

## DEVELOPMENT AND VALIDATION OF METHOD FOR BROMELAIN DETERMINATION BY FIP UNIT IN GASTRO - RESISTANT TABLET

TRAN THI THANH HUE<sup>1,✉</sup>, NGUYEN THI HONG VINH<sup>1</sup>, NONG THI VAN<sup>1</sup>,  
NGUYEN THI LIEN<sup>1</sup>

National Institute of Drug Quality Control

✉Corresponding author: huepharmacist@gmail.com

Received December 09<sup>th</sup>, 2023

Accepted March 15<sup>th</sup>, 2024

**ABSTRACT:** Bromelain – a protein digestive enzyme extracted from pineapple (*Ananas comosus.*), has many good clinical effect and is safe in use, therefore it is appeared in many drugs and dietary supplements. In this study, we developed a UV – VIS at 275 nm analysis method for Bromelain in a gastro - resistant tablet product. The study optimized and selected the suitable substrate, the reaction time of 10 min and the sample concentration of 0.1 FIP Bromelain unit/ml with the reaction condition at 35 °C, pH 7.15. The method was validated in specificity, linearity, range, accuracy and precision according to ICH Q2 (R1) – 2005 guideline and the bioanalytical method validation guidance. The results showed that the method had linear over the concentration range of 0.05 – 0.15 FIP unit/ml; the accuracy was within 98.7 % - 104.3 %; the precision had RSD < 5 %. Validation results proved that the established method was suitable for determination of Bromelain in enteric - coated tablet.

**Keywords:** Bromelain FIP, UV – VIS method

## XÂY DỰNG VÀ THẨM ĐỊNH PHƯƠNG PHÁP XÁC ĐỊNH HOẠT TÍNH BROMELAIN THEO ĐƠN VỊ FIP TRONG CHẾ PHẨM VIÊN NÉN BAO TÁN TRONG RUỘT

TRẦN THỊ THANH HUE<sup>1,✉</sup>, NGUYỄN THỊ HỒNG VINH<sup>1</sup>, NÔNG THỊ VÂN<sup>1</sup>,  
NGUYỄN THỊ LIÊN<sup>1</sup>

Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung Ương

✉Tác giả liên hệ: huepharmacist@gmail.com

Nhận bài ngày 09 tháng 12 năm 2023

Chấp nhận đăng ngày 15 tháng 3 năm 2024

**Tóm tắt:** Bromelain – một enzym thủy phân protein được chiết xuất từ cây dứa (*Ananas comosus.*), có nhiều tác dụng tốt và an toàn nên có mặt trong nhiều loại thuốc và thực phẩm chức năng khác nhau. Việc kiểm soát chất lượng các thuốc có hoạt chất này còn khó khăn do chưa có chuyên luận riêng trong các dược điển. Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã phát triển một phương pháp quang phổ hấp thụ tử ngoại và khả kiến (UV – VIS) ở bước sóng 275 nm để xác định hoạt tính Bromelain theo đơn vị FIP trong 1 chế phẩm viên nén bao tan trong ruột. Nghiên cứu đã tối ưu hoá và khảo sát lựa chọn loại cơ chất casein phù hợp, thời gian phản ứng 10 phút và nồng độ mẫu thử là 0,1 FIP/ml với điều kiện phản ứng ở 35 °C, pH 7,15. Phương pháp xây dựng đã được thẩm định các chỉ tiêu như: độ đặc hiệu, khoảng tuyến tính, độ đúng, độ lặp lại theo đúng hướng dẫn của ICH Q2 (R1) – 2005 [5] và quy định đối với thuốc có nguồn gốc sinh học. Kết quả cho thấy khoảng tuyến tính của phương pháp là từ 0,05 – 0,15 FIP/ml, độ đúng từ 98,7 % - 104,3 %, RSD độ chính xác < 5 %, chứng minh quy trình xây dựng được phù hợp để xác định hoạt tính Bromelain trong chế phẩm viên nén bao tan trong ruột.

