

Định lượng acid amin trong dung dịch nuôi ăn tĩnh mạch bằng kỹ thuật sắc ký lỏng hiệu năng cao

Hoàng Thùy Linh¹, Lê Quan Nghiệm², Nguyễn Đức Tuấn^{2*}

¹Viện Pasteur TP. Hồ Chí Minh

²Khoa Dược, Đại học Y Dược Thành phố Hồ Chí Minh

Summary

Amino acids are indispensable ingredients in parenteral nutrition solutions, especially for preterm infants. The parenteral nutrition solution with main ingredients including glucose, amino acids, micronutrients, and electrolytes, is indicated as a combining prescription in nearly 50% of clinical departments at Pediatrics' Hospital 2 at Ho Chi Minh City in which energy is provided mostly from two groups of carbohydrates and amino acids. However, it is complicated to quantify each amino acid component in the mixture. There are some studies applying inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS), high-performance liquid chromatography (HPLC) to quantify amino acids - in which, HPLC is the most commonly used method. However, the results of method validation were often not fully reported, or these procedures excluded cysteine - an essential amino acid for preterm infants. In Vietnam, the parenteral nutrition solution has been prescribed routinely in many hospitals without a standard method for quantifying each amino acid component. Therefore, this study was conducted to develop and validate the reverse HPLC method for the quantitation of 19 essential amino acids. Photo diode array (PDA) detector combining the pre-column derivative formation with the FMOC-Cl reagent, and fluorescence detector (FLD) combining the pre-column derivative formation with OPA and FMOC-Cl ones were used for quantification of cysteine and the remaining amino acids, respectively, with a different chromatographic condition for each procedure. The validation result showed that the developed methods have desirable selectivity; good sensitivity; high precision ($RSD \leq 2\%$), satisfactory accuracy with a recovery rate from 98% to 102% ($RSD \leq 2\%$). The methods were applied for analysis of amino acids in the studied parenteral feeding solution. The percentage amount of each amino acid was in the range of 90-110% compared to the label.

Keywords: Amino acid, parenteral nutrition solution, HPLC.

Đặt vấn đề

Acid amin là thành phần chính cấu thành protein, xây dựng cấu trúc của cơ thể và cần thiết cho các hoạt động sống hàng ngày [1]. Đây là thành phần không thể thiếu trong các dung dịch nuôi ăn tĩnh mạch, đặc biệt trong các chế phẩm nuôi ăn cho trẻ sơ sinh hoặc sinh non [2]. Dung dịch nuôi ăn tĩnh mạch được chỉ định như một thuốc phối hợp theo đơn trong gần 50% các khoa lâm sàng tại cơ sở thực hiện nghiên cứu – Bệnh viện Nhi đồng 2 Thành phố Hồ Chí Minh, với các thành phần chính gồm glucose, acid amin, các yếu tố vi lượng và các chất điện giải [3]. Cụ thể, hỗn hợp dung dịch nuôi ăn tĩnh mạch

được chỉ định nhiều nhất tại Bệnh viện có thành phần gồm glucose 10%, glucose 30%, NaCl 10%, KCl 10%, CaCl₂ 10%, MgSO₄ 15% và dung dịch Vaminolact bao gồm 19 acid amin thiết yếu. Trong đó, năng lượng được cung cấp chủ yếu từ hai nhóm carbohydrat và acid amin. Nhưng khác với glucose, có thể gián tiếp kiểm tra sự đáp ứng và nhu cầu của bệnh nhi qua thử nghiệm đường huyết, nhu cầu acid amin của trẻ và việc định lượng từng thành phần acid amin trong hỗn hợp là rất phức tạp [4]. Trên thế giới, cũng đã có các nghiên cứu áp dụng phương pháp quang phổ phát xạ plasma, sắc ký lỏng hiệu năng cao (**HPLC**) và nhiều phương pháp phân tích khác để định lượng acid amin [4-7], trong đó, **HPLC** là phương pháp thường được áp dụng nhất. Tuy nhiên, kết quả thẩm định quy trình định lượng thường không được báo cáo đầy đủ hoặc chưa có quy trình định lượng cystein trong dung dịch nuôi ăn tĩnh mạch – một acid amin thiết yếu cho trẻ sinh non [4, 7, 8].

Chịu trách nhiệm: Nguyễn Đức Tuấn

Email: ductuan@ump.edu.vn

Ngày nhận: 05/5/2021

Ngày phân biện: 26/5/2021

Ngày duyệt bài: 24/8/2021

Tại Việt Nam, mặc dù tính đến thời điểm hiện tại, việc phối trộn các thành phần dinh dưỡng để tạo thành hỗn hợp nuôi ăn đã trở nên phổ biến và được áp dụng thường quy tại nhiều bệnh viện nhưng vẫn chưa có một quy trình hay phương pháp chuẩn định lượng từng thành phần acid amin. Vì vậy, nghiên cứu này được thực hiện với mục đích là định lượng các acid amin thiết yếu, bao gồm cystein, trong dung dịch

nuôi ăn tĩnh mạch bằng phương pháp **HPLC**.

Nguyên vật liệu và phương pháp

Nguyên vật liệu

Dung dịch nuôi ăn tĩnh mạch

Dung dịch nuôi ăn tĩnh mạch pha chế theo đơn được chỉ định nhiều nhất tại cơ sở nghiên cứu – Bệnh viện Nhi Đồng 2 Thành phố Hồ Chí Minh.

