

ĐỊNH LƯỢNG HUPERZINE A TRONG CÂY THÔNG ĐẤT (*Huperzia squarrosa* (G. Forst.) Trev.) TẠI CÁC TỈNH MIỀN NÚI PHÍA BẮC

Trần Thị Thu Hà¹, Nguyễn Thị Trang¹, Ngô Thị Tinh², Khuất Hữu Trung³, Nguyễn Tiến Dũng¹

TÓM TẮT

Nghiên cứu này trình bày định lượng huperzin A trong cây Thông đất (*Huperzia squarrosa* (G. Forst.) Trev.) bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao có kết nối khối phổ LC-MS/MS. Phương pháp sắc ký được thực hiện trên cột pha đảo Shumpack C18 (100 x 2,1 mm; 1,9 µm), hệ dung môi pha động bao gồm: Kênh A: acid formic 0,1%; kênh B: acetonitril, tốc độ dòng: 0,4 ml/phút. Các đường chuẩn xây dựng đều có độ tuyến tính cao ($R^2 > 0,99$). Phương pháp có độ lặp lại cao với các giá trị RSD% đều nhỏ hơn 3,7% (đạt yêu cầu quy định của ICH). Đồ thu hồi của phương pháp nằm trong khoảng từ 98,3% đến 101,4%. Kết quả phân tích hàm lượng huperzin A trong các mẫu Thông đất thu hái tại 10 tỉnh miền núi phía Bắc Việt Nam nằm trong khoảng từ 0,49 đến 27,92 µg/g, cao nhất là hàm lượng Huperzin A trong mẫu Thông đất thu tại huyện Na Hang, tỉnh Tuyên Quang 27,92 µg/g và thấp nhất là mẫu Thông đất thu hái tại huyện Định Hóa, tỉnh Thái Nguyên 0,49 µg/g.

Từ khóa: *Huperzia squarrosa*, HPLC, Huperzin A, Thông đất

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Thông đất (*Huperzia squarrosa* (G. Forst.) Trev.) là một loài cây dược liệu quý hiếm, trong cây có chứa các chất alkaloid như huperzin A (Hup A), huperzin B (Hup B), N-methyl-huperzin B, Huperzinin, Lycoporine A, Carina-tumine A, v.v....[4]. Nghiên cứu tác dụng dược lý hiện đại trong và ngoài nước đã cho thấy hoạt chất huperzin A trong cây Thông đất có tác dụng tăng cường dẫn truyền thần kinh, ngăn chặn hình thành các mảng bám, đám rối trong não, nuôi dưỡng tế bào não từ đó có đáp ứng rất tốt với các bệnh Alzheimer, Parkinson, teo não và sa sút trí tuệ và các bệnh có liên quan đến tổn thương tế bào thần kinh não bộ, ngăn chặn sự suy giảm trí nhớ hay teo não [2, 5, 7]. Huperzin A được chiết trong tự nhiên là một phân tử bất đối, tên viết tắt là Hup A, công thức phân tử $C_{15}H_{18}N_2O$ [6].

Theo tài liệu nghiên cứu gần đây cho thấy các alkaloid được phân lập từ nguồn *Huperzia squarrosa* thu thập ở tỉnh Lâm Đồng gồm 6 chất chính là Lycosquarosine A, Acetylposerratinine, huperzine A, huperzine B, 8 α -hydrophlemariurine B và huperzinin [2].

Nguyễn Ngọc Chương và cộng sự đã tiến hành định lượng huperzin A bằng phương pháp HPLC -

DAD [1]. Vũ Thị Ngọc và cộng sự đã thiết lập được điều kiện sắc ký lỏng hiệu năng cao HPLC phân tích định tính và định lượng huperzin A ở bước sóng 310 nm và xây dựng được đường chuẩn định lượng của chất chỉ thị huperzin A [3]. Kết quả những nghiên cứu cho thấy rằng, có thể định lượng được huperzin A bằng phương pháp HPLC ghép nối với detector DAD. Nghiên cứu đánh giá hàm lượng huperzin A trong các mẫu Thông đất thu hái tại 10 tỉnh miền núi phía Bắc Việt Nam, hàm lượng huperzin A có thể dao động rất mạnh, vì vậy đã tiến hành xây dựng phương pháp định lượng huperzin A trong cây Thông đất bằng phương pháp LC-MS/MS, sau đó ứng dụng phương pháp đã xây dựng để đánh giá hàm lượng huperzin A trong cây Thông đất một cách chính xác nhất.

