

TỐI ƯU HÓA QUY TRÌNH TỔNG HỢP METHYL SALICYLAT BẰNG PHƯƠNG PHÁP ĐÁP ỨNG BỀ MẶT

Nguyễn Ngọc Anh Đào^{1*}, Nguyễn Anh Đào²

APPLICATION OF RESPONSE SURFACE METHODOLOGY TO OPTIMIZE THE SYNTHESIS OF METHYL SALICYLATE

Nguyen Ngoc Anh Dao^{1*}, Nguyen Anh Dao²

Tóm tắt – Methyl salicylat được tổng hợp qua phản ứng ester hóa acid salicylic và methanol. Tuy nhiên, phản ứng xảy ra theo cân bằng thuận nghịch. Do đó, tối ưu hóa quy trình tổng hợp methyl salicylat bằng phương pháp đáp ứng bề mặt (Response Surface Methodology – RSM) là cần thiết, giúp nâng cao hiệu quả, giảm chi phí. Đối tượng nghiên cứu là phản ứng tổng hợp methyl salicylat. Sản phẩm từ phản ứng được tinh chế bằng phương pháp chưng cất phân đoạn, kiểm tra độ tinh khiết bằng sắc ký lớp mỏng. Cấu trúc sản phẩm được khẳng định qua các phổ IR, MS và NMR. Phương pháp đáp ứng bề mặt được sử dụng để tối ưu hóa các điều kiện của quá trình phản ứng (thời gian phản ứng (X1), nhiệt độ phản ứng (X2), nồng độ xúc tác (X3), tỉ lệ tác chất acid salicylic và methanol (X4)). Hiệu suất tổng hợp (Y) là yếu tố đáp ứng. Sau khi tối ưu, thời gian phản ứng là 6 giờ, nhiệt độ 82,12°C, nồng độ xúc tác 10%, tỉ lệ tác chất 10% đạt hiệu suất cao nhất là 89,07%. Thông số này đã được so sánh với thực nghiệm và kết quả cho thấy không có sự sai số lớn ($P = 0,03 < 0,05$).

Từ khóa: methyl salicylat, phản ứng ester hóa, phương pháp đáp ứng bề mặt.

Abstract – Methyl salicylate is obtained through the esterification reaction of salicylic

acid with methanol. However, the reaction is considered a reversible reaction. Therefore, optimizing the synthesis process of methyl salicylate using response surface methodology is necessary to improve efficiency and reduce costs. The object of the study is the synthesis reaction of methyl salicylate. The product from the reaction was purified by using fractional distillation, and its purity was checked by thin-layer chromatography. IR, MS, and NMR spectra confirmed the product structure. The response surface methodology is used to optimize the reaction conditions (reaction time (X1), reaction temperature (X2), catalyst concentration (X3), and the ratio of salicylic acid and methanol (X4)). Synthetic efficiency (Y) is a response factor in evaluating the optimal process. The reaction period is 6 hours, the temperature is 82.12°C, the catalyst concentration is 10%, the ratio of reactants is 10%, and the highest efficiency is 89.07%, according to the optimization results. These parameters were compared with experimental results, and the outcome showed no significant deviation ($P = 0.03 < 0.05$).

Keywords: esterification reaction, methyl salicylate, response surface methodology.

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Methyl salicylate (MeSA) là ester của acid salicylic và methanol. Trong tự nhiên, chất này được một số loài thực vật như lộc đề, bạch dương tiết ra để tự bảo vệ chống lại côn trùng gây hại [1]. Trong y học, MeSA có công dụng giảm đau, chống viêm và thường được bào chế thành dầu xoa bóp [2]. Chất này còn được ứng dụng làm mỹ phẩm, thuốc trừ sâu sinh học [3]. Quá trình

^{1,2}Trường Đại học Trà Vinh

Ngày nhận bài: 31/01/2023; Ngày nhận bài chỉnh sửa: 29/3/2023; Ngày chấp nhận đăng: 05/4/2023

*Tác giả liên hệ: nadao@tvu.edu.vn

¹Trà Vinh University, Vietnam

Received date: 31st January 2023; Revised date: 29th March 2023; Accepted date: 05th April 2023

*Corresponding author: nadao@tvu.edu.vn

chiết xuất MeSA từ tự nhiên tốn nhiều thời gian, hiệu suất thấp (khoảng 6,88%), giá thành cao [4]. MeSA sử dụng trong thương mại đa phần có nguồn gốc tổng hợp, thu được thông qua phản ứng ester hóa hai nguyên liệu là acid salicylic và methanol. Phương pháp này có nhược điểm là xảy ra theo cân bằng thuận nghịch, phản ứng không hoàn toàn. Do đó, trong nghiên cứu này, phương pháp đáp ứng bề mặt đã được sử dụng để tối ưu hóa quy trình tổng hợp MeSA nhằm nâng cao hiệu quả, giảm chi phí, thúc đẩy mở rộng quy mô sản xuất tại Việt Nam. Nghiên cứu cũng góp phần đảm bảo nguồn cung cấp nguyên liệu hóa được trong nước.

