

METHOD DEVELOPMENT FOR THE DETERMINATION OF BERBERINE IN SPRAY SOLUTION USED IN THE TREATMENT OF WOUND INJURIES ON SKIN BY HPLC-DAD

Nguyen Thi Thu Huyen*, Vu Thi Minh Thu

Hai Duong Central College of Pharmacy - 324 Nguyen Luong Bang, Le Thanh Nghi Ward, Hai Phong, Vietnam

Received: 12/09/2025

Revised: 02/10/2025; Accepted: 08/10/2025

ABSTRACT

Objectives: To preliminarily investigate extraction conditions, and to develop and validate a method for quantification of berberine in a spray solution intended to support the treatment of skin lesions.

Methods: Research subjects are the spray solution for treating skin injuries. Reverse phase liquid chromatography method coupled with DAD.

Results: Chromatographic conditions were as follows: stationary phase, Hypersil C18 column; mobile phase, a mixture of phosphate buffer [0.05 mol/L potassium dihydrogen phosphate with 0.05 mol/L sodium heptane sulfonate (1:1) containing 0.2% triethylamine, adjusted to pH 3.0 with phosphoric acid] and acetonitrile (60:40); detection wavelength, 345 nm; flow rate, 1.0 mL/min; injection volume, 10 µL. The method was validated for system suitability, specificity, linearity ($y = 87584x - 24472$, $R^2 = 0.9993$), precision (intra- and inter-day RSD: 1.07-1.21), accuracy (mean recovery: 99.73%), limit of detection (LOD: 0.92 µg/mL), and limit of quantification (LOQ: 2.79 µg/mL). All validation parameters met AOAC guidelines.

Conclusion: The developed and validated method is applicable for the quantitative determination of berberine in spray formulations for supporting skin lesion treatment.

Keywords: Berberine, HPLC, the spray solution for treating skin injuries.

*Corresponding author

Email: huyendkh84@gmail.com **Phone:** (+84) 914629151 **Https://doi.org/10.52163/yhc.v66iCD18.3462**

XÂY DỰNG QUY TRÌNH ĐỊNH LƯỢNG BERBERIN TRONG DUNG DỊCH XỊT HỖ TRỢ ĐIỀU TRỊ TỔN THƯƠNG DA BẰNG PHƯƠNG PHÁP HPLC-DAD

Nguyễn Thị Thu Huyền*, Vũ Thị Minh Thu

Trường Cao đẳng Dược Trung ương Hải Dương - 324 Nguyễn Lương Bằng, P. Lê Thanh Nghị, Tp. Hải Phòng, Việt Nam

Ngày nhận: 12/09/2025

Ngày sửa: 02/10/2025; Ngày đăng: 08/10/2025

ABSTRACT

Mục tiêu: Khảo sát sơ bộ điều kiện chiết, tiến hành xây dựng và thẩm định quy trình định lượng các hoạt chất berberin trong dung dịch xịt hỗ trợ điều trị tổn thương da.

Phương pháp nghiên cứu: Đối tượng nghiên cứu là dung dịch xịt hỗ trợ điều trị tổn thương da từ nano bạc và một số dược liệu; sử dụng phương pháp sắc ký lỏng pha đảo ghép nối đầu dò DAD.

Kết quả: Điều kiện sắc ký: pha tĩnh là cột Hypersil C18, pha động gồm hỗn hợp dung dịch đệm phosphate [0,05 mol/L kali dihydrophosphat với 0,05 mol/L natri heptan sulfonat (1:1) chứa 0,2% triethylamin, điều chỉnh tới pH 3,0 bằng acid phosphoric] và acetonitril (60:40); bước sóng phân tích 345 nm, tốc độ dòng: 1,0 mL/phút; thể tích tiêm mẫu: 10 μ L. Quy trình được thẩm định về tính tương thích hệ thống, tính đặc hiệu, tính tuyến tính ($y = 87584x - 24472$ với $R^2 = 0,9993$), độ chính xác (RSD trong ngày và khác ngày trong khoảng 1,07-1,21); độ đúng (tỷ lệ thu hồi trung bình 99,73%); LOD = 0,92 μ g/mL; LOQ = 2,79 μ g/mL; đạt yêu cầu quy định theo hướng dẫn của AOAC.

