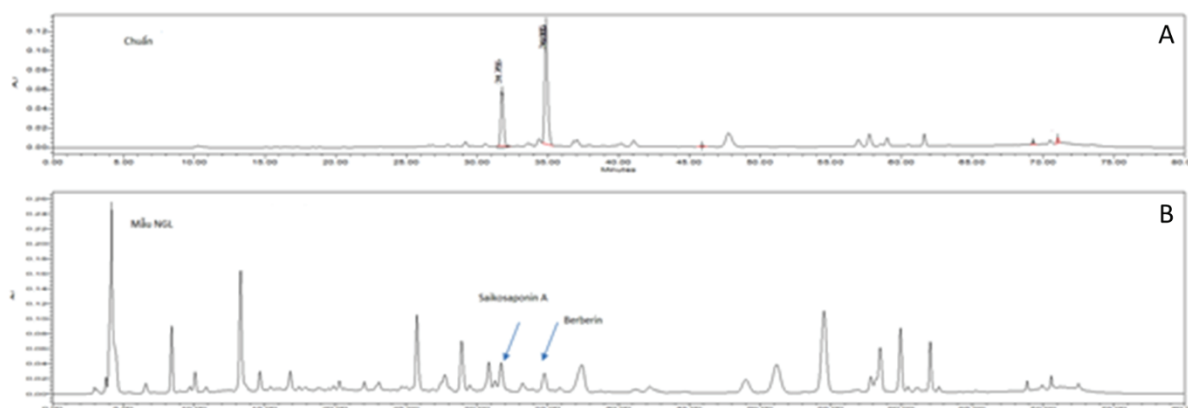
Mẫu viên	1	2	3	4	5	6	TB
Độ rã (phút)	6,74	7,53	6,59	6,83	7,09	6,65	6,90 \pm 0,32
Mất khối lượng do làm khô (%)	4,32	4,42	4,57	4,36	4,44	4,48	4,43 \pm 0,08

Sau khi thử độ rã của 6 viên nang cứng Nhất gan linh trên thiết bị đo độ rã thì cả 6 viên đều có thời gian rã ngắn, trung bình là 6,90 \pm 0,32 phút. Như vậy, viên nang cứng Nhất gan linh đáp ứng được yêu cầu về độ rã theo quy định chung của các chế phẩm viên nang của ĐDVN V (thời gian rã < 30 phút). Bảng trên cũng cho thấy mất khối lượng do làm khô của 6 mẫu viên nang là 4,43 \pm 0,08%.

3.4. Định tính

Kết quả định tính của viên nang cứng Nhất gan linh

Hình 2. Sắc ký đồ HPLC: A) hỗn hợp chuẩn berberin và saikosaponin A; B) viên nang cứng Nhất gan linh



Mẫu viên nang Nhất gan linh xuất hiện pic của berberin và Saikosaponin A với thời gian lưu tương ứng với thời gian lưu của dung dịch berberin và Saikosaponin A chuẩn. Như vậy, bột cao khô Nhất gan linh đạt yêu cầu

trong phép thử định tính.

3.5. Định lượng

Kết quả định lượng của viên nang cứng Nhất gan linh

Bảng 5. Hàm lượng berberin và saikosaponin A trong viên nang Nhất gan linh

Mẫu	KL (mg)	V pha (ml)	HS PL	Diện tích pic (μ AU.s)		C (μ g/ml)		Hàm lượng TT (mg)	
				Saikosaponin A	Berberin	Saikosaponin A	Berberin	Saikosaponin A	Berberin
1	100,1	100	2	8798	181215	4,52	80,08	2,59	45,99
2	100,7	100	2	8637	180919	4,55	80,56	2,60	46,46
3	100,4	100	2	8601	179795	4,54	80,32	2,62	46,59
4	100,0	100	2	8647	180036	4,52	80,00	3,02	53,55
5	100,4	100	2	8838	180511	4,54	80,32	2,61	46,33
6	100,2	100	2	8592	179998	4,53	80,16	2,61	46,27
TB \pm SD								2,68\pm0,17	47,53\pm2,96

Viên nang Nhất gan linh có hàm lượng saikosaponin A và berberin lần lượt là 2,68 \pm 0,17 mg và 47,53 \pm 2,96 mg. Căn cứ vào hàm lượng hoạt chất định lượng được để đề ra mức giới hạn về hàm lượng hoạt chất

cho viên nang Nhất gan linh trong xây dựng TCCS của chế phẩm.