Bảng 1. Công thức pha chế dung dịch nuôi ăn tĩnh mạch

Thành phần	Thể tích (ml)	Hàm lượng nhãn (g)
Dung dịch tiêm truyền glucose 10%	200	20
Dung dịch tiêm truyền glucose 30%	80	24
Dung dịch tiêm truyền natri clorid 10%	12	1,2
Dung dịch tiêm kali clorid 10%	8	0,8
Dung dịch tiêm calci clorid 500 mg/5 ml	4	0,4
Dung dịch tiêm magnesi sulfat 15%	4	0,6
Dung dịch tiêm truyền Vaminolact 6,5%	120	*
Tổng	428	

*Thành phần và hàm lượng cho 100 ml: L-alanin (0,63 g), L-histidin (0,21 g), L-arginin (0,41 g), L-isoleucin (0,31 g), L-acid aspartic (0,41 g), L-leucin (0,70 g), L-cystein/cystin (0,10 g), L-threonin (0,36 g), L-serin (0,38 g), L-tryptophan (0,14 g), taurin (0,03 g), L-tyrosin (0,05 g), L-valin (0,36 g), L-lysin (0,56 g), L-methionin (0,13 g), L-phenylalanin (0,27 g), L-acid glutamic (0,71 g), glycin (0,21 g), L-prolin (0,56 g).

Các thành phần pha chế dung dịch nuôi ăn tĩnh mạch đều được phép lưu hành tại Việt Nam và vẫn còn hạn dùng trên 12 tháng tại thời điểm nghiên cứu.

Chất chuẩn đối chiếu

Danh mục các acid amin chuẩn đối chiếu được ghi trong bảng 2.

Bảng 2. Danh mục các acid amin chuẩn đối chiếu

STT	Acid amin	Nhà sản xuất	Số lô	Hàm lượng tính trên nguyên trạng (%)
1	L-alanin	Viện Kiểm nghiệm thuốc Thành phố Hồ Chí Minh	QT302 010718	99,0
2	L-histidin		QT308 010718	99,7
3	L-arginin HCl		QT303 021119	99,9
4	L-isoleucin		QT309 010718	99,7
5	L-leucin		QT310 010718	99,4
6	L-threonin		QT316 010518	99,4
7	L-serin		QT315 011018	99,7
8	L-tyrosin		QT088 100916	99,4
9	L-valin		QT318 011118	99,9
10	L-lysin HCl		QT311 020819	99,6
11	L-methionin		QT312 011118	99,6
12	L-cystein HCl		QT199 031118	90,0
13	L-acid aspartic		A9256	98,0
14	Taurin	Sigma - Aldrich	86330	99,0
15	Acid aminobutyric (nội chuẩn)		BCBV0838	99,0%
16	L-tryptophan	Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương	0100060	99,8
17	L-phenyl alanin		0100070	99,5
18	L-acid glutamic		49449	99,5
19	Glycin		0100068	99,6
20	L-prolin		0100083	99,9

Trang thiết bị

Máy sắc ký lỏng hiệu năng cao SHIMADZU UFLC 20A với đầu dò PDA, đầu dò huỳnh quang, cân phân tích điện tử Mettler Toledo AT200, máy đo pH Mettler Toledo S20 SevenEasy™. Các thiết bị phân tích và dụng cụ phân tích đã được hiệu chuẩn đạt quy định theo GLP và ISO/IEC 17025.

Dung môi, thuốc thử, hóa chất

Acid sulfuric, acid boric, natri hydroxyd, n-hexan, natri dihydrophosphat, acid hydrochloric, natri tetraborat decahydrat, ortho-phthalaldehyd (OPA) và 9 - fluorenylmethyl cloroformat (FMOC-Cl) đạt tiêu chuẩn phân tích; methanol và acetonitril đạt tiêu chuẩn sắc ký lỏng.

Phương pháp nghiên cứu

Dựa vào một số tài liệu tham khảo và dung dịch nuôi ăn tĩnh mạch trong nghiên cứu gồm nhiều thành phần, trong đó thành phần acid amin có nồng độ thấp nên kỹ thuật **HPLC** pha đảo đã được lựa chọn, sử dụng đầu dò dây diod quang (PDA) kết hợp với việc tạo dẫn chất trước cột với thuốc thử FMOC-Cl để định lượng cystein^[9] và đầu dò huỳnh quang (FLD) kết hợp với việc tạo dẫn chất trước cột với thuốc thử OPA và FMOC-Cl để định lượng các acid amin còn lại^[4, 6, 7, 10]. Trong quá trình thực nghiệm, các điều kiện sắc ký ảnh hưởng đến hiệu quả tách của phương pháp đã được khảo sát như tỷ lệ dung môi pha động, chương trình rửa giải đẳng dòng và gradient, nhiệt độ cột, bước sóng phát hiện và tốc độ dòng. Điều kiện sắc ký được lựa chọn sao cho các chất phân tích tách hoàn toàn với độ phân giải lớn hơn 1,5 và hệ số bất đối của các chất phân tích trong khoảng 0,8 - 1,5. Sau khi xác định điều kiện sắc ký thích hợp, tiến hành thẩm định quy trình theo hướng dẫn của ICH bao gồm khảo sát tính phù hợp của hệ thống, tính chọn lọc, tính tuyến tính và khoảng xác định, độ chính xác và độ đúng^[11].