Kết luận: Phương pháp đã xây dựng và thẩm định có thể ứng dụng để định lượng berberin có trong dung dịch xịt hỗ trợ điều trị tổn thương da

Từ khóa: Berberin, HPLC, dung dịch xịt hỗ trợ điều trị tổn thương da.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Tổn thương hờ trên da là một bệnh lý chiếm tỷ lệ khoảng 80% ở các bệnh nhân giảm khả năng vận động, không còn khả năng vận động, bệnh nhân tiểu đường có biến chứng [1]. Để phòng và điều trị tổn thương hờ trên da hiện nay trên thị trường có các dạng chế phẩm như cồn sát khuẩn, dung dịch iod, nước oxy già, kem bôi kháng sinh [1]... Tuy nhiên, các chế phẩm này không chỉ gây xót khi sử dụng mà còn có thể làm chậm quá trình lành vết thương, không thích hợp khi phải dùng kéo dài và thường xuyên, có nguy cơ cao gây kháng kháng sinh. Bên cạnh đó, xu hướng phát triển các sản phẩm từ dược liệu ngày nay càng được chú trọng. Công thức dung dịch xịt hỗ trợ điều trị tổn thương hờ ở da từ nano bạc và một số dược liệu sẵn có như hoàng đằng, hoàng liên, cỏ nhọ nồi, nghệ, kim ngân hoa có tác dụng kháng khuẩn trong thực nghiệm. Định lượng được hoạt chất chính của một cây thuốc hoặc một bài thuốc có ý nghĩa quan trọng trong việc tiêu chuẩn hóa và

nghiên cứu phát triển sản phẩm có nguồn gốc tự nhiên, góp phần hiện đại hóa y học cổ truyền, giúp đưa những bài thuốc cổ phương kinh điển trở thành sản phẩm được kiểm soát chất lượng; đảm bảo tính an toàn, hiệu quả, kinh tế khi sử dụng phòng chữa bệnh.

Trong các dược liệu của sản phẩm xịt hỗ trợ điều trị tổn thương hờ ở da thì berberin là hoạt chất quan trọng có trong hoàng liên, hoàng đằng và có tác dụng kháng khuẩn. Đã có nhiều nghiên cứu định lượng berberin trong dược liệu và trong các bài thuốc [2-5]. Nghiên cứu này được thực hiện với mục tiêu chính là xây dựng và thẩm định quy trình định lượng berberin trong sản phẩm xịt hỗ trợ điều trị tổn thương da bằng phương pháp HPLC-DAD. Từ đó, chuẩn hóa sản phẩm xịt hỗ trợ điều trị tổn thương da bào chế từ nano bạc và một số dược liệu sẵn có như hoàng đằng, hoàng liên, cỏ nhọ nồi, nghệ, kim ngân hoa.

*Tác giả liên hệ

Email: huyendkh84@gmail.com Điện thoại: (+84) 914629151 <https://doi.org/10.52163/yhc.v66iCD18.3462>

2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Nguyên vật liệu và đối tượng nghiên cứu

Mẫu thử là dung dịch xịt hỗ trợ điều trị tổn thương hờ trên da có công thức như bảng 1.

Bảng 1. Công thức dung dịch xịt hỗ trợ điều trị tổn thương hờ ở da

STT	Thành phần	Hàm lượng
1	Cao hỗn hợp dược liệu (hoàng đằng, hoàng liên, cỏ nhọ nồi, nghệ, kim ngân hoa)	5g
2	Nano bạc	10 ppm
3	PEG 40	7g
4	Glycerin	5g
5	Acid boric	1,5g
6	Kali sorbat	0,15g
7	Ethanol và nước tinh khiết vừa đủ	30 ml

Dung dịch xịt hỗ trợ điều trị tổn thương hờ trên da được sản xuất tại Trung tâm Nghiên cứu và Kinh doanh Dược, Trường Cao đẳng Dược Trung ương Hải Dương. Quy cách đóng gói: lọ thủy tinh 30 ml.

- Hóa chất: nước cất, ethanol 96, natri lauryl sulfat, kali dihydrophosphat, acetonitril, methanol, acid phosphoric, natri heptan sulfonate, triethylamin đạt tiêu chuẩn phân tích cho chạy máy HPLC.