II. TỔNG QUAN NGHIÊN CỨU

Trong phản ứng ester hóa acid salicylic và methanol để tạo methyl salicylat, acid sunfuric có vai trò là tác nhân, xúc tác phản ứng đến trạng thái cân bằng nhanh hơn. Do đó, tỉ lệ tác chất và xúc tác sẽ ảnh hưởng đáng kể đến năng suất tổng hợp MeSA. Ngoài ra, hai yếu tố nhiệt độ và thời gian phản ứng cũng ảnh hưởng mạnh đến hiệu quả tổng hợp. Đối với nhiệt độ tiến hành, Zhang Xuhong (2011) đã thực hiện phản ứng ở dãy nhiệt độ 90 – 100°C [5]. Qua thực tế khảo sát điều kiện phản ứng, bắt đầu từ 90°C, nếu nhiệt độ tăng lên thêm 10°C hoặc 20°C thì năng suất không tăng thêm, ngược lại phản ứng còn xuất hiện tạt và giảm năng suất tổng hợp. Nếu nhiệt độ khảo sát từ 60°C đến 70°C, năng suất giảm do kéo dài thời gian phản ứng và dễ xuất hiện tạt chất hơn so với mức nhiệt độ cao. Do đó, hai mức cực tiểu và cực đại của nhiệt độ được chọn trong nghiên cứu là 75°C đến 90°C.

Zhang Xuhong đã thực hiện phản ứng ở thời gian từ 5 – 6 giờ [5]. Khảo sát khoảng thời gian thực hiện phản ứng, sau ba giờ đạt nhiệt độ thiết kế, sản phẩm được tạo thành. Tuy nhiên, sản phẩm vẫn còn vết nguyên liệu. Sau khoảng thời gian 6 giờ, vết nguyên liệu gần như hết. Tiếp tục khảo sát cùng điều kiện ở thời gian phản ứng kéo dài đến 10,5 giờ thì tổng hợp cho năng suất giảm, xuất hiện thêm tạt chất khó loại bỏ bằng các phương pháp tinh chế. Do đó, thời gian phản ứng được lựa chọn trong nghiên cứu là từ 6 đến 9 giờ. Đây là khoảng thời gian lí tưởng để các chất ban đầu phản ứng hết và hạn chế xuất hiện tạt chất.

Nồng độ xúc tác H₂SO₄ đậm đặc cũng đóng vai trò quan trọng đến năng suất tổng hợp trong các phản ứng ester hóa. Ở nồng độ thấp, phản ứng tốn nhiều thời gian để đạt được trạng thái cân bằng và cho hiệu suất rất thấp. Ở nồng độ cao, từ 40% trở lên, chất xúc tác bão hòa tác dụng nồng độ xúc tác tăng không làm tăng tỉ lệ hút nước trong phản ứng mà còn làm tốn chi phí. Do đó, nồng độ xúc tác tối ưu nhất được chọn từ 10% đến 30% [6, 7].

Nếu tỉ lệ tác chất ban đầu giữa methanol và acid salicylic thấp thì lượng dung môi không đủ để hòa tan hết sản phẩm, giảm năng suất tổng hợp MeSA [8]. Nếu tỉ lệ này cao, thí nghiệm phải diễn ra trong thời gian dài để đảm bảo phản ứng hoàn toàn, tốn thời gian và chi phí. Tuy nhiên, năng suất cũng không được cải thiện tốt hơn. Qua khảo sát, tỉ lệ methanol : acid salicylic phù hợp để tối ưu hóa là từ 10:1 đến 15:1.