**Từ khóa:** Bromelain đơn vị FIP, Phương pháp UV-VIS

## 1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Bromelain là tên gọi chung của các enzym thủy phân protein bằng cách phân hủy các liên kết peptid trong phân tử protein được tìm thấy trong tất cả các bộ phận của cây dứa (*Ananas comosus*) [1]. Tác dụng chính của Bromelain là chống viêm, giảm đau, chống huyết khối, điều hòa miễn dịch, chữa lành vết thương và cải thiện tuần hoàn nên được sử dụng nhiều trong các bệnh viêm xương khớp, chấn thương trong thể thao, viêm xoang mạn tính, các bệnh về tim mạch, hen suyễn, dị ứng, bỏng [1], [2]. Mặt khác Bromelain được chứng minh là an toàn, ít tác dụng phụ ngay cả khi dùng lâu dài, hấp thu tốt qua đường uống vì vậy trên thị trường xuất hiện nhiều chế phẩm chứa Bromelain: ở dạng thuốc (Bromanase, Mimelin, Brosafe) và thực phẩm chức năng (Ocean bromelain, Borolain). Bromelain trong các chế phẩm được xác định theo một trong ba đơn vị là FIP, CDU và GDU. Tuy nhiên, việc kiểm soát chất lượng các chế phẩm chứa Bromelain chưa có trong các dược điển Anh, Mỹ, Nhật, Châu Âu, Việt Nam, Ấn Độ, Trung Quốc, Hàn Quốc, điều này gây ra nhiều khó khăn trong việc xây dựng tiêu chuẩn, đăng ký và kiểm soát chất lượng chế phẩm viên nén chứa Bromelain. Ở Việt Nam, năm 2010, PGS.TS. Đoàn Cao Sơn đã nghiên cứu thành công quy trình xác định hoạt tính Bromelain theo đơn vị CDU [3]. Năm 2022, dược sỹ Nguyễn Thị Thu Trang đã xây dựng và thẩm định quy trình xác định hoạt tính Bromelain trong viên nén theo đơn vị FIP với nồng độ dung dịch định lượng là 2,6 ppm/ml tương đương 0,013 đơn vị FIP/ml, tuy nhiên chênh lệch độ hấp thụ giữa dung dịch chuẩn và dung dịch đối chứng của chuẩn thấp (khoảng 0,1) [4]. Vì vậy với mục đích mở rộng hơn độ chênh lệch hấp thụ giữa dung dịch chuẩn và dung dịch đối chứng giúp giảm thiểu sai số do các yếu tố ảnh hưởng gây ra trong quy trình phân tích chúng tôi tiến hành nghiên cứu “Xây dựng và thẩm định phương pháp xác định hoạt tính Bromelain theo đơn vị FIP trong chế phẩm viên nén bao tan trong ruột”. Việc thẩm định quy trình định lượng được thực hiện theo đúng hướng dẫn của ICH Q2 (R1) – 2005 [5] và hướng dẫn thẩm định với thuốc có nguồn gốc sinh học [6] nhằm chứng minh phương pháp đã xây dựng đảm bảo độ chính xác và tin cậy.

## 2. THỰC NGHIỆM

### 2.1. Đối tượng nghiên cứu

Viên nén bao phim tan trong ruột BROS SAFE; số lô: 2868, ngày sản xuất: 19/12/2019; hạn dùng: 18/12/2022; nơi sản xuất: công ty Cổ phần Dược Trung ương Mediplantex.

Mẫu placebo: Bao gồm các thành phần với hàm lượng như công thức bào chế của viên nhân nhưng không chứa

hoạt chất Bromelain. Mẫu placebo được cung cấp bởi nhà sản xuất và cam kết chuẩn bị đúng với công thức như sau:

Stt	Thành phần	Hàm lượng
1	Microcystalin cellulose	95 mg
2	Lactose (phun sấy)	120 mg
3	Magnesi stearat	5,0 mg
4	Aerosil	1,3 mg

### 2.2. Thiết bị, dụng cụ, hóa chất, chất chuẩn

#### 2.2.1. Thiết bị, dụng cụ phân tích

Máy quang phổ UV-VIS Shimadzu 2600 (Nhật); Cân kỹ thuật Mettler Toledo ICS 685S (Thụy Sĩ, độ chính xác d = 1 g - dùng cân hóa chất) Cân phân tích Sartorius CP224S (Đức, độ chính xác d = 0,1 mg - dùng cân mẫu thử); Cân phân tích Mettler Toledo XPE26 (Thụy Sĩ, độ chính xác d = 0,01 mg - dùng để cân chuẩn có khối lượng dưới 20 mg); Bể ổn nhiệt Labec (Úc); Bộ Micropipette eppendorf (Đức). Các dụng cụ thủy tinh có độ chính xác và các dụng cụ cần thiết khác trong phòng thí nghiệm.

Thiết bị và dụng cụ được hiệu chuẩn định kỳ theo quy định của ISO/IEC 17025 và GLP.

#### 2.2.2. Dung môi, hóa chất

Dung môi, hóa chất: Các hóa chất sử dụng trong nghiên cứu là tinh khiết gồm: tris (hydroxymethyl) aminomethan; natri edetat dihydrat; L - cystein hydroclorid; natri hydroxyd; kali clorid; casein from bovine milk (CBS); casein high molecular weight phosphoprotein prepared from milk (Casein Hammarsten) (CHV); casein Hammarsten bovine (CHS); acid hydroclorid; acid trichloroacetic; natri acetat; acid acetic băng; nước RO.

#### 2.2.3. Chất chuẩn

Chất chuẩn Bromelain FIP Standard; lô: 3; hàm lượng: 3,09 đơn vị FIP/mg nguyên trạng; sản xuất bởi International Pharmaceutical Federation.