Thuốc thử OPA khi có mặt một hợp chất thiol như 2-mercaptoethanol hoặc acid 3-mercaptopropionic sẽ tác dụng với các acid amin bậc nhất để cho một hợp chất isoindol phát huỳnh quang mạnh. Bản thân thuốc thử OPA không phát huỳnh quang nên không gây trở ngại. Mặt khác, vì OPA dễ tan và ổn định

trong nước đồng thời cho phản ứng nhanh nên có thể tạo dẫn chất và phân tích mẫu thử một cách tự động, dùng thiết bị tự nạp mẫu thử để trộn lẫn mẫu thử với thuốc thử. Tuy nhiên, OPA không phản ứng với các amin bậc 2, nên để định lượng các acid amin có nhóm chức amin bậc 2 như prolin, cần phối hợp với kỹ thuật tạo dẫn chất trước cột với thuốc thử FMOC-Cl. Thuốc thử FMOC-Cl tác dụng với acid amin bậc 1 và acid amin bậc 2 để tạo thành các dẫn chất phát huỳnh quang mạnh^[10].

Chuẩn bị mẫu

Định lượng cystein trong dung dịch nuôi ăn tĩnh mạch bằng HPLC-PDA

Mẫu chuẩn gốc: Cân chính xác khoảng 15,6 mg cystein chuẩn đối chiếu vào bình định mức 50 ml, thêm 10 ml nước, lắc cho tan hoàn toàn, thêm nước đến vạch, lắc đều.

Mẫu chuẩn: Hút chính xác 10 ml dung dịch chuẩn gốc, cho vào bình định mức 100 ml, thêm nước cất đến vạch, lắc đều.

Mẫu thử: Pha loãng 10 ml chế phẩm thành 100 ml bằng nước cất.

Mẫu placebo: Chuẩn bị như mẫu thử, thay thế chế phẩm bằng placebo (không chứa hỗn hợp acid amin).

Mẫu trắng: Nước.

Dung dịch đệm borat: Cân 6 g acid boric, hòa tan trong 100 ml nước, chỉnh pH về 6,5 bằng dung dịch NaOH 10 N. Thuốc thử **FMOC-Cl:** cân chính xác khoảng 50 mg FMOC-Cl, hòa tan trong 10 ml acetonitril.

Xử lý mẫu: Hút 100 µl mẫu chuẩn/thử/placebo/trắng vào ống nghiệm, thêm 400 µl dung dịch đệm borat, lắc đều 30 giây, thêm 500 µl dung dịch FMOC-Cl, lắc xoáy 30 giây, thêm 4 ml n-hexan, lắc xoáy 1 phút, để yên 5 phút cho tách lớp, lấy dung dịch bên dưới, lọc qua màng lọc 0,22 µm.

Định lượng các acid amin còn lại trong dung dịch nuôi ăn tĩnh mạch bằng HPLC-FLD

Dung dịch nội chuẩn: Cân chính xác khoảng 26,5 mg acid aminobutyric vào bình định mức 50 ml, thêm nước cất vừa đủ đến vạch, lắc đều.

Dung dịch chuẩn gốc: Cân chính xác từng acid amin chuẩn và hòa tan bằng dung dịch HCl 0,1 N theo bảng dưới đây:

Bảng 3. Nồng độ các acid amin trong dung dịch chuẩn gốc

STT	Acid amin	Nồng độ (mg/ml)	STT	Acid amin	Nồng độ (mg/ml)
1	L-acid aspartic	1,168	10	L-valin	0,942
2	L-acid glutamic	1,996	11	L-methionin	0,370
3	L-serin	1,057	12	Taurin	0,093
4	L-histidin	0,615	13	L-tryptophan	0,398

5	L-threonin	1,012	14	L-phenylalanin	0,757
6	L-arginin	1,191	15	L-isoleucin	0,883
7	L-alanin	1,772	16	L-leucin	2,007
8	L-tyrosin	0,145	17	L-lysin	1,695
9	Glycin	0,585	18	L-prolin	1,561

Hỗn hợp chuẩn: Hút chính xác một thể tích các dung dịch chuẩn gốc theo bảng dưới đây, cho vào bình định mức 100 ml, thêm 2 ml dung dịch chuẩn nội và thêm nước đến vạch, lắc đều, lọc qua màng lọc 0,22 µm.

Bảng 4. Nồng độ các acid amin trong hỗn hợp chuẩn

STT	Dung dịch chuẩn gốc	Nồng độ (mg/ml)	STT	Dung dịch chuẩn gốc	Nồng độ (mg/ml)
1	L-acid aspartic	0,0117	11	L-methionin	0,0037
2	L-acid glutamic	0,0200	12	Taurin	0,0009
3	L-serin	0,0106	13	L-tryptophan	0,0040
4	L-histidin	0,0062	14	L-phenylalanin	0,0076
5	L-threonin	0,0101	15	L-isoleucin	0,0088
6	L-arginin	0,0119	16	L-leucin	0,0201
7	L-alanin	0,0177	17	L-lysin	0,0170
8	L-tyrosin	0,0015	18	L-prolin	0,0156
9	Glycin	0,0058	19	Acid aminobutyric (nội chuẩn)	0,0058
10	L-valin	0,0094			

Mẫu thử: Hút chính xác 2 ml chế phẩm vào bình định mức 200 ml, thêm 20 ml dung dịch HCl 0,1 N và 2 ml dung dịch chuẩn nội, thêm nước đến vạch, lắc đều, lọc qua màng lọc 0,22µm

Mẫu placebo: chuẩn bị như mẫu thử, thay thể chế phẩm bằng placebo (không chứa hỗn hợp acid amin).