2. ĐỐI TƯỢNG, NGUYÊN, VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu

Đối tượng nghiên cứu là mẫu Thông đất (*Huperzia squarrosa* (G. Forst.) Trev.) thu hái tại 10 tỉnh miền núi phía Bắc Việt Nam: Thái Nguyên, Tuyên Quang, Phú Thọ, Yên Bái, Bắc Kạn, Cao Bằng, Hà Giang, Sơn La, Lai Châu, Lào Cai. Các mẫu được rửa sạch, sấy khô và bảo quản trong các túi nilon buộc kín tại nơi khô ráo.

2.2. Nguyên, vật liệu

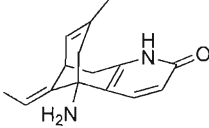
Chất chuẩn huperzin A do hãng Biopurify Phytochemicals Ltd. cung cấp, độ tinh khiết đạt 98%

¹ Trường Đại học Nông Lâm Đại học Thái Nguyên

² Bệnh viện trung ương Thái Nguyên

³ Viện Di truyền Nông nghiệp

(CAS: 102518-79-6, LOT: PRF8082821). Các dung môi, hóa chất dùng cho LCMS đều của hãng Merck (đạt chuẩn MS); các dung môi hóa chất dùng để xử lý mẫu đều đạt tiêu chuẩn tinh khiết phân tích (P.A).



Hình 1. Công thức cấu tạo của huperzin A

2.3. Thiết bị

Hệ thống máy sắc ký lỏng khối phổ 2 lần LC-MS/MS 8045 của Shimadzu bao gồm bom LC-30AD, bộ tiêm mẫu tự động SIL-20AHT, bộ phận khối phổ LCMS8045, lò cột GO-10AS VP. Cột sắc ký Shimpack C18 (100 x 2,1 mm; 1,9 μm) của Shimadzu.

Một số thiết bị khác: Cân phân tích Precisa XT 220A (độ chính xác 0,1 mg); máy rung siêu âm, có gia nhiệt của Power sonic 405...

2.4. Chuẩn bị mẫu

Dung dịch chuẩn: Cân chính xác khoảng 5 mg huperzin A vào bình định mức 10 ml. Hòa tan và định mức đến vạch bằng methanol thu được dung dịch chuẩn gốc có nồng độ khoảng 0,5 mg/ml. Từ dung dịch gốc, tiến hành pha loãng thành dãy dung dịch chuẩn hỗn hợp nồng độ khoảng từ 50 – 250 ppb trong methanol.

Dung dịch thử: Cân chính xác khoảng 0,5 g bột dược liệu vào ống ly tâm. Thêm khoảng 5 ml methanol, siêu âm 30 phút. Lọc dịch vào bình định mức 10 ml. Chiết lặp thêm 1 lần nữa. Gộp dịch lọc. Định mức đến vạch bằng methanol. Hút chính xác 2 ml dịch lọc vào bình định mức 25 ml. Định mức đến vạch bằng methanol. Lọc dịch qua màng cellulose acetat 0,22 μm thu được dịch chạy sắc ký. Dung dịch chuẩn gốc và dung dịch chuẩn trung gian được bảo quản ở -20°C.

2.5. Điều kiện sắc ký và khối phổ

Tiến hành định lượng huperzin A trên hệ thống LCMS (Shimadzu) với cột pha đảo Shimpack C18 (100 x 2,1 mm; 1,9 μm) (Shimadzu). Hệ dung môi pha động bao gồm acid formic 0,1% (kênh A) và acetonitril (kênh B). Chương trình gradient như sau: 0 - 1 phút, 10% - 75% (kênh A); 1 - 2 phút, 10 - 60% (kênh A); 2 - 4 phút, 60% (kênh A). 4 - 5 phút, 60 - 10% (kênh A) và 5 - 6,5 phút, 10% (kênh A). Thể tích tiêm mẫu là 5 μl và tốc độ dòng là 0,4 ml/phút. Điều

kiện khối phổ: Tốc độ khí mang: 3 l/phút; tốc độ khí làm nóng: 10 l/phút; nhiệt độ bề mặt phản hóa ion: 300°C; nhiệt độ DL: 250°C; tốc độ khí làm khô: 10 l/phút; thế phản hóa ion: -5kV. Chế độ ion hóa ESI (+).