### 2.3. Phương pháp nghiên cứu

#### 2.3.1. Xây dựng phương pháp

Qua tham khảo tài liệu, chúng tôi lựa chọn quy trình định lượng Bromelain theo đơn vị FIP bằng phương pháp thủy phân cơ chất casein ở điều kiện pH 7,15, nhiệt độ 35 °C và sử dụng dung dịch hoạt hóa enzym có chứa L-cystein dùng để hòa tan mẫu thử và chuẩn. Hỗn hợp sau phản ứng được lọc và đo quang ở bước sóng 275 nm. Hoạt tính Bromelain trong mẫu thử (đơn vị FIP/viên) được xác định bằng cách so sánh với dung dịch chuẩn trong cùng điều kiện [7]. Quy trình cụ thể như sau:

**\* Chuẩn bị thuốc thử:**

- **Dung dịch kết lắng:** Hòa tan 9 g acid trichloroacetic; 24,8 g natri acetat trihydrat và 19,5 ml acid acetic vào trong nước cất vừa đủ 500 ml.

- **Xác định sự phù hợp của giấy lọc:** Lọc 5 ml dung dịch kết lắng qua giấy lọc. Đo độ hấp thụ của dịch lọc ở 275 nm, mẫu trắng là dung dịch kết lắng chưa lọc. Chênh lệch độ hấp thụ đo được không quá 0,04.

- **Dung dịch đệm:** Hòa tan 6,06 g tris(hydroxymethyl) aminomethan trong 600 ml nước cất. Điều chỉnh pH bằng acid hydroclorid loãng tới pH 7,15 ở 25 °C, thêm nước cất vừa đủ 1000 ml. Ở 35 °C, dung dịch này có pH 7,00.

- **Dung dịch hoạt hóa enzym:** Hòa tan 60,5 mg cystein, 37,2 mg natri edetat dihydrat và 74,6 mg kali clorid trong dung dịch đệm. Điều chỉnh, nếu cần, đến pH 7,15 và thêm dung dịch đệm vừa đủ 100 ml. Dung dịch dùng trong ngày.

- **Dung dịch hoạt hóa cơ chất:** Hòa tan 242 mg cystein và 93 mg natri edetat dihydrat trong dung dịch đệm. Điều chỉnh, nếu cần, đến pH 7,15 và thêm dung dịch đệm vừa đủ 25 ml. Dung dịch dùng trong ngày.

- **Dung dịch cơ chất casein:** Thêm 2,5 g casein trong 10 ml nước cất, khuấy đều, thêm 15 ml dung dịch natri hydroxyd 0,1 N. Khuấy kỹ bằng máy khuấy từ trong 30 phút ở 55 °C đến khi casein hòa tan hoàn toàn. Thêm 50 ml dung dịch đệm và 10 ml dung dịch hoạt hóa cơ chất. Điều chỉnh pH đến 7,15 ở 25 °C. Thêm dung dịch đệm vừa đủ 100 ml. Dung dịch dùng trong ngày.

**\* Chuẩn bị dung dịch chuẩn**

Hòa tan một lượng chuẩn Bromelain trong dung dịch hoạt hóa enzym để thu được dung dịch có nồng độ xác định (đơn vị FIP Bromelain/ml).

**\* Chuẩn bị dung dịch thử**

Cân 20 viên đã loại bỏ vỏ bao, xác định khối lượng trung bình viên và nghiền thành bột mịn. Cân chính xác một lượng bột viên hòa tan trong dung dịch hoạt hóa enzym để thu được dung dịch thử có nồng độ tương đương dung dịch chuẩn. Ngay trước khi sử dụng ổn định nhiệt độ của dung dịch ở 35 °C trong bể điều nhiệt.

**\* Tiến hành:**

Chuẩn bị 2 ống phản ứng cho mỗi dung dịch thử/chuẩn như sau:

	<b>Ống định lượng</b>	<b>Ống đối chứng</b>
Dung dịch cơ chất Ổn định nhiệt độ ở 35 °C trong bể điều nhiệt	2,5 ml	2,5 ml
Dung dịch enzym (Dung dịch chuẩn hoặc dung dịch thử) Lắc đều, ủ chính xác trong thời gian nhất định (xác định bằng đồng hồ bấm giây) ở 35 °C	2,5 ml	-
Dung dịch kết lắng, lắc đều	5,0 ml	5,0 ml
Dung dịch enzym (Dung dịch chuẩn hoặc dung dịch thử)	-	2,5 ml

Tiếp tục để yên các ống định lượng và ống đối chứng ở 35 °C trong 30 phút, hỗn hợp sau phản ứng được lọc qua giấy lọc. Đo độ hấp thụ của các dịch lọc ở bước sóng 275 nm trong cốc đo thạch anh dày 1 cm, mẫu trắng là nước RO.

Vai trò của Bromelain trong quy trình trên là chất xúc tác cho phản ứng thủy phân cơ chất casein vì vậy nồng độ cơ chất casein đưa vào phải lớn hơn rất nhiều so với nồng độ cần thiết để tất cả các phân tử enzym đều bão hòa cơ chất và phản ứng đạt động học bậc không. Khi đó, tốc độ phản ứng chỉ phụ thuộc vào nồng độ enzym. Trong nghiên cứu này chúng tôi tiến hành khảo sát và lựa chọn loại cơ chất casein sử dụng, nồng độ của dung dịch thử/chuẩn và thời gian phản ứng enzym-cơ chất để tối ưu quy trình phân tích.