Dung dịch đệm borat: Cân 1,9 g natri tetraborat decahydrat vào bình định mức 50 ml, thêm 25 ml nước, lắc đều cho tan hết, thêm nước tới vạch, lắc đều và điều chỉnh pH đến 10,2 bằng dung dịch NaOH 10 N.

Thuốc thử OPA: Cân chính xác khoảng 20 mg OPA, thêm 300 µl ethanol, siêu âm khoảng 1 - 2 phút, thêm 17 µl acid 3-mercaptopropionic và 1,68 ml dung dịch đệm borat, lắc đều.

Thuốc thử FMOC-Cl: Cân chính xác khoảng 25 mg FMOC-Cl vào bình định mức 10 ml, thêm 5 ml acetonitril, lắc đều, siêu âm cho tan hết, thêm acetonitril đến vạch, lắc đều.

Xử lý mẫu: Hút riêng biệt 50 µl hỗn hợp chuẩn/mẫu thử/placebo vào ống nghiệm, thêm 100 µl thuốc thử OPA, lắc xoáy 2 phút, thêm 50 µl thuốc thử FMOC-Cl, lắc 1 phút, thêm chính xác 550 µl nước, lắc đều, lọc qua màng lọc 0,22 µm.

Kết quả

Các kết quả thực nghiệm đã xác định được điều kiện sắc ký thích hợp để định lượng cystein và các acid amin còn lại trong dung dịch nuôi cấy tĩnh mạch, được thể hiện trong bảng 5.

Bảng 5. Điều kiện sắc ký để định lượng cystein và các acid amin khác

Điều kiện sắc ký	Định lượng cystein bằng HPLC-PDA	Định lượng acid amin khác bằng HPLC-FLD
Cột sắc ký	Gemini C18 (150 x 4,6 mm; 5 µm)	Gemini C18 (250 x 4,6 mm; 5 µm)
Pha động	Dung dịch acid sulfuric 0,1% và hỗn hợp acetonitril - nước (9:1), rửa giải gradient: 0'(25:75), 3'(25:75), 5'(14:86), 8'(14:86), 10'(2:98), 15'(2:98), 15,1'(25:75), 25'(25:85)	Dung dịch NaH ₂ PO ₄ pH 7,8 và hỗn hợp methanol - acetonitril - nước (45:45:10), rửa giải gradient: 0'(95:5), 35'(56,5:43,5), 50'(20:80), 51'(0:100), 60'(0:100), 61'(95:5), 70'(95:5)
Tốc độ dòng		1,5 ml/phút
Nhiệt độ cột	25°C	28°C
Bước sóng phát hiện	286 nm	Gradient bước sóng kích thích và phát xạ theo thời gian: 0 - 40,5'(340 - 450 nm), 40,6 - 54'(266 - 310 nm), 55 - 70'(340 - 450 nm)
Thể tích tiêm mẫu		10 µl

**Thẩm định quy trình định lượng cystein
Tính phù hợp của hệ thống**

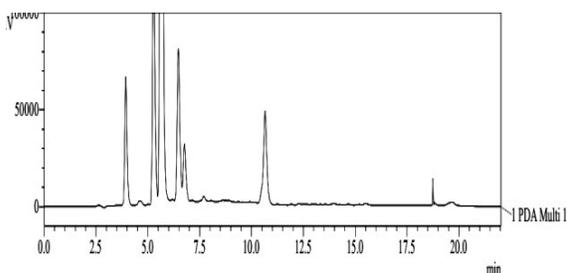
Bảng 6. Kết quả khảo sát tính phù hợp của hệ thống trên mẫu chuẩn (n = 6)

	Thời gian lưu (phút)	Diện tích pic ($\mu V \times \text{giây}$)	Hệ số bất đối	Số đĩa lý thuyết biểu kiến
Trung bình	7,806	719097	1,29	9986
RSD (%)	0,11	0,32	1,99	2,00

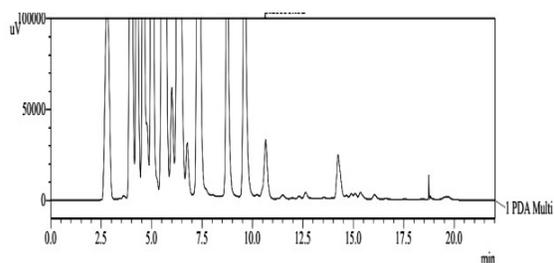
Nhận xét: Kết quả khảo sát cho thấy giá trị RSD của thời gian lưu, diện tích pic và số đĩa lý thuyết biểu kiến không quá 2%; hệ số bất đối

của cystein nằm trong khoảng 0,8 – 1,5. Như vậy, quy trình đạt tính phù hợp của hệ thống.