- Chất chuẩn: palmatin clorid SKS: C0221313, berberin clorid SKS: C0420168.04 của Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương.

- Thiết bị và dụng cụ nghiên cứu: hệ thống sắc ký lỏng hiệu năng cao HPLC Hitachi L5000, hệ thống quang phổ UV-VIS Thermo Evolution 60S, cân phân tích 10-4 A&D, cột sắc ký Hypersil C18 (250 × 4.6 mm, 5µm) và các dụng cụ thủy tinh chính xác khác.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Khảo sát quy trình chiết berberin từ dung dịch xịt hỗ

trợ điều trị tổn thương hờ ở da từ nano bạc và cao đặc dược liệu.

- Mẫu chuẩn: cân chính xác 0,200g berberin clorid chuẩn hòa tan trong 200 ml nước nóng. Sau đó làm lạnh thêm nước đến 1000 ml. Lấy chính xác 10 ml dung dịch này pha loãng với nước vừa đủ 100 ml. Đo độ hấp thụ (AS).

- Khảo sát chiết xuất: khảo sát điều kiện chiết từ mẫu nghiên cứu thay đổi lần lượt dung môi chiết, tỷ lệ lượng sản phẩm/dung môi. Khảo sát 1, mẫu A1-A3 tương ứng với khảo sát dung môi chiết là methanol, nước, ethanol. Tính nồng độ dựa vào độ hấp thụ của 3 mẫu dựa trên độ hấp thụ của mẫu chuẩn và lựa chọn dung môi cho độ hấp thụ tốt nhất. Tiếp theo, khảo sát 2, mẫu B1-B5 được khảo sát tỷ lệ lượng sản phẩm/dung môi đã được lựa chọn từ khảo sát 1 với lượng sản phẩm lấy tương ứng là 5g, 10g, 15g, 20g, 25g. Chuẩn bị lặp lại 3 lần cho mỗi mẫu khảo sát. Lọc và hòa loãng đến độ thích hợp để đo độ hấp thụ của dung dịch ở bước sóng 345 nm (sao cho độ hấp thụ nằm từ 0,20 đến 0,80). So sánh thống kê các giá trị hàm lượng berberin có trong sản phẩm và lựa chọn lượng mẫu phù hợp.

- Khảo sát điều kiện HPLC: khảo sát hệ dung môi pha động, tốc độ dòng, thể tích tiêm mẫu sao cho thu được sắc ký đồ có pic của berberin tách tốt; pic gọn, cân đối, thời gian phân tích không quá dài.

- Thẩm định phương pháp phân tích: thực hiện theo hướng dẫn của AOAC [1] với các tiêu chí được thẩm định trong nghiên cứu gồm: tính tương thích hệ thống, tính đặc hiệu, khoảng nồng độ tuyến tính, độ đúng, độ chính xác, giới hạn phát hiện (LOD) và giới hạn định lượng (LOQ).

- Xử lý thống kê: các số liệu thí nghiệm được xử lý bằng phần mềm Microsoft Excel với mức ý nghĩa thống kê $p < 0,05$.

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. Kết quả khảo sát quy trình chiết berberin từ dung dịch xịt hỗ trợ điều trị tổn thương hờ ở da từ nano bạc và cao đặc dược liệu

Bảng 2. Hàm lượng berberin tại các điều kiện khảo sát (n = 3)

Dung môi chiết	A1	A2	A3		
Độ hấp thụ (A)	0,425	0,390	0,411		
Hàm lượng berberin (mg/ml)	0,0216	0,0198	0,0208		
Lượng mẫu thử	B1	B2	B3	B4	B5
Độ hấp thụ (A)	0,091	0,211	0,308	0,425	0,536
Hàm lượng berberin (mg/ml)		0,0107	0,0156	0,0216	0,0272

Như vậy, dung môi hòa tan methanol có độ hấp thụ UV cao nhất nên methanol là dung môi phù hợp lựa chọn cho việc hòa tan berberin từ dung dịch xịt hỗ trợ điều trị tổn thương da từ nano bạc và cao đặc dược liệu. Lượng mẫu từ 10-25g có độ hấp thụ nằm trong khoảng 0,2-0,8 phù hợp với điều kiện định lượng. Để tiết kiệm mẫu và dung môi, lựa chọn mẫu phân tích là 10g.