**2.3.2. Thẩm định quy trình phân tích**

Thẩm định phương pháp xác định hoạt tính Bromelain theo đúng hướng dẫn của ICH Q2 (R1) – 2005 [5] và hướng dẫn thẩm định đối với thuốc có nguồn gốc sinh học [6] với các chỉ tiêu: Độ thích hợp hệ thống, độ đặc hiệu, độ chọn lọc, khoảng tuyến tính, độ đúng và độ lặp lại.

**2.3.3. Ứng dụng phân tích mẫu**

Áp dụng quy trình đã xây dựng để xác định hoạt tính Bromelain theo đơn vị FIP trên các mẫu chế phẩm cụ thể.

**3. KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN**

**3.1. Xây dựng quy trình phân tích**

**3.1.1. Khảo sát cơ chất casein**

Tiến hành chuẩn bị 1 dung dịch chuẩn Bromelain có nồng độ khoảng 0,09 đơn vị FIP/ml để khảo sát trên 3 loại casein khác nhau là: casein from bovine milk - CBS, casein

high molecular weight phosphoprotein prepared from milk (Casein Hammarsten) - CHV, casein Hammarsten bovine - CHS. Kết quả được trình bày ở Bảng 1.

**Bảng 1.** Kết quả khảo sát các loại cơ chất Casein khác nhau

Stt	CBS			CHV			CHS				
	A <sub>DCC</sub>	A <sub>C</sub>	ΔA	A <sub>DCC</sub>	A <sub>C</sub>	ΔA	A <sub>DCC</sub>	A <sub>C</sub>	ΔA		
1	0,1473	0,5777	0,4304	0,1282	0,5712	0,4430	0,3596	0,8086	0,4490		
2	0,1482	0,5801	0,4319	0,1234	0,5732	0,4498	0,3608	0,7940	0,4332		
Trung bình			0,4312	Trung bình			0,4464	Trung bình			0,4411

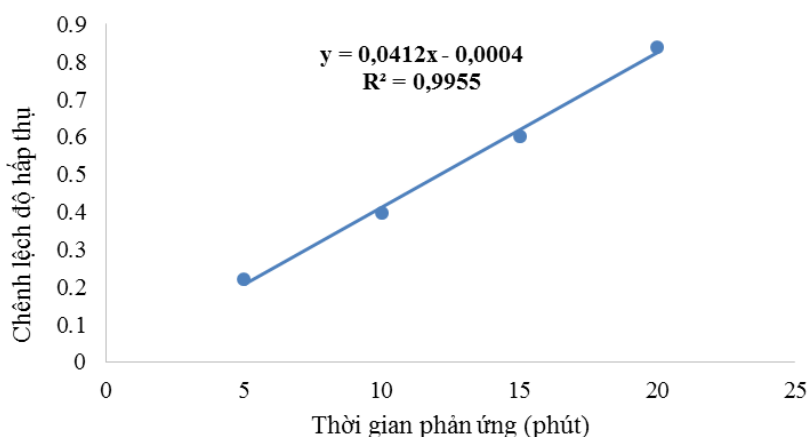
Ghi chú: A<sub>DCC</sub>: độ hấp thụ dịch lọc ống đối chứng chuẩn; A<sub>C</sub>: độ hấp thụ dịch lọc ống chuẩn; ΔA = A<sub>DCC</sub> - A<sub>C</sub>

Từ kết quả Bảng 1 cho thấy: chênh lệch độ hấp thụ của dịch lọc giữa ống chuẩn với ống đối chứng chuẩn ở 3 loại casein khảo sát khác biệt không nhiều, % chênh lệch giữa CBS với CHV và CHS lần lượt là 3,4 % và 2,4 % đều < 5,0 %, vì vậy có thể sử dụng cả 3 loại cơ chất casein này để định lượng Bromelain. Tuy nhiên, với CHS độ hấp thụ ống đối chứng của chuẩn cao (> 0,35) dẫn đến độ hấp thụ của ống chuẩn cao (xấp xỉ 0,8) cần cân nhắc việc sử dụng cơ chất CHS trong trường hợp nền mẫu thử có khả

năng hấp thụ quang. 2 loại casein CBS hoặc CHV được ưu tiên lựa chọn làm cơ chất trong quy trình định lượng Bromelain theo đơn vị FIP.

### 3.1.2. Khảo sát thời gian phản ứng

Tiến hành khảo sát thời gian phản ứng của dung dịch chuẩn Bromelain sử dụng ở mục 3.1 với dung dịch cơ chất CBS ở các thời điểm 5; 10; 15; 20 (phút). Kết quả được trình bày ở Hình 2.