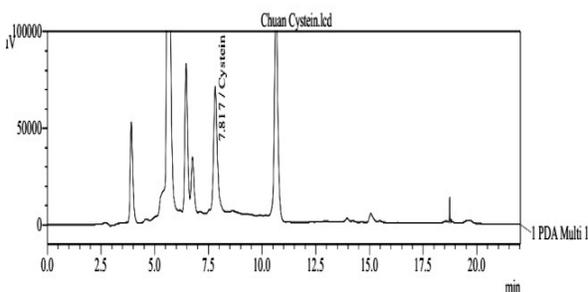
Tính chọn lọc



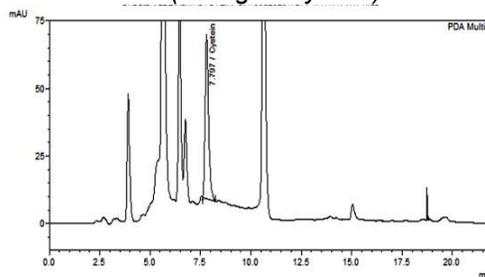
**Hình 1. Sắc ký đồ mẫu placebo
(không có hỗn hợp acid amin)**



**Hình 2. Sắc ký đồ mẫu placebo
(không có cystein)**



Hình 3. Sắc ký đồ mẫu chuẩn



Hình 4. Sắc ký đồ mẫu thử

Kết quả khảo sát tính chọn lọc cho thấy trong cùng điều kiện phân tích: Sắc ký đồ mẫu placebo không xuất hiện pic ở trong khoảng thời gian lưu tương ứng với thời gian lưu của cystein trong sắc ký đồ mẫu chuẩn, sắc ký đồ mẫu thử xuất hiện pic có thời gian lưu tương đương với cystein trong sắc ký đồ mẫu chuẩn, khi thêm mẫu chuẩn cystein vào mẫu thử có sự tăng lên

về chiều cao và diện tích pic có thời gian lưu tương ứng với thời gian lưu của cystein trong mẫu chuẩn. Như vậy quy trình có tính chọn lọc. Hình 1 đến 4 minh họa sắc ký đồ các mẫu phân tích khi khảo sát tính chọn lọc.

Khoảng tuyến tính, độ chính xác, độ đúng

Kết quả khảo sát khoảng tuyến tính, độ chính xác và độ đúng được tóm tắt trong bảng 7.

Bảng 7. Kết quả khảo sát khoảng tuyến tính, độ chính xác và độ đúng

Phương trình hồi quy	$\hat{y} = 26046908x$			
Khoảng tuyến tính	0,022 – 0,034 mg/ml			
Hệ số tương quan	$r = 0,9971$			
Độ chính xác	Độ lặp lại (n = 6)		Độ chính xác trung gian (n = 12)	
	% cystein so với nhãn	RSD %	% cystein so với nhãn	RSD %
	104,91	0,33	104,72	0,45
Độ đúng (n = 9)	Tỷ lệ thu hồi (%)			RSD %
	99,99 – 100,41			0,15

Nhận xét: Phương pháp định lượng đạt tính tuyến tính với khoảng nồng độ khảo sát của cystein từ 0,022 – 0,034 mg/ml, giá trị $r > 0,995$. Giá trị RSD của hàm lượng phần trăm so với nhãn của cystein tương ứng với độ lặp lại và độ chính xác trung gian đều không quá 2%. Tỷ lệ thu hồi của cystein ở 3 mức nồng độ 80, 100 và 120% của nồng độ định lượng đều nằm trong khoảng 98 – 102% với RSD không quá 2%. Từ kết quả khảo sát độ chính xác, hàm lượng

phần trăm cystein so với hàm lượng ghi trên nhãn là 104,72%.

Như vậy, quy trình định lượng cystein trong dung dịch nuôi ăn tĩnh mạch bằng phương pháp **HPLC-PDA** đạt yêu cầu về tính phù hợp của hệ thống, có tính chọn lọc, khoảng xác định rộng, đạt độ chính xác và độ đúng.

Thẩm định quy trình định lượng acid amin còn lại
Tính phù hợp của hệ thống

Bảng 8. Kết quả khảo sát tính phù hợp của hệ thống (n = 6)

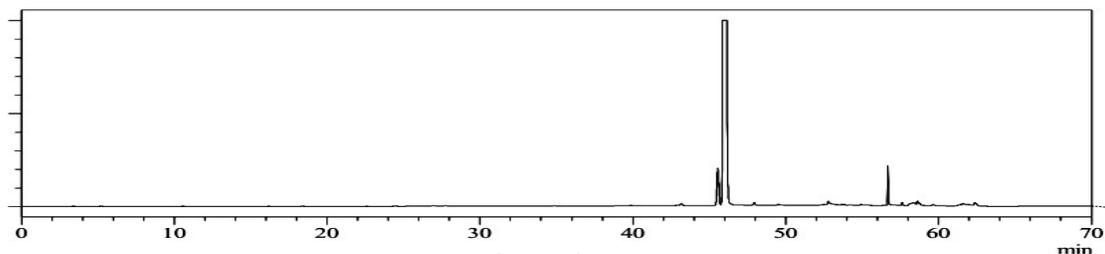
STT	Acid amin	Tỷ số AS/IS	RSD (%)	Thời gian lưu (phút)	RSD (%)
1	L-acid aspartic	1,360767	0,23	3,344	0,16
2	L-acid glutamic	2,242026	0,39	5,098	0,20
3	L-serin	1,481231	1,47	10,328	0,17
4	L-histidin	0,361705	0,94	12,875	0,15
5	L-threonin	1,398786	1,46	14,157	0,17
6	L-arginin	1,218165	0,79	15,909	0,11
7	L-alanin	3,027078	1,15	18,049	0,15
8	L-tyrosin	0,153676	0,69	22,146	0,12
9	Nội chuẩn	1,000000	0,00	23,144	0,13
10	Glycin	1,667068	1,07	25,071	0,09
11	L-valin	1,910967	0,61	27,343	0,09
12	L-methionin	0,382617	0,34	28,275	0,09
13	Taurin	0,101436	1,80	30,174	0,08
14	L-tryptophan	0,355075	0,50	31,211	0,08
15	L-phenylalanin	0,973308	0,63	31,928	0,08
16	L-isoleucin	1,552073	0,75	32,326	0,09
17	L-leucin	3,276389	0,63	34,402	0,08
18	L-lysin	1,740774	0,79	39,453	0,04
19	L-prolin	0,651527	1,08	42,520	0,04

Nhận xét: Kết quả khảo sát cho thấy giá trị RSD của thời gian lưu và tỷ số diện tích pic chất phân tích so với nội chuẩn (AS/IS) không quá 2%. Như vậy, quy trình đạt tính phù hợp của hệ thống.