Từ những kết quả nghiên cứu và khảo sát sơ bộ trên, thiết kế phức hợp trung tâm (CCD) trong phương pháp đáp ứng bề mặt (RSP) được lựa chọn nhằm tối ưu hóa các điều kiện của quá trình phản ứng gồm: thời gian phản ứng (X1), nhiệt độ phản ứng (X2), nồng độ xúc tác (X3), tỉ lệ tác chất acid salicylic và methanol (X4). Phương pháp này thể hiện rõ các ảnh hưởng liên quan đến từng biến cụ thể ở nhiều mức độ và được trình bày qua mô hình đáp ứng, khắc phục được khuyết điểm của khảo sát Two-level factorial hay fractional factorial designs [9].

III. PHƯƠNG PHÁP VÀ PHƯƠNG TIỆN NGHIÊN CỨU

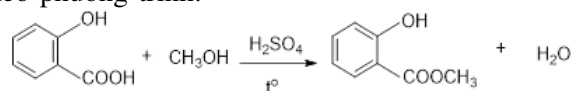
A. Thời gian và địa điểm thí nghiệm

Thí nghiệm được thực hiện tại Phòng Thí nghiệm Khoa Y – Dược, Trường Đại học Trà Vinh từ tháng 5/2020 đến 8/2020.

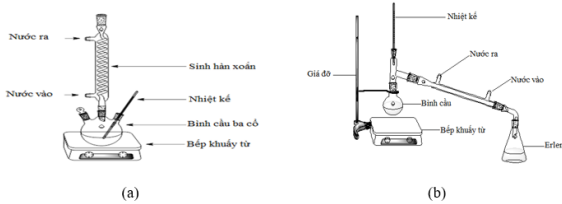
B. Phương pháp bố trí thí nghiệm

Phương pháp tổng hợp methyl salicylat

MeSA được tạo ra từ phản ứng ester hóa của acid salicylic và methanol với xúc tác H₂SO₄ theo phương trình:



Cách tiến hành: Hòa tan 1,38 g acid salicylic (10 mmol) với 4 mL methanol trong bình cầu ba cổ 250 mL, thêm 0,25 mL H₂SO₄ đậm đặc. Đun hoàn lưu cách cát ở 90°C trong 6 giờ theo bố trí thí nghiệm như Hình 1. Sau khi hoàn thành



Hình 1: Bố trí thí nghiệm tổng hợp methyl salicylat (a); chưng cất sản phẩm (b)

thí nghiệm theo thời gian của mô hình thiết kế, sản phẩm tiếp tục chuyển sang máy cô quay chân không để thu hồi methanol thừa (nhiệt độ chưng cất khoảng 65°C) và cô quay đến khi không còn giọt dung môi qua bình hứng. Hỗn hợp trong bình cô quay được làm nguội. Sau đó, hỗn hợp được đổ vào bình lắng gạn, tráng sạch bình cô quay bằng dung dịch NaHCO₃ bão hòa và tiếp tục cho thêm 5 mL NaHCO₃ bão hòa vào bình lắng gạn. Lắc nhẹ bình lắng gạn rồi để yên, thu lấy lớp dưới. Rửa lớp dưới bằng NaHCO₃ bão hòa nhiều lần (3–5 lần) để loại acid tự do. Tiếp tục rửa hỗn hợp với lần lượt 5 và 10 mL nước cất. Cho hỗn hợp vào becher, thêm khoảng 0,5 g Na₂SO₄ khan. Gạn lấy lớp ester sạch.

Phương pháp tinh chế methyl salicylat

Chưng cất phân đoạn dùng để tách các chất bay hơi ra khỏi một hỗn hợp dựa vào sự khác biệt nhiệt độ sôi của các chất trong hỗn hợp. Ở thí nghiệm này, bình cầu đựng sản phẩm được gia nhiệt đến 220°C (nhiệt độ sôi MeSA).

Phương pháp thiết kế thí nghiệm và tối ưu hóa

Thiết kế thí nghiệm

Bốn yếu tố ảnh hưởng đến quá trình tổng hợp MeSA được lựa chọn là thời gian phản ứng (X1), nhiệt độ phản ứng (X2), nồng độ xúc tác (X3), tỉ lệ tác chất acid salicylic và methanol (X4) với thông số đáp ứng là hiệu suất tổng hợp (Y). Mỗi yếu tố được chia làm hai mức thay đổi cực đại và cực tiểu được xác định dựa trên kết quả khảo sát sơ bộ quy trình tổng hợp MeSA và tài liệu tham khảo [5–7].