**Hình 2.** Đồ thị biểu diễn mối tương quan tuyến tính giữa thời gian phản ứng và ΔA

Từ kết quả khảo sát thời gian phản ứng ở Hình 2 nhận thấy tại các thời điểm: 5; 10; 15; 20 (phút) độ hấp thụ dịch lọc của ống chuẩn tăng dần theo thời gian và có sự tương quan tuyến tính giữa chênh lệch độ hấp thụ giữa ống chuẩn và ống đối chứng chuẩn với thời gian phản ứng. Mặt khác, với thời gian phản ứng 10; 15; 20 phút chênh lệch độ hấp thụ giữa ống chuẩn và ống đối chứng chuẩn khá lớn (> 0,39) có thể giảm thiểu các sai số có thể xảy ra trong quá trình phân tích. Do đó nghiên

cứ lựa chọn thời gian phản ứng là 10 phút nhằm giảm thiểu thời gian phân tích mẫu.

### 3.1.3. Khảo sát nồng độ phản ứng

Tiến hành khảo sát nồng độ dung dịch phản ứng bằng cách chuẩn bị dãy dung dịch Bromelain chuẩn ở các mức nồng độ: 0,01; 0,03; 0,05; 0,1; 0,2; 0,3 đơn vị FIP/ml, sử dụng dung dịch cơ chất casein (CBS), thời gian phản ứng 10 phút. Kết quả được trình bày Bảng 2.

**Bảng 2.** Kết quả khảo sát nồng độ dung dịch Bromelain

Nồng độ Bromelain (đơn vị FIP/ml)	A <sub>DCC</sub>	A <sub>C</sub>	ΔA
0,01	0,1200	0,1578	0,0378
0,03	0,1360	0,2403	0,1043
0,05	0,1419	0,3443	0,2024
0,10	0,1660	0,6447	0,4787
0,20	0,1989	1,1344	0,9355
0,30	0,2305	1,5473	1,3168

Từ kết quả Bảng 2 cho thấy, khi tăng dần nồng độ dung dịch chuẩn từ 0,01 đến 0,30 đơn vị FIP/ml thì có sự tăng tương ứng về chênh lệch độ hấp thụ giữa ống chuẩn và ống đối chứng chuẩn. Khi nồng độ phản ứng cao 0,20 – 0,30 đơn vị FIP/ml, độ hấp thụ của ống chuẩn cao (> 1) nên cần xem xét khi mẫu có độ hấp thụ của ống đối chứng cao và phù hợp với khoảng đo của máy quang phổ. Với nồng độ phản ứng là 0,10 đơn vị FIP/ml, chênh lệch độ hấp thụ khoảng 0,47 là phù hợp nên được lựa chọn.

Từ kết quả khảo sát trên, chúng tôi xây dựng quy trình định lượng Bromelain trong viên nén bao tan trong ruột theo đơn vị FIP như sau:

*Chuẩn bị thuốc thử:* theo mục 2.3.1.

*Chuẩn bị dung dịch chuẩn*

Hòa tan một lượng chuẩn Bromelain trong dung dịch

hoạt hóa enzym để thu được dung dịch có nồng độ khoảng 0,1 đơn vị FIP/ml.

*Chuẩn bị dung dịch thử*

Cân 20 viên đã loại bỏ vỏ bao, xác định khối lượng trung bình viên và nghiền thành bột mịn. Cân chính xác một lượng bột viên tương đương khoảng 100 đơn vị FIP Bromelain vào bình định mức dung tích 100 ml, thêm 60 ml dung dịch hoạt hóa enzym, lắc trong 15 phút, thêm dung dịch hoạt hóa enzym vừa đủ đến vạch, lắc đều, lọc. Hút chính xác 5,0 ml dịch lọc vào bình định mức 50 ml, thêm dung dịch hoạt hóa enzym vừa đủ đến vạch, lắc đều. Ngay trước khi sử dụng ổn định nhiệt độ của dung dịch ở 35 °C trong bể điều nhiệt.

*Quy trình phân tích*

Chuẩn bị 2 ống phản ứng cho mỗi dung dịch thử/ chuẩn như sau:

	Ống định lượng	Ống đối chứng
Dung dịch cơ chất Ổn định nhiệt độ ở 35 °C trong bể điều nhiệt	2,5 ml	2,5 ml
Dung dịch enzym (Dung dịch chuẩn hoặc dung dịch thử) Lắc đều, ủ chính xác 10 phút (xác định bằng đồng hồ bấm giây) ở 35 °C	2,5 ml	-
Dung dịch kết lắng Lắc đều, để yên 10 phút	5,0 ml	5,0 ml
Dung dịch enzym (Dung dịch chuẩn hoặc dung dịch thử)	-	2,5 ml

Tiếp tục để yên ở 35 °C trong 30 phút, hỗn hợp phản ứng được lọc qua giấy lọc. Đo độ hấp thụ của các dịch lọc ở 275 nm trong cốc đo dày 1 cm, mẫu trắng là nước cất.