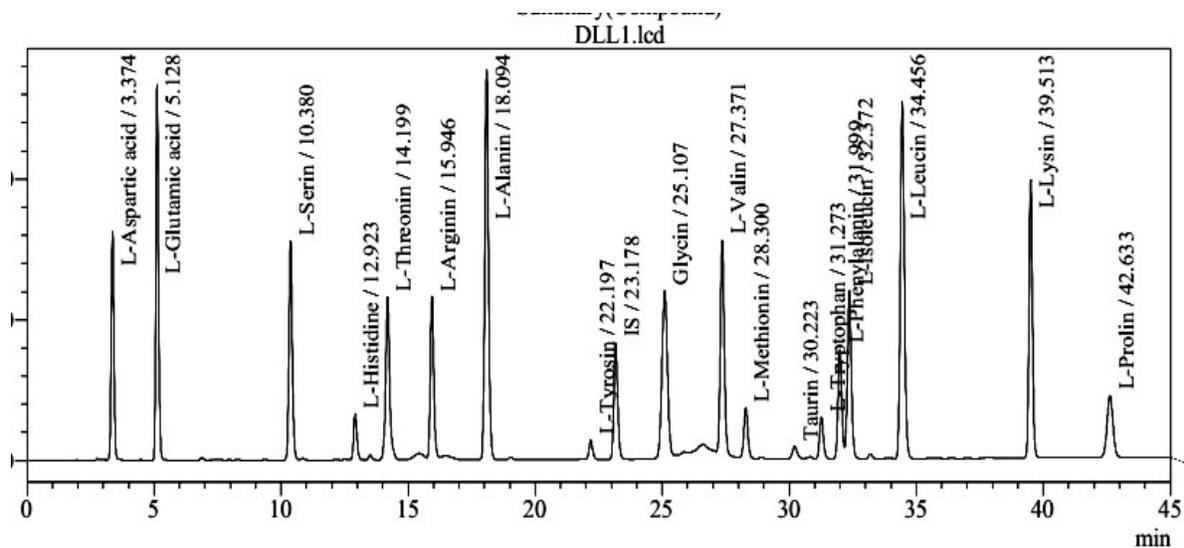
Tính chọn lọc

Kết quả khảo sát tính chọn lọc cho thấy trong cùng điều kiện phân tích: Sắc ký đồ mẫu placebo không xuất hiện pic ở trong khoảng thời gian lưu tương ứng với thời gian lưu của các pic chất phân tích và nội chuẩn trong sắc ký đồ

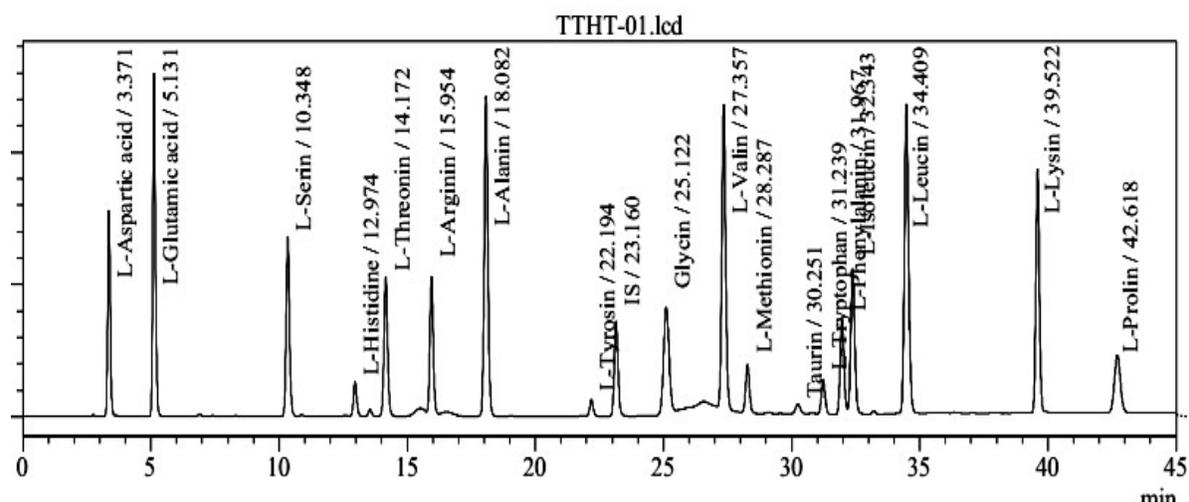
hỗn hợp chuẩn; sắc ký đồ mẫu thử xuất hiện các pic có thời gian lưu tương đương với pic của chất chuẩn trong sắc ký đồ hỗn hợp chuẩn; trên sắc ký đồ mẫu thử, các pic chất phân tích và nội chuẩn tách hoàn toàn; khi thêm chuẩn vào mẫu thử có sự tăng lên về chiều cao và diện tích các pic có thời gian lưu tương ứng với thời gian lưu của các pic trong hỗn hợp chuẩn. Như vậy quy trình có tính chọn lọc. Hình 5 đến 7 minh họa sắc ký đồ các mẫu phân tích khi khảo sát tính chọn lọc.