2.6. Đánh giá phương pháp phân tích

Tiến hành thẩm định phương pháp định lượng huperzin A trong Thông đất bằng LC-MS theo hướng dẫn của ICH (International Conference on Harmonization).

2.7. Áp dụng trên mẫu Thông đất

Áp dụng phương pháp đã xây dựng để xác định hàm lượng huperzin A trong 30 mẫu Thông đất thu hái tại 10 tỉnh miền núi phía Bắc Việt Nam. Hàm lượng huperzin A trong mẫu thử được tính toán theo công thức sau:

$$X (\%) (\mu\text{g/g}) = \frac{C \times 25 \times 20 \times 100 \times 100 \times P}{m \times 10^6 \times (100-B) \times 100}$$

Trong đó:

X (%): Hàm lượng của huperzin A.

C: Nồng độ huperzin A tính từ phương trình đường chuẩn.

P: Độ tinh khiết của chất chuẩn (%).

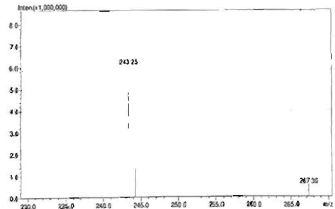
m: Khối lượng mẫu thử (g).

B: Độ ẩm của mẫu thử (%).

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

3.1. Khảo sát điều kiện khối phổ

Kỹ thuật FIA (Flow injection analysis) là một kỹ thuật phân tích sử dụng trong HPLC mà không sử dụng cột sắc ký. Ứng dụng trong khảo sát phổ khối để xác định mảnh ion mẹ của huperzin A. Kết quả thu được khu quan sát ở chế độ ESI-positive, thấy có mảnh ion mẹ của huperzin A có giá trị m/z là 243,25 tương ứng với mảnh mẹ [M+H]⁺ có tín hiệu cao nhất.



Hình 2. Phổ khối của huperzin A quan sát dưới chế độ ESI (+)

Tiếp tục áp dụng kỹ thuật FIA để tiến hành tối ưu hóa điều kiện MS/MS, kết quả thu được mảnh ion con có m/z là 115,15 có tín hiệu cao nhất dùng để

định lượng, và mảnh ion con có m/z là 77,15 để định tính. Các thông số MS tối ưu được trình bày trong bảng 1.

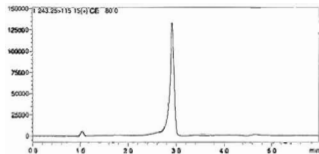
Bảng 1. Thông số MS tối ưu

TT	Hợp chất	Ion mẹ [M+H] ⁺	Ion con	Q1 Pre Bias	CE	Q3 Pre Bias	Số điểm IP
1	huperzin A	243,25	115,15	-43,0	-82,0	-44,0	4
2			77,15	-26,0	-74,0	-42,0	

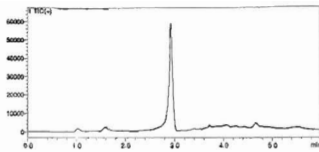
3.2. Khảo sát điều kiện sắc ký

Trong sắc ký lỏng khối phổ, điều kiện sắc ký ảnh hưởng đến quá trình tách cũng như đến quá trình solvat hóa trong buồng ion hóa phun điện tử. Bổ sung proton H⁺ vào pha động làm tăng tín hiệu của mảnh ion mẹ. Với chương trình gradient có sử dụng acid formic 0,1%, pic huperzin A có thời gian

lưu nhỏ, pic tương đối gọn và giảm hiện tượng chệch pic (Hình 3). Tốc độ dòng cũng ảnh hưởng đến quá trình solvat hóa do đó ảnh hưởng đến tín hiệu ion mẹ [M+H]. Tiến hành khảo sát với các tốc độ dòng khác nhau, tín hiệu của huperzin A với tốc độ dòng 0,4 ml/phút cho tín hiệu cao nhất.



Dung dịch chuẩn huperzin A



Mẫu thử

Hình 3. Sắc ký đồ định lượng huperzine A

3.3. Thẩm định phương pháp

* Độ chọn lọc của phương pháp

Để xác định tính chọn lọc đối với sắc kí khối phổ, sử dụng phương pháp xác nhân, Hồi đồng châu Âu quy định cách tính điểm IP (điểm nhận dạng - identification point) đối với sắc ký lỏng khối phổ 2 lần (LC-MS/MS) là 4. Tức là cần có 1 ion mẹ bắn phá ra 2 ion con. Như vậy phương pháp có tính đặc hiệu đáp ứng yêu cầu (Bảng 1).