*Tính kết quả*

Hàm lượng Bromelain trong chế phẩm (đơn vị FIP/viên) được tính theo công thức:

$$\text{Hàm lượng (đơn vị FIP/viên)} = \frac{(A_T - A_{DCT}) \times P_C \times HL_C \times f_T \times M_{TB}}{(A_C - A_{DCC}) \times f_C \times P_T} \times 100$$

Trong đó:  $P_C$   $P_T$  là khối lượng cân của mẫu chuẩn và mẫu thử (mg)

$HL_C$  là hoạt tính của chuẩn Bromelain (đơn vị FIP/mg)

$A_T$   $A_C$  là độ hấp thụ dịch lọc của ống thử và ống chuẩn

$A_{DCT}$   $A_{DCC}$  là độ hấp thụ dịch lọc của ống đối chứng thử và ống đối chứng chuẩn

$f_T$   $f_C$  là hệ số pha loãng của dung dịch thử và dung dịch chuẩn

$M_{TB}$  là khối lượng trung bình viên (mg)



### 3.2. Thẩm định quy trình định lượng

#### 3.2.1. Độ thích hợp của hệ thống

Chuẩn bị mẫu chuẩn Bromelain có nồng độ chính xác khoảng 0,1 đơn vị FIP/ml. Tiến hành theo quy trình xây dựng trên 6 ống nghiệm riêng biệt. Ghi lại độ hấp thụ dịch lọc của ống chuẩn và ống đối chứng chuẩn. Kết quả được trình bày trong Bảng 3.

**Bảng 3. Kết quả độ thích hợp hệ thống**

STT	A <sub>C</sub>	A <sub>DCC</sub>	A <sub>C</sub> - A <sub>DCC</sub>
1	0,4991	0,2164	0,2827
2	0,4989	0,2164	0,2825
3	0,4995	0,2166	0,2829
4	0,4999	0,2158	0,2841
5	0,5066	0,2160	0,2906
6	0,5065	0,2152	0,2913
<b>Trung bình</b>			<b>0,0906</b>
<b>RSD (%)</b>			<b>1,84</b>

Từ kết quả trong Bảng 3 cho thấy, RSD < 2,0 % → hệ thống quang phổ sử dụng phù hợp với quy trình phân tích.

#### 3.2.2. Độ đặc hiệu

Tiến hành quy trình định lượng với mẫu trắng (dung dịch hoạt hoá enzym), mẫu placebo, mẫu thử và mẫu

chuẩn, xác định chênh lệch độ hấp thụ giữa ống định lượng với ống đối chứng tương ứng với các mẫu trên. Kết quả được trình bày trong Bảng 4.

**Bảng 4. Kết quả độ đặc hiệu**

Stt	Tên dung dịch	Chênh lệch độ hấp thụ	% ảnh hưởng
1	Mẫu trắng	0,0003	
2	Mẫu placebo	0,0123	4,4 %
3	Mẫu chuẩn Bromelain	0,2857	-
4	Mẫu thử	0,3520	-

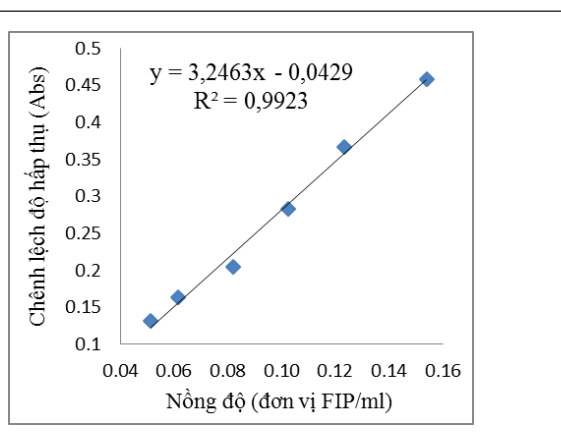
Từ kết quả trong Bảng 4 cho thấy, chênh lệch độ hấp thụ của mẫu chuẩn và mẫu thử có khác biệt rõ rệt với mẫu trắng và mẫu placebo, chênh lệch độ hấp thụ của mẫu trắng gần bằng 0. Ảnh hưởng của dung dịch placebo 4,4 % < 5,0 % → phương pháp phân tích đạt độ đặc hiệu.

#### 3.2.3. Độ tuyến tính

Đường chuẩn được xây dựng dựa vào 06 điểm chuẩn. Hàm lượng chuẩn trong mỗi điểm chuẩn tương ứng 50 %, 60 %, 100 %, 120 % và 160 % của nồng độ định lượng (0,1 đơn vị FIP/ml). Tiến hành theo quy trình định lượng, xác định chênh lệch độ hấp thụ giữa ống chuẩn với ống đối chứng chuẩn tại các điểm chuẩn. Kết quả được trình bày trong Bảng 5.