Bảng 1: Mức khảo sát của các yếu tố ảnh hưởng đến hiệu suất tổng hợp

Các mức	Thời gian (X1)	Nhiệt độ (X2)	Nồng độ xúc tác (X3)	Tỉ lệ tác chất (X4)
Cực tiểu	6 h	75°C	10%	10%
Cực đại	9 h	90°C	30%	15%

Các mức của bốn yếu tố khảo sát được nhập vào phần mềm Minitab 19. Nghiên cứu sử dụng phương pháp thiết kế phức hợp trung tâm (CCD) để thiết kế ma trận các thí nghiệm cần tiến hành.

Tối ưu hóa

Các kết quả thực nghiệm thu được sau khi tiến hành thí nghiệm theo ma trận được nhập vào phần mềm Minitab 19. Lập phương trình hồi quy bậc hai về mối tương quan giữa biến phụ thuộc và biến độc lập. Điều kiện tối ưu của phản ứng được Minitab 19 dự đoán. Để thẩm định kết quả của mô hình, chúng tôi tiến hành thí nghiệm với các giá trị dự đoán nhằm đánh giá sự tương quan giữa kết quả thực nghiệm và kết quả tính toán trên phần mềm.

Kiểm tra độ tinh khiết và xác định cấu trúc

Kiểm tra độ tinh khiết bằng phương pháp sắc kí lớp mỏng

Độ tinh khiết của chất được kiểm tra bằng sắc kí lớp mỏng (SKLM). Vết chấm nguyên liệu là dung dịch acid salicylic chuẩn trong methanol, vết chấm sản phẩm là sản phẩm thu được sau phản ứng, phát hiện vết bằng cách quan sát dưới UV 254 nm.

Xác định cấu trúc sản phẩm

Sản phẩm tinh khiết được xác định cấu trúc bằng các phương pháp: phổ hấp thụ hồng ngoại (IR – Infrared Spectroscopy), khối phổ (MS – Mass Spectrometry), phổ cộng hưởng từ hạt nhân (NMR – Nuclear Magnetic Resonance).

Kiểm nghiệm: Sản phẩm tạo thành được kiểm nghiệm tiêu chuẩn chất lượng theo Dược điển Việt Nam V (chuyên luận MeSA) [10].

IV. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

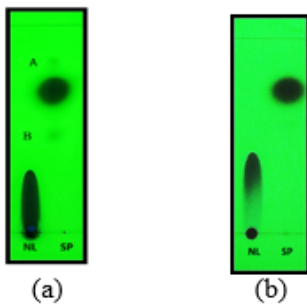
A. Tổng hợp methyl salicylat

MeSA, sau khi được tổng hợp theo phương pháp ở mục III, được kiểm tra độ tinh khiết bằng SKLM với pha tĩnh là silica gel F254, pha động là hệ n-hexan: ethyl acetat (8:2). Ở bước sóng 254 nm, vết sản phẩm chính khác biệt với vết nguyên

liệu. Tuy nhiên, sản phẩm vẫn còn lẫn hai tạp chất là tạp A và tạp B trên sắc kí đồ (Hình 2).

B. Tinh chế methyl salicylat

Sau quá trình chưng cất phân đoạn, tiến hành SKLM với hệ dung môi n-hexan: ethyl acetat (8:2) để kiểm tra độ tinh khiết của sản phẩm. Kết quả cho thấy chỉ còn một vết chính trên sắc kí đồ. Điều này chứng tỏ quá trình chưng cất đã loại bỏ được các tạp chất là sản phẩm phụ của phản ứng (Hình 2).



Hình 2: Kết quả kiểm tra độ tinh khiết bằng phương pháp SKLM

C. Kết quả thiết kế thí nghiệm và thực nghiệm

Các biến độc lập được nhập vào phần mềm Minitab 19 và thu được kết quả thiết kế gồm 31 thí nghiệm. Tiến hành thực nghiệm và xác định hiệu suất của mỗi phản ứng. Kết quả được trình bày ở Bảng 2.

Từ các số liệu thu được, phần mềm Minitab 19 đưa ra dự đoán điều kiện tối ưu của phản ứng: thời gian 6 giờ, nhiệt độ 82,1212°C, nồng độ xúc tác 10%, tỉ lệ tác chất 10% với hiệu suất 89,07%. Kết quả dự đoán được kiểm chứng lại bằng cách thực hiện phản ứng ở điều kiện tối ưu 6 lần để đánh giá sự khác biệt giữa giá trị dự đoán và thực tế (Bảng 3).