* Tính phù hợp hệ thống

Tiến hành sắc ký 6 lần dung dịch chuẩn huperzin A có nồng độ là 126 ppb với điều kiện đã khảo sát. Tiến hành ghi lại thời gian lưu và diện tích pic tương ứng. Kết quả thu được (Bảng 2) cho thấy các giá trị RSD đều nhỏ hơn 2,0%, chứng tỏ hệ thống và phương pháp phân tích sử dụng phù hợp để phân tích định lượng huperzin A.

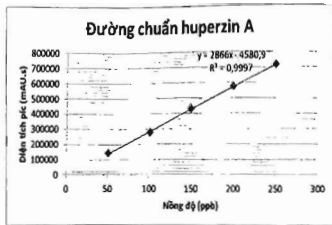
* Đường chuẩn và khoảng tuyến tính

Tiến hành sắc ký các dung dịch chuẩn chứa huperzin A có khoảng nồng độ từ 50,4 - 252 ppb.

Kết quả trong hình 4 cho thấy mối quan hệ tuyến tính chặt chẽ giữa diện tích pic và nồng độ của huperzin A.

Bảng 2. Kết quả đánh giá độ thích hợp hệ thống của phương pháp

TT	Thời gian lưu (phút)	Diện tích pic (mAU.s)
1	2,912	358962
2	2,904	359201
3	2,938	350291
4	2,915	353015
5	2,909	363019
6	2,918	361578
TB	2,916	357677,7
SD	0,0118	4980,3
RSD%	0,41	1,392



Hình 4. Đường chuẩn huperzin A

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

LOD và LOQ là những đại lượng đặc trưng cho độ nhạy của một phương pháp phân tích và được xác định bằng cách pha loãng các dung dịch mẫu thử đến khi thu được tín hiệu phân tích đạt tỷ lệ tín hiệu/nhiều (S/N) trong khoảng 2-3. Kết quả LOD và LOQ của huperzin A lần lượt là 0,1 và 0,4 ppb.

* *Độ lặp lại*

Độ lặp lại của phương pháp được xác định bằng cách phân tích lặp lại 6 lần mẫu thử được liệu Thông đất với quy trình phân tích đã xây dựng. Độ lệch chuẩn tương đối RSD (%) của huperzin A được trình bày trong bảng 3. Hàm lượng trung bình của huperzin A trong mẫu Thông đất là 27,90 µg/g với độ lệch chuẩn tương đối RSD (%) là 1,79% cho thấy phương pháp xây dựng có độ lặp lại cao.

Bảng 3. Kết quả đánh giá độ lặp lại của phương pháp

TT	Khối lượng (g)	S pic (mAU.s)	Hàm lượng (µg/g)
1	0,5125	334569	28,07
2	0,5021	330901	28,34
3	0,5013	329056	28,22
4	0,5192	330114	27,34
5	0,5078	321099	27,19
6	0,5168	339178	28,22
TB			27,90
SD			0,50
RSD%			1,79

* *Độ thu hồi*

Độ thu hồi của phương pháp đặc trưng cho sự sai số của một phương pháp phân tích và được xác định bằng phương pháp thêm chuẩn. Quá trình đánh

giá được tiến hành thêm chuẩn ở mức 80% và 100% so với hàm lượng huperzin A trong mẫu thử. Mẫu được xử lý như mục 2.4, lặp lại 3 lần. Phân tích đồng thời mẫu thêm chuẩn và mẫu không thêm chuẩn, xác định hàm lượng chất thêm vào dựa trên phương trình đường chuẩn. Kết quả khảo sát độ thu hồi của phương pháp được trình bày trong bảng 4. Độ thu hồi trung bình của phương pháp định lượng huperzin A trong Thông đất từ 98,3% đến 101,4%. Như vậy, phương pháp đã xây dựng có độ đúng cao.