3.2. Lựa chọn điều kiện sắc ký

Chuẩn berberin cho các cực đại hấp thụ ở bước sóng 228, 264 và 345 nm. Chọn bước sóng 345 nm để cài đặt detector DAD.

Sau các thực nghiệm bằng nhiều hệ dung môi pha động khác nhau, hệ pha động tối ưu gồm hỗn hợp dung dịch đệm phosphate [0,05 mol/L kali dihydrophosphat với 0,05 mol/L natri heptan sulfonat (1:1) chứa 0,2% triethylamin, điều chỉnh tới pH 3,0 bằng acid phosphoric] và acetonitril tỷ lệ 60:40 cho pic các hoạt chất chính tách ra khỏi nhau và tách khỏi các tạp khác và pic cân đối.

Khảo sát thể tích tiêm mẫu bằng cách thay đổi thể tích tiêm mẫu từ 5-25 μ L. Kết quả cho thấy, thể tích tiêm mẫu 10 μ L và 15 μ L cho khả năng quan sát pic tốt. Để tiết kiệm mẫu, chúng tôi chọn thể tích tiêm mẫu là 10 μ L.

Khảo sát tốc độ dòng bằng cách thay đổi 0,7-1,5 mL/phút. Qua khảo sát cho thấy tốc độ dòng 1,0 mL/phút là phù hợp nhất, thời gian phân tích đảm bảo dưới 10 phút đồng thời pic tách tốt. Do đó, chúng tôi lựa chọn tốc độ dòng 1,0 mL/phút.

Qua khảo sát, chúng tôi lựa chọn được điều kiện sắc ký như bảng 3.

Bảng 3. Điều kiện chạy sắc ký định lượng berberin

Cột sắc ký	Hypersil C18 (250 $\times$ 4,6 mm, 5 μ m)
Detector	DAD ở bước sóng 345 nm
Pha động	Hỗn hợp dung dịch đệm phosphate [0,05 mol/L kali dihydrophosphat với 0,05 mol/L natri heptan sulfonat (1:1) chứa 0,2% triethylamin, điều chỉnh tới pH 3,0 bằng acid phosphoric] và acetonitril (60:40)
Tốc độ dòng	1 mL/phút
Thể tích tiêm mẫu	10 μ L
Nhiệt độ cột	Nhiệt độ phòng

3.3. Thẩm định quy trình định lượng

Tính đặc hiệu

Tiến hành chạy sắc ký mẫu chuẩn, mẫu thử và mẫu trắng. Kết quả trên sắc ký đồ cho thấy: mẫu thử cho pic có thời gian lưu tương ứng với thời gian lưu của mẫu chuẩn berberin; pic của berberin ở mẫu thử rõ ràng, cân đối, tách hoàn toàn khỏi pic tạp. Đồng thời, mẫu trắng không thấy xuất hiện pic có thời gian lưu tương ứng với mẫu chuẩn và mẫu thử.

Tính tương thích hệ thống

Tiến hành tiêm lặp lại 6 lần dung dịch mẫu chuẩn berberin clorid có nồng độ khoảng 30 μ g/mL và palmatin có nồng độ khoảng 20 μ g/mL vào hệ thống sắc ký. Sử dụng palmatin để xác định sự phù hợp của hệ thống theo Dược điển Việt Nam V yêu cầu RS không nhỏ hơn 1,5 [7]. Kết quả khảo sát tính phù hợp hệ thống sắc ký được trình bày ở bảng 4.

Bảng 4. Kết quả kiểm tra tính thích hợp của hệ thống sắc ký

STT	Berberin		Palmatin	
	Thời gian lưu (phút)	Diện tích pic	Thời gian lưu (phút)	Diện tích pic
1	5,645	2498940	3,985	1651879
2	5,642	2515311	3,964	1629981
3	5,642	2516287	3,955	1599235
4	5,643	2515541	3,966	1587542
5	5,640	2516305	3,977	1645711
6	5,642	2513184	3,988	1628741
Trung bình	5,642	2512594.667	3,973	1623848
SD	0,002	6786.111	0,012	25491.992
RSD (%)	0,03	0,27	1,18	1,57

Độ lệch chuẩn tương đối của thời gian lưu và diện tích pic berberin clorid lần lượt là 0,03% và 0,27%. Độ lệch chuẩn tương đối của thời gian lưu và diện tích pic của palmatin clorid lần lượt là 1,18% và 1,57%. 2 pic tách hoàn toàn ($R_s = 3,24$). Như vậy, phương pháp sử dụng định lượng berberin là phù hợp.