Hình 5. Sắc ký đồ mẫu placebo



Hình 6. Sắc ký đồ mẫu thử



Hình 7. Sắc ký đồ hỗn hợp chuẩn

Khoảng tuyến tính, độ chính xác, độ đúng

Bảng 9. Kết quả khảo sát khoảng tuyến tính, độ chính xác và độ đúng

STT	Acid amin	Phương trình hồi quy	Hệ số tương quan (r)	Khoảng tuyến tính (mg/ml)	Độ chính xác (n = 12)		Độ đúng (n = 9)	
					% so với nhãn	RSD %	Tỷ lệ thu hồi (%)	RSD %
1	L-acid aspartic	$\hat{y} = 57,1767x$	0,9928	0,0187 – 0,0280	103,81	0,82	99,71 – 101,51	0,68
2	L-acid glutamic	$\hat{y} = 55,4573x$	0,9902	0,0240 – 0,0479	101,03	0,42	98,87 – 101,72	0,94
3	L-serin	$\hat{y} = 71,1683x$	0,9921	0,0169 – 0,0254	98,51	0,89	98,21 – 101,92	1,36

4	L-histidin	$\hat{y} = 30,7999x$	0,9952	0,0098 – 0,0148	99,50	0,69	98,21 – 101,89	1,48
5	L-threonin	$\hat{y} = 69,3194x$	0,9945	0,0162 – 0,0243	100,89	1,37	98,26 – 101,70	1,49
6	L-arginin	$\hat{y} = 54,0647x$	0,9955	0,0191 – 0,0286	97,65	0,91	98,12 – 101,27	1,00
7	L-alanin	$\hat{y} = 91,5328x$	0,9937	0,0284 – 0,0425	97,30	1,48	98,61 – 101,85	1,41
8	L-tyrosin	$\hat{y} = 51,3916x$	0,9919	0,0023 – 0,0035	102,54	1,26	98,17 – 101,74	1,45
9	Glycin	$\hat{y} = 149,7565x$	0,9990	0,0094 – 0,0140	102,82	1,01	98,18 – 101,91	1,19
10	L-valin	$\hat{y} = 87,2481x$	0,9945	0,0151 – 0,0226	105,51	0,74	101,13 – 101,91	0,29
11	L-methionin	$\hat{y} = 54,0647x$	0,9955	0,0059 – 0,0089	100,83	1,03	98,28 – 99,78	0,47
12	Taurin	$\hat{y} = 51,1939$	0,9918	0,0015 – 0,0022	113,44	1,11	98,12 – 101,28	0,96
13	L-tryptophan	$\hat{y} = 43,1075$	0,9920	0,0064 – 0,0096	106,36	0,98	98,80 – 101,79	1,17
14	L-phenylalanin	$\hat{y} = 61,4882$	0,9983	0,0121 – 0,0182	102,87	1,29	99,27 – 101,91	0,9
15	L-isoleucin	$\hat{y} = 88,2534x$	0,9955	0,0141 – 0,0212	99,23	1,11	98,66 – 101,77	1,32
16	L-leucin	$\hat{y} = 80,1477x$	0,9978	0,0321 – 0,0482	103,16	0,55	99,45 – 101,68	0,68
17	L-lysin	$\hat{y} = 72,5399x$	0,9901	0,0271 – 0,0407	104,69	1,77	98,11 – 101,54	1,27
18	L-prolin	$\hat{y} = 21,0559x$	0,9942	0,0250 – 0,0375	111,35	1,60	98,06 – 101,86	1,36

Nhận xét: Phương pháp định lượng đạt tính tuyến tính với giá trị $r > 0,900$. Giá trị RSD của hàm lượng phần trăm so với nhãn của các acid amin tương ứng với độ chính xác đều không quá 2%. Tỷ lệ thu hồi của các acid amin ở 3 mức nồng độ 80, 100 và 120% của nồng độ định lượng đều nằm trong khoảng 98 – 102% với RSD không quá 2%. Từ kết quả khảo sát độ chính xác, hàm lượng phần trăm của các acid amin nằm trong khoảng 90 – 110% so với hàm lượng ghi trên nhãn.

Như vậy, quy trình định lượng các acid amin trong dung dịch nuôi ăn tĩnh mạch bằng phương pháp **HPLC-FLD** đạt yêu cầu về tính phù hợp của hệ thống, có tính chọn lọc, khoảng xác định rộng, đạt độ chính xác và độ đúng.