Bảng 4. Kết quả thẩm định độ đúng của phương pháp

TT	Lượng chuẩn thêm vào (µg)	Độ thu hồi (%)
1	11,2	98,3
2	11,2	99,7
3	11,2	96,6
4	14,0	100,2
5	14,0	99,8
6	14,0	101,4

3.4. Áp dụng phương pháp đánh giá hàm lượng huperzin A trong Thông đất

Áp dụng phương pháp đã xây dựng, tiến hành đánh giá hàm lượng huperzin A trong 30 mẫu được liệu Thông thu hái tại 10 tỉnh miền núi phía Bắc Việt Nam. Mỗi mẫu được tiến hành lặp lại 3 lần độc lập. Kết quả thể hiện ở bảng 5.

Kết quả thu được cho thấy hàm lượng huperzin A trong các mẫu Thông đất thu hái tại 10 tỉnh miền núi phía Bắc Việt Nam giao động rất mạnh nằm trong khoảng từ 0,49 đến 27,92 µg/g. Thông đất phân bố ở các tỉnh khác nhau, sinh trưởng, phát triển ở các điều kiện tự nhiên, địa hình, khí hậu khác nhau nên có hàm lượng huperzin A khác nhau. Huperzin A cao nhất là mẫu Thông đất thu hái tại Na Hang-Tuyên Quang (27,92 µg/g); cao thứ 2 là mẫu Thông đất Lâm Bình - Tuyên Quang (26,12 µg/g), thấp nhất mẫu Thông đất Định Hóa-Thái Nguyên (0,49 µg/g).

Kết quả định lượng huperzin A trong cây thông đất (*Huperzia squarrosa* (G. Forst.) Trev.) thu tại 10 tỉnh miền núi phía Bắc thấp hơn so với kết quả định lượng huperzin A trong mẫu Rêu rỗng (*Huperzia squarrosa*) tại Lâm Đồng, Kon Tum (235,949 µg/g) [1] và thấp hơn so với kết quả định lượng huperzin A trong mẫu Thạch tùng rừng cửa ở Đà Lạt, Lâm Đồng thu vào mùa xuân (75,4 µg.g⁻¹ mẫu khô) và mùa thu là (92,5 µg.g⁻¹ mẫu khô) [3].

Bảng 5. Kết quả hàm lượng Huperzine A trong các mẫu Thông đất

STT	Xuất xứ/tỉnh	Mẫu	Hàm lượng huperzin A ⁽¹⁾ (µg/g)
1	Thái Nguyên	Vò Nhài 1	4,68 ± 0,03
		Vò Nhài 2	2,54 ± 0,05
		Đình Hóa	0,49 ± 0,01
2	Tuyên Quang	Hàm Yên	24,58 ± 0,04
		Lâm Bình	26,12 ± 0,02
		Na Hang	27,92 ± 0,08
3	Phú Thọ	Đoan Hùng	1,13 ± 0,01
		Tân Sơn	3,91 ± 0,02
		Yên Lập	1,24 ± 0,04
4	Yên Bái	Lục Yên	10,75 ± 0,04
		Tram Tấn	5,55 ± 0,04
		Vân Chấn	2,32 ± 0,01
5	Bắc Kạn	Chợ Đồn	4,23 ± 0,02
		Chợ Mới	1,18 ± 0,01
		Na Rì	1,43 ± 0,01
6	Cao Bằng	Trà Lĩnh	2,94 ± 0,01
		Nguyễn Bình	5,43 ± 0,03
		Trùng Khánh	5,63 ± 0,03
7	Hà Giang	Quản Bạ 1	15,31 ± 0,05
		Quản Bạ 2	7,54 ± 0,04
		Vị Xuyên	11,24 ± 0,03
8	Sơn La	Mường La	8,65 ± 0,02
		Quỳnh Nhài	7,89 ± 0,02
		Thuần Châu	1,73 ± 0,02
9	Lai Châu	Mường Tè	0,51 ± 0,01
		Sìn Hồ	1,08 ± 0,02
		Tam Đường	1,03 ± 0,01
10	Lào Cai	Mường Khương	7,26 ± 0,02
		Sapa	1,51 ± 0,04
		Văn Bàn	5,77 ± 0,03