Khoảng nồng độ tuyến tính

Chuẩn bị ít nhất dãy 5 nồng độ dung dịch chuẩn berberin, tiến hành sắc ký như các điều kiện đã chọn. Đánh giá mối tương quan giữa nồng độ và diện tích pic thông qua đồ thị và hệ số R^2 . Trong khoảng nồng độ khảo sát có sự tương quan tuyến tính chặt chẽ giữa nồng độ berberin với diện tích pic với đường thẳng hồi quy tuyến tính là $y = 87584x - 24472$ (hệ số tương quan $R^2 = 0,9993$).

Độ đúng

Tiến hành bằng phương pháp thêm chuẩn vào mẫu thử để thu được các dung dịch mẫu tự tạo có nồng độ 20, 30, 40 $\mu\text{g/ml}$, mỗi nồng độ tiến hành trên 3 thí nghiệm riêng biệt. Tiến hành định lượng lại lượng chuẩn trong các mẫu trên, từ đó tính toán được tỷ lệ thu hồi. Kết quả được trình bày tại bảng 5.

Bảng 5. Kết quả khảo sát độ đúng của phương pháp

STT	Lượng chuẩn thêm vào	Diện tích pic	Lượng chuẩn tìm lại	Thu hồi (%)
1	20,08	1737542	20,12	100,18
2	20,05	1709896	19,80	98,75
3	20,11	1729574	20,02	99,58
4	30,01	2557991	29,48	98,24
5	30,09	2644080	30,47	101,25
6	30,03	2594563	29,90	99,57
7	40,06	3449328	39,66	99,00
8	40,11	3515258	40,41	100,75
9	40,02	3488979	40,11	100,23
Trung bình	99,73			
RSD (%)	0,98			

Phương pháp có độ thu hồi 98,24-101,25% (nằm trong giới hạn 98-102%) với RSD là 0,98% ($RSD \leq 2\%$). Do đó, phương pháp đạt yêu cầu về độ đúng.

Độ chính xác

Tính chính xác của phương pháp được đánh giá theo độ lặp lại (thực hiện trên 6 mẫu thử trong cùng điều kiện sắc ký, cùng ngày, cùng kiểm nghiệm viên) và độ chính xác trung gian (thực hiện trên 6 mẫu thử trong cùng điều kiện sắc ký nhưng khác ngày). Kết quả thu được ở bảng 6.

Bảng 6. Kết quả đánh giá độ lặp lại và độ chính xác trung gian của phương pháp

STT	Độ lặp lại			Độ chính xác trung gian		
	tR	Diện tích pic	Hàm lượng (%)	tR	Diện tích pic	Hàm lượng (%)
1	5,645	2498940	101,98	5,634	2599976	100,41
2	5,642	2515311	99,95	5,597	2588697	100,92
3	5,642	2516287	98,76	5,612	2598711	99,79
4	5,643	2515541	99,55	5,628	2678421	101,77
5	5,64	2516305	99,95	5,642	2598715	99,56
6	5,642	2513184	100,45	5,601	2518862	98,26
Trung bình	5,642	2512594.667	100,11%	5,619	2597230.333	100,12
RSD	0,03	0,27	1,07	0,33	1,95	1,21

Dựa vào giá trị của thời gian lưu, diện tích pic, tỷ lệ hàm lượng đều cho $RSD < 2\%$ ở cả 6 mẫu trong nghiên cứu độ lặp lại và độ chính xác trung gian nên phương pháp có độ chính xác.

Giới hạn phát hiện (LOD) và giới hạn định lượng (LOQ)

Dựa trên đường chuẩn để xác định LOD và LOQ của berberin: LOD = 0,92 $\mu\text{g/ml}$; LOQ = 2,79 $\mu\text{g/ml}$.