3.6. Giới hạn kim loại nặng

Bảng 6. Hàm lượng kim loại nặng trong viên nang Nhất gan linh

Mẫu	Kim loại nặng (mg/kg) viên nang Nhất gan linh											
	Lô 1				Lô 2				Lô 3			
	Cd	Pb	Hg	As	Cd	Pb	Hg	As	Cd	Pb	Hg	As
1	-	1,14	-	-	-	1,33	-	-	-	1,23	-	-
2	-	1,18	-	-	-	1,14	-	-	-	1,06	-	-
3	-	1,24	-	-	-	1,29	-	-	-	1,02	-	-
4	-	1,33	-	-	-	1,35	-	-	-	1,20	-	-
5	-	1,07	-	-	-	1,26	-	-	-	1,24	-	-
6	-	1,29	-	-	-	1,16	-	-	-	1,04	-	-
TB \pm SD		1,21 \pm 0,10	-	-	-	1,26 \pm 0,09	-	-		1,13 \pm 0,10	-	-

Ở 3 lô viên nang Nhất gan linh không thấy vết của Cadimi (Cd) và Asen (As), còn hàm lượng chì và thủy ngân thì đều ở mức thấp (< 3mg/kg).

3.7. Độ nhiễm khuẩn

Bảng 7. Kết quả đánh giá giới hạn nhiễm khuẩn của viên nang Nhất gan linh

Mẫu	Chỉ tiêu	Kết quả	Yêu cầu	Kết luận
Lô 1	Tổng số VSV hiếu khí (CFU/g)	4.10 ²	Không quá 10 ⁴ /g	Đạt
	Tổng số nấm (CFU/g)	56	Không quá 10 ² /g	Đạt
	VSV gây bệnh: - Vi khuẩn Gram âm dung nạp mật trong 1g (ml).	52	Không quá 10 ² CFU	Đạt
	- <i>Salmonella</i> trong 10g (ml)	Không có	Không có	Đạt
	- <i>Escherichia coli</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> trong 1 g (ml)	Không có	Không có	Đạt
Lô 2	Tổng số VSV hiếu khí (CFU/g)	5.10 ²	Không quá 10 ⁴ /g	Đạt
	Tổng số nấm (CFU/g)	44	Không quá 10 ² /g	Đạt
	VSV gây bệnh: - Vi khuẩn Gram âm dung nạp mật trong 1g (ml).	61	Không quá 10 ² CFU	Đạt
	- <i>Salmonella</i> trong 10g (ml)	Không có	Không có	Đạt
	- <i>Escherichia coli</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> trong 1 g (ml)	Không có	Không có	Đạt
Lô 3	Tổng số VSV hiếu khí (CFU/g)	3.10 ²	Không quá 10 ⁴ /g	Đạt
	Tổng số nấm (CFU/g)	47	Không quá 10 ² /g	Đạt
	VSV gây bệnh: - Vi khuẩn Gram âm dung nạp mật trong 1g (ml).	59	Không quá 10 ² CFU	Đạt
	- <i>Salmonella</i> trong 10g (ml)	Không có	Không có	Đạt
	- <i>Escherichia coli</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> trong 1 g (ml)	Không có	Không có	Đạt

Như vậy, viên nang Nhất gan linh ở cả 3 lô điều chế được đều đáp ứng yêu cầu về độ nhiễm khuẩn của chuyên luận phép thử giới hạn nhiễm khuẩn (Phụ lục 13.6, ĐĐVN V).

4. KẾT LUẬN

Từ các kết quả nghiên cứu, chúng tôi đã xây dựng tiêu chuẩn cơ sở viên nang Nhất gan linh bao gồm một số chỉ tiêu như: Tính chất: viên nang cứng, lạnh lặn, bột thuốc đồng nhất, màu nâu xám, vị hơi đắng. Mất khối lượng do làm khô: không quá 6%. Độ rã: không quá 15 phút. Độ đồng đều khối lượng: Khối lượng trung bình bột thuốc trong nang 500 mg ± 7,5%. Định tính: chế phẩm phải thể hiện các phản ứng định tính của berberin và saikosaponin A. Định lượng: hàm lượng berberin và

saikosaponin A trong chế phẩm lần lượt không dưới 40 và 2 mg/viên. Giới hạn kim loại nặng: không quá 10 ppm. Độ nhiễm khuẩn: đạt mức 4, tiêu chuẩn ĐĐVN V.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] World Health Organization, Top 10 causes of death in Viet Nam for both sexes aged all ages. Cause-specific mortality, 2000 - 2019, 2019.
- [2] World Health Organization, World Hepatitis Day: Increased knowledge key to prevention and treatment of Hepatitis in Viet Nam, 2016.
- [3] Đỗ Tất Lợi, Cây thuốc và vị thuốc Việt Nam, Nhà xuất bản Y học, 195, 1999.
- [4] Tarte PS, Shedharkar GR, Force Degradation

Study of Berberine Chloride by Using Stability Indicating HPLC Method, *International Journal of PharmTech Research*, 6(5), 2014,1490-500.

được phẩm, dược liệu và hợp chất tự nhiên; Nhà xuất bản Y học thành phố Hồ Chí Minh, 138, 2006, 148-149.

[5] Nguyễn Minh Đức, Sắc ký lỏng hiệu năng cao và một số ứng dụng vào nghiên cứu, kiểm nghiệm

[6] Bộ Y tế, Dược Điển Việt Nam V, Nhà xuất bản Y học, 2017.