*Ghi chú: Kết quả được trình bày dưới dạng trung bình ± SD

4. KẾT LUẬN

Hàm lượng huperzin A trong cây Thông đất (*Huperzia squarrosa* (G. Forst.) Trev.) đã được định lượng bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao có kết nối khối phổ LC-MS/MS. Phương pháp đáp ứng được yêu cầu của một phương pháp định lượng về độ đặc hiệu, độ lặp lại, độ thu hồi...theo các yêu cầu chung của ICH. Kết quả phân tích hàm lượng huperzin A trong các mẫu Thông đất thu hái tại 10 tỉnh miền núi phía Bắc Việt Nam nằm trong khoảng từ 0,49 đến 27,92 µg/g, cao nhất là hàm lượng

huperzin A trong cây Thông đất thu tại huyện Na Hang -Tuyên Quang 27,92 µg/g và thấp nhất là mẫu Thông đất thu tại Đình Hóa - Thái Nguyên 0,49 µg/g.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Nguyễn Ngọc Chương, Trần Mạnh Hùng, Trần Thị Kim Dung, Trần Công Luận (2016). Thiết lập chất chuẩn và định lượng Huperzin A trong một số loài họ Thạch tùng ở Việt Nam. *Journal of Science and Technology*, 54 (2C), 417-424.

2. Nguyễn Ngọc Chương, Trần Công Luận (2014). Isolation of huperzine A from *Huperzia squarrosa* (Forst.) Trevis., Lycopodiaceae. *Tạp chí Dược liệu*, 19 (1), 22-26.
3. Vũ Thị Ngọc, Phạm Thị Hạnh, Lê Thị Lan Anh, Nguyễn Tiến Đạt, Lê Thị Bích Thủy (2016). Định tính và định lượng Huperzine A trong cây Thạch tùng răng cưa (*Huperzia serrata*) ở Đà Lạt, tỉnh Lâm Đồng. *Tạp chí Công nghệ Sinh học*, 14(3), 473-478.
4. Sahidan N., Choo C. Y., Latiff A., Jaman R. (2012). Variations of huperzine A content in Lycopodiaceae species from tropics. *Chin. J. Nat. Med*, 10, 125-128.
5. Thorroad S. et al (2014). Three new Lycopodium alkaloids from *Huperzia carinata* and *Huperzia squarrosa*. *Tetrahedron* 70, 8017-8022.
6. Wu Q, Gu Y (2006). "Quantification of Huperzine A in *Huperzia serrata* by HPLC-UV and identification of the major constituents in its alkaloid extracts by HPLC-DAD- MS-MS". *J Pharm Biomed Anal* 40: 993-998
7. Zhao X. M., Wang Z. Q., Shu S. H., Wang W. J., Xu H. J., Ahn Y. J., Wang M., Hu X. (2013). Ethanol and Methanol Can Improve Huperzine A Production from Endophytic *Colletotrichum gloeosporioides* ES026. *PLoS ONE* 8:4, e61777.

QUANTITY OF HUPERZIN A IN *HUPERZIA SQUARROSA* (G. FORST.) TREV. IN NORTHERN MOUNTAINOUS PROVINCES

Tran Thi Thu Ha¹, Nguyen Thi Trang¹,

Ngo Thi Tinh², Khuat Huu Trung³, Nguyen Tien Dung¹,

¹ Thai Nguyen University of Agriculture and Forestry

² Thai Nguyen National Hospital

³ Agricultural Genetics Institute

Summary

This study, shows the quantitative huperzin A in *Huperzia squarrosa* (G. Forst.) Trev. By high-performance liquid chromatography. The chromatographic method was performed on Shimpack C18 reverse phase column (100 x 2.1 mm; 1.9 μm), The mobile phase solvent consisted of: Channel A: 0.1% formic acid; Channel B: acetonitrile, flow rate: 0.4 ml /min. The construction standard lines are highly linear (R²>0.99). The method of high repeatability with RSD% values is less than 3.7% (meeting the requirements of ICH). The recovery of the method ranges from 98.3% to 101.4%. Results of analyzing huperzin A content in samples Pine soil collection in 10 northern mountainous provinces of Vietnam ranges from 0.49 to 27.92 μg/g. The highest was huperzin A in *Huperzia squarrosa* (G. Forst.) Trev.) in Na Hang district, Tuyen Quang province at 27.92 μg/g and the lowest was in *Huperzia squarrosa* (G. Forst.) Trev.) in Dinh Hoa district, Thai Nguyen province 0.49 μg/g.

Keywords: *Huperzia squarrosa*, HPLC, Huperzin A, *Huperzia squarrosa* (G. Forst.) Trev.

Người phản biện: TS. Vũ Huy Định

Ngày nhận bài: 6/8/2019

Ngày thông qua phản biện: 1/10/2019

Ngày duyệt đăng: 1/10/2019