4. BÀN LUẬN

Phương pháp định lượng berberin được xây dựng bằng kỹ thuật sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) sử dụng pha đảo với cột C18, pha động gồm hỗn hợp dung dịch đệm phosphate [0,05 mol/L kali dihydrophosphat với 0,05 mol/L natri heptansulfonat (1:1) chứa 0,2% triethylamin, điều chỉnh tới pH 3,0 bằng acid phosphoric] và acetonitril (60:40). Đây là hệ dung môi rất phù hợp để phân tích các alkaloid có tính base yếu như berberin và palmatin bằng kỹ thuật HPLC pha đảo. Các điều kiện sắc ký khác như tốc độ dòng 1,0 ml/phút, thể tích tiêm mẫu 10 µl và phát hiện bằng detector UV ở bước sóng 345 nm. Phương pháp cho thời gian lưu ổn định và phân tách rõ ràng berberin với các tạp và palmatin - một đồng phân thường gặp trong dược liệu chứa berberin. So sánh với phương pháp định lượng berberin trong bài thuốc Tam hoàng thang của Đoàn Thị Ái Nghĩa và cộng sự thì LOD = 1,51 ppm và LOQ = 4,56 ppm [3], cho thấy phương pháp trên xây dựng có giá trị tương đương nên có thể thấy sự phù hợp về phương pháp định lượng như các tác giả khác đã làm trước đó.

5. KẾT LUẬN

Nghiên cứu đã tiến hành khảo sát được dung môi và lượng mẫu thử dung dịch xịt hỗ trợ điều trị tổn thương da đem thử là: dung môi methanol và lượng mẫu đem thử là 20 ml dung dịch. Quy trình định lượng bằng HPLC-DAD sử dụng pha tĩnh là cột Hypersil C18 (250 × 4,6 mm, 5 µm), pha động gồm hỗn hợp dung dịch đệm phosphate [0,05 mol/L kali dihydrophosphat với 0,05 mol/L natri heptan sulfonat (1:1) chứa 0,2% triethylamin, điều chỉnh tới pH 3,0 bằng acid phosphoric] và acetonitril (60:40); bước sóng phân tích 345 nm, tốc độ dòng: 1,0 mL/phút; thể tích tiêm mẫu: 10 µL; đã được thẩm định đạt các tiêu chí về tính phù hợp hệ thống sắc ký, tính chọn lọc, khoảng nồng độ tuyến tính, độ chính xác, độ đúng và giới hạn phát hiện theo yêu cầu AOAC.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Jasmie Eske. What to know about open wound care. Medical News today, 2019. <https://www.medicalnewstoday.com/articles/325260>
- [2] Võ Văn Lệnh, Nguyễn Việt Cường, Bùi Thị Yến Linh, Phạm Nhật Tân. Xây dựng quy trình định lượng berberin clorid trong hệ phân tán rắn berberin-eudragit L100. Tạp chí Khoa học Lạc Hồng, 2021, số 12, trang 55-57.
- [3] Đoàn Thị Ái Nghĩa, Nguyễn Viết Khẩn, Nguyễn Hữu Tiến, Nguyễn Khánh Thùy Linh, Nguyễn Đình Quang Phú. Xây dựng quy trình định lượng palmatin và berberin trong bài thuốc Tam hoàng thang bằng phương pháp HPLC/PDA. Tạp chí Y dược học Cần Thơ, 2022, số 46, trang 83-91.
- [4] Phạm Thanh Kỳ, Nguyễn Thị Phương Thảo, Trịnh Văn Lầu. Nghiên cứu định tính và định lượng đồng thời berberin và palmatin trong dược liệu hoàng liên bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC). Tạp chí Kiểm nghiệm, 2002, số 3, trang 4-7.
- [5] Gill-Woong Jang, Sun-Il Choi, Xionggao Han, Xiao Men, Hee-Yeon Kwon, Ye-Eun Choi, Byung-Woo Park, Jeong-Jin Kim, Ok-Hwan Lee. Development and validation of analytical method and antioxidant effect for berberine and palmatine in *P. amurense*. Journal of Food Hygiene and Safety, 2020, 35 (6), pp. 544-551.
- [6] AOAC Official Methods of Analysis. AOAC Guidelines for Single-Laboratory Validation of Chemical Methods for Dietary Supplements and Botanicals, 2013.
- [7] Bộ Y tế, Dược Điển Việt Nam V, tập 1. Nhà xuất bản Y học, 2018, trang 142-144; tập 2, PL5.3 trang PL-147-149.