**Bảng 5. Kết quả độ tuyến tính**

STT	Nồng độ Bromelain (đơn vị FIP/ml)	A <sub>C</sub> - A <sub>DCC</sub>
1	0,0513	0,1311
2	0,0616	0,1641
3	0,0821	0,2052
4	0,1027	0,2826
5	0,1232	0,3671
6	0,1540	0,4586
Phương trình hồi quy: $y = 3,2463x - 0,0429$ Hệ số tương quan: $r = 0,9961$		



Từ kết quả Bảng 5 cho thấy, trong khoảng nồng độ từ 0,05 đến 0,15 FIP/ml có sự tương quan tuyến tính giữa chênh lệch độ hấp thụ ống định lượng và ống đối chứng với nồng độ chất phân tích có hệ số tương quan  $r = 0,9961$  (> 0,99), phù hợp với phương pháp định lượng các chất có nguồn gốc sinh học [6].

#### 3.2.4. Độ đúng

Chuẩn bị các mẫu tự tạo bằng cách thêm chuẩn Bromelain vào placebo ở 3 nồng độ 80 %, 100 % và 140 %. Mỗi nồng độ tiến hành trên 3 mẫu độc lập. Tiến hành theo quy trình xây dựng và xác định chênh lệch độ hấp thụ của ống phản ứng và ống đối chứng của các mẫu tự tạo trên. Kết quả được ghi lại trong Bảng 6.

**Bảng 6. Kết quả thẩm định độ đúng**

STT	Nồng độ	Khối lượng placebo (mg)	Nồng độ thêm vào (đơn vị FIP/ml)	$A_T - A_{ĐC}$	Nồng độ tìm lại (đơn vị FIP/ml)	% thu hồi	Thống kê
1.	80%	55,45	0,0795	0,2194	0,0770	96,9	TB = 98,7 % RSD = 2,17 %
2.	80%	55,57	0,0802	0,2310	0,0811	101,1	
3.	80%	55,57	0,0798	0,2234	0,0784	98,3	
4.	100%	55,44	0,0993	0,2825	0,0991	99,8	TB = 101,3 % RSD = 1,65 %
5.	100%	55,52	0,1002	0,2887	0,1013	101,1	
6.	100%	55,16	0,0997	0,2930	0,1028	103,1	
7.	140%	55,57	0,1391	0,4065	0,1426	102,6	TB = 104,3 % RSD = 1,54 %
8.	140%	56,16	0,1403	0,4187	0,1469	104,7	
9.	140%	55,60	0,1396	0,4205	0,1476	105,7	
Trung bình (n = 9)							101,4 %
RSD (n = 9)							2,84 %

Từ kết quả trong Bảng 6 cho thấy, % thu hồi từ 98,7 % đến 104,3 % và RSD < 10,0 % → phù hợp với phương pháp định lượng các chất có nguồn gốc sinh học [6].

### 3.2.5. Độ chính xác

- Độ lặp lại

Định lượng Bromelain trong viên nén bao tan trong ruột Brosafe trên 6 dung dịch thử riêng biệt được

chuẩn bị theo mục 3.1.3. Kết quả được trình bày trong Bảng 7.

- Độ chính xác trung gian

Tiến hành tương tự như độ lặp lại nhưng do kiểm nghiệm viên khác thực hiện trên cùng một thiết bị máy quang phổ UV – VIS nhưng khác ngày. Kết quả được trình bày trong Bảng 7.

**Bảng 7. Kết quả độ chính xác**

STT	Kiểm nghiệm viên 1 (độ lặp lại)			Kiểm nghiệm viên 2		
	$m_{thử}$ (mg)	$A_T - A_{ĐC}$	Hàm lượng (%)	$m_{thử}$ (mg)	$A_T - A_{ĐC}$	Hàm lượng (%)
1	243,9	0,3520	121,0	243,1	0,3451	121,3
2	241,1	0,3528	122,7	245,7	0,3486	121,2
3	243,9	0,3609	123,8	243,9	0,3504	122,7
4	244,3	0,3588	122,9	241,5	0,3395	120,1
5	242,2	0,3545	122,7	243,3	0,3487	122,4
6	241,2	0,3552	123,4	243,8	0,3409	119,4
Trung bình = 122,7 %; RSD = 0,76% (n = 6)			Trung bình = 121,2 %; RSD = 1,05 % (n = 6)			
Trung bình = 122,0 %; RSD = 1,10 % (n = 12)						

Từ kết quả trong Bảng 7 cho thấy, RSD của độ lặp lại và độ chính xác trung gian < 10 % đạt yêu cầu của phương pháp định lượng các chất có nguồn gốc sinh học [6].

### 3.3. Ứng dụng phân tích mẫu

Áp dụng quy trình đã xây dựng để xác định hoạt tính Bromelain trong 2 mẫu chế phẩm khác là viên nén bao

phim tan trong ruột Bromanase (Bromelain 50 FIP), số lô: 215822, ngày sản xuất: 20/01/2022, hạn dùng: 21/01/2025, nơi sản xuất: Công ty cổ phần dược Trung ương Mediplantex và mẫu viên nén bao phim tan trong ruột Amanase (Bromelain 50 FIP), số lô: NC05, ngày sản xuất: 18/06/2022, hạn dùng: 06/2025, nơi sản xuất: Công

ty TNHH MTV 120 ARMEPHACO thu được kết quả theo Bảng 8.