Bàn luận

Quy trình định lượng cystein bằng phương pháp **HPLC-PDA** và quy trình định lượng đồng thời các acid amin bằng phương pháp **HPLC-FLD** trong chế phẩm dinh dưỡng pha chế theo đơn đều đạt yêu cầu thẩm định và có thể được áp dụng để định lượng hay khảo sát độ ổn định các acid amin trong chế phẩm dinh dưỡng pha chế theo đơn. Các kết quả ban đầu cho thấy

hàm lượng acid amin trong dung dịch nuôi ăn tĩnh mạch vẫn nằm trong khoảng 90 – 110% so với hàm lượng ghi trên nhãn trong 48 giờ bảo quản ở nhiệt độ 2 – 8°C ngay sau khi pha chế. Điều này phản ánh sự ổn định hàm lượng của các acid amin sau pha chế và bảo quản cũng như không có sự tương tác giữa các thành phần còn lại trong dung dịch với acid amin. Sự biến đổi cystein trong thời gian bảo quản cũng đã được ghi nhận trong nghiên cứu của Anne-Laure và CS vào năm 2019 với kết quả cho thấy các acid amin có nồng độ ổn định trong 4 tháng bảo quản ở nhiệt độ 2 – 8°C, ngoại trừ cystein - acid amin này đã bị phân hủy thành cystin, làm vàng dung dịch tiêm^[12]. Nguyên nhân là do sau 8 ngày bảo quản ở nhiệt độ 2 – 8°C, chế phẩm đã được bảo quản ở nhiệt độ 22 – 24°C trong 24 giờ để mô phỏng quá trình sử dụng trên bệnh nhân thực tế trước khi thực hiện các phép thử và pH đo được của dung dịch dinh dưỡng trong nghiên cứu này dao động xấp xỉ 5. Ngoài ra, việc kết luận sự không bền vững của cystein là dựa vào việc khảo sát hàm lượng cystin trong quá trình khảo sát mà không định lượng cystein và tính kết quả so với nhãn. Trong nghiên cứu

của chúng tôi, hàm lượng cystein hầu như không thay đổi trong suốt thời gian bảo quản (khoảng 104% so với hàm lượng nhãn), thời gian bảo quản ngắn hơn (48 giờ), không có giai đoạn mô phỏng như đã nêu trên, pH của dung dịch xấp xỉ 6,5 và có định lượng cystein so với nhãn. Như vậy, các khác biệt nói trên có thể dẫn đến kết quả khác nhau giữa hai nghiên cứu, nhưng nhìn chung, cả hai đều có cùng đi đến nhận định là dung dịch dinh dưỡng nuôi ăn tĩnh mạch tương đối bền vững khi được bảo quản ở nhiệt độ 2 – 8°C và có thể dùng an toàn cho trẻ sơ sinh.

Kết luận

Quy trình định lượng acid amin trong dung dịch nuôi ăn tĩnh mạch bằng phương pháp **HPLC** với đầu dò dãy diod quang PDA (định lượng cystein) và đầu dò huỳnh quang FLD (định lượng các acid amin còn lại) kết hợp với việc tạo dẫn chất trước cột với thuốc thử OPA và thuốc thử FMOC-Cl đã được xây dựng thành công. Quy trình có tính chọn lọc, khoảng tuyến tính rộng, đạt độ chính xác và độ đúng. Kết quả định lượng cho thấy dung dịch dinh dưỡng pha chế theo đơn có hàm lượng phần trăm của các acid amin nằm trong khoảng 90 – 110% so với hàm lượng ghi trên nhãn.

Tài liệu tham khảo

1. Baudouin A., Diouf E., Tall M. L., et al. (2005), "Advantages and special features of hospital preparations of parenteral nutrition in neonatology", *Ann. Pharm. Fr.*, 73, pp. 150-159.
2. Growth and Development of the Child (1933), "White house conference on child health and protection II", *Anatomy and Physiology, Century*, pp. 19.
3. Bệnh viện Nhi đồng 2 Thành phố Hồ Chí Minh (2020), Tổ chức bệnh viện, <http://www.benhviennhi.org.vn/news/detail/3/to-chuc-benh-vien.html>. Ngày truy cập: 20/04/2021.
4. Ghadimi H. (1973), "A review: Current status of parenteral amino acid therapy", *Pediatr. Res.*, 7, pp. 169-173.
5. Fabiane G. Antes, Márcia F. Mesko, Juliano S. Barin, et al. (2011), "Development of multi-elemental method for quality control of parenteral component solutions using ICP-MS", *Microchemical Journal*, 98 (1), pp. 144-149.
6. Anne-Laure Yailian, Céline Serre, Justine Fayard, et al. (2019), "Production and stability study of a hospital parenteral nutrition solution for neonates", *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 9 (2), pp. 83-90.
7. Yarandi S. S., Zhao V. M., Hebbar G., Ziegler T. R. (2011), "Amino acid composition in parenteral nutrition: What is the evidence?", *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care.*, 14 (1), pp. 75-82.
8. Riedijk M. A., Van Beek R. H., Voortman G., et al. (2007), "Cysteine: A conditionally essential amino acid in low-birth-weight preterm infants?", *Am. J. Clin. Nutr.*, 86 (4), pp. 1120-1125.
9. Aasodi R. R., Murugan V., Kumari P., Shree V. (2018), "Development of analytical method for separation and quantification of cysteine hydrochloride monohydrate, followed by validation with total error concept by using ultra performance liquid chromatography with pre-column derivatization", *Journal of Chromatography Separation Techniques*, 9 (4), pp. 1-6.
10. Bộ Y tế (2017), *Dược điển Việt Nam V*, NXB Y học, tr. 214-222.
11. ICH (2005), *Harmonized tripartite guideline*, Validation of analytical procedures: Test and methodology, pp 1-13.
12. Anne-Laure Yailian, Céline Serre, Justine Fayard, et al. (2019), "Production and stability study of a hospital parenteral nutrition solution for neonates", *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 9 (2), pp. 83-90.