**Bảng 8.** Kết quả áp dụng quy trình phân tích mẫu

STT	% Hàm lượng so với nhãn	
	<i>Amanase (%)</i>	<i>Bromanase (%)</i>
1	104,6	103,9
2	104,3	107,7
3	105,3	104,2
<b>Trung bình</b>	<b>104,7</b>	<b>105,3</b>

Từ kết quả Bảng 8 cho thấy, có thể áp dụng quy trình đã xây dựng để định lượng Bromelain theo đơn vị FIP trong các chế phẩm viên nén bao tan trong ruột.

### 3.4 Bàn luận

Phương pháp xác định hoạt tính Bromelain theo đơn vị FIP của viên nén bao tan trong ruột bản chất là quá trình xúc tác phản ứng thủy phân cơ chất casein thành các acid amin như tyrosin, alanin... nhưng chủ yếu là tyrosin, trong cấu trúc phân tử tyrosin có nhân thơm nên có thể hấp thụ ánh sáng tử ngoại vì vậy lựa chọn phương pháp quang phổ hấp thụ UV -VIS để xác định hoạt tính Bromelain trong chế phẩm là phù hợp [3]. Quy trình phân tích đơn giản, thời gian phân tích nhanh (khoảng 2 – 2,5 giờ bao gồm cả thời gian pha dung môi hóa chất và tính toán kết quả), sử dụng các hóa chất, thiết bị, dụng cụ cơ bản trong phòng thí nghiệm đồng thời dung dịch chuẩn được tiến hành song song với dung dịch thử nên loại trừ được các sai số trong quá trình thử nghiệm, tuy nhiên hoạt động của

enzym vẫn bị ảnh hưởng bởi nhiều yếu tố khác nhau như nồng độ enzym, pH, nhiệt độ môi trường, thời gian phản ứng, nồng độ cơ chất, các chất ức chế, các chất hoạt hóa [8], nên trong quá trình phân tích cần phải thực hiện cẩn thận và chính xác các bước để giảm thiểu sai số có thể xảy ra. Kết quả thẩm định cho thấy quy trình phân tích đạt độ chính xác cao, đáng tin cậy. Chính những ưu điểm trên, phương pháp xác định hoạt tính Bromelain theo đơn vị FIP có khả năng ứng dụng được trong nhiều phòng thí nghiệm khác nhau, có thể làm tài liệu tham khảo cho các công ty Dược trong quá trình xây dựng và phát triển các sản phẩm thuốc chứa hoạt chất Bromelain và ứng dụng quy trình xây dựng để kiểm soát chất lượng các chế phẩm viên nén chứa Bromelain theo đơn vị FIP trên thị trường.

### 4. KẾT LUẬN

Qua tham khảo tài liệu và khảo sát thực nghiệm, chúng tôi đã thiết lập được quy trình định lượng Bromelain theo đơn vị FIP trong chế phẩm viên nén bao tan trong ruột dựa trên phản ứng xúc tác thủy phân cơ chất của enzym kết hợp kỹ thuật quang phổ hấp thụ tử ngoại UV - VIS. Kết quả thẩm định quy trình phân tích cho thấy: phương pháp có khoảng tuyến tính rộng (từ 0,05 – 0,15 đơn vị FIP/ml); độ đúng từ 98,7 % đến 104,3 %, độ chính xác cao, đáp ứng được yêu cầu của phương pháp phân tích enzym. Quy trình phân tích đưa ra hoàn toàn phù hợp để định lượng Bromelain trong chế phẩm viên nén bao tan trong ruột Brosafe và có thể áp dụng để định lượng hoạt chất này trong các chế phẩm viên nén bao tan trong ruột khác có chứa Bromelain.

### TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Arka jyoti Chakraborty et al. (2021), Bromelain a potential bioactive compound: A comprehensive overview from a pharmacological perspective, *Life (basel)*. 2021 Apr, 11(4):317.
2. Alison Brayfield (2017), Martindale: Drug monographs, *Pharmaceutical Press*, 39, pp.2499
3. Đoàn Cao Sơn (2010), *Nghiên cứu xây dựng phương pháp xác định hoạt tính của 2 chế phẩm thuốc chứa enzyme*, Báo cáo đề tài cấp Bộ, Bộ Y tế.
4. Phạm Thị Thu Trang (2020), *Xây dựng phương pháp định lượng Bromelain trong viên nén*, Khóa luận Dược sĩ đại học, Trường Đại học Dược Hà Nội.
5. ICH (2005), *Validation of analytical procedures: "Text and methodology Q2 (R1)"*
6. U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research Center for Veterinary Medicine (2018), *Bioanalytical Method Validation Guidance for Industry*.
7. Alber Lauwers, Simon Scharpe (1997), *Pharmaceutical enzymes*, *CRC Press*, 84, pp.365 – 368
8. Tạ Thành Văn (2011), *Hóa sinh*, NXB Y học, tập 1, tr.21 – 22.