Xác định cấu trúc sản phẩm

Phổ IR: phổ IR của MeSA

Phổ IR của sản phẩm (Hình 3) có các đỉnh đặc trưng chứng minh sự tạo thành nhóm ester: 1211 cm⁻¹ (νC-O), 1673 cm⁻¹ (νC=O). Ngoài ra, phổ IR cũng ghi nhận sự hiện diện của nhóm OH phenol có sẵn từ cấu trúc của nguyên liệu acid

Bảng 2: Kết quả thiết kế thí nghiệm và hiệu suất thu được từ thực nghiệm

TT	Giá trị của các biến				Hiệu suất (%)
	X1	X2	X3	X4	
1	6	75	10	10	67,6
2	9	75	10	10	88,8
3	6	90	10	10	85,5
4	9	90	10	10	54,7
5	6	75	30	10	71,4
6	9	75	30	10	42,7
7	6	90	30	10	71,5
8	9	90	30	10	40,5
9	6	75	10	15	66
10	9	75	10	15	46,3
11	6	90	10	15	54,1
12	9	90	10	15	58,8
13	6	75	30	15	48,6
14	9	75	30	15	45,5
15	6	90	30	15	42,8
16	9	90	30	15	36,2
17	6	82,5	20	12,5	86,7
18	9	82,5	20	12,5	58,1
19	7,5	75	20	12,5	61,1
20	7,5	90	20	12,5	42,8
21	7,5	82,5	10	12,5	58,4
22	7,5	82,5	30	12,5	62,6
23	7,5	82,5	20	10	67,3
24	7,5	82,5	20	15	41,9
25	7,5	82,5	20	12,5	62,6
26	7,5	82,5	20	12,5	66,5
27	7,5	82,5	20	12,5	58,1
28	7,5	82,5	20	12,5	52,4
29	7,5	82,5	20	12,5	55,8
30	7,5	82,5	20	12,5	64,7
31	7,5	82,5	20	12,5	61,9

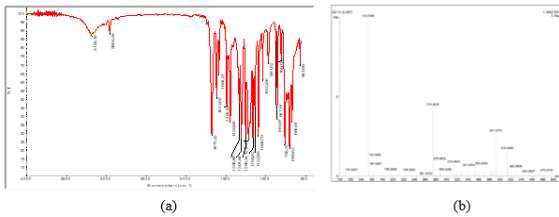
Bảng 3: Kết quả thực nghiệm kiểm chứng điều kiện tối ưu

TT	Hiệu suất (%)	
	Dự đoán	Thực nghiệm
1	89,07	89,6
2	89,07	92,8
3	89,07	90,3
4	89,07	91,7
5	89,07	90,6
6	89,07	89,2
Trung bình	89,07	90,7
P	P = 0,03 < 0,05	

salicylic: 3183 cm⁻¹ (νO-H), 1327 cm⁻¹ (δO-H).

Khối phổ MS

Phổ MS (Hình 3) cho giá trị pic ion giả phân tử [M+H]⁺ có cường độ cao và phù hợp với dự kiến. Công thức phân tử (CTPT) dự kiến: C₈H₈O₃; khối lượng phân tử (KLPT) dự kiến: 152,0473; [M+H]⁺ dự kiến: 153,0552; [M+H]⁺ tìm thấy: 153,0552.



Hình 3: Kết quả phổ hấp thụ hồng ngoại của MeSA (a) và khối phổ của MeSA (b)

Phổ cộng hưởng từ hạt nhân

Phân tích dữ liệu phổ của MeSA (Bảng 4) cho thấy phổ cộng hưởng từ hạt nhân ¹H-NMR thể hiện đầy đủ các đỉnh đúng CTPT dự kiến. Phổ ¹³C-NMR xuất hiện 08 tín hiệu. Các tín hiệu này có giá trị độ dịch chuyển phù hợp với từng loại C tương ứng trong sản phẩm.

Bảng 4: Dữ liệu phổ NMR của MeSA

Nhóm	¹ H (ppm), số H, hình dạng mũ, J (Hz)	¹³ C (ppm)
CH ₃	3,95; 3H; s	52,8
C ₁	-	113,6
C ₂	-	162,7
C ₃	7,84; 1H; m	118,4
C ₄	6,90; 1H; m	136,8
C ₅	7,48; 1H; m	120,3
C ₆	6,94; 1H; m	131,0
C=O	-	171,8

Các kết quả phân tích cho thấy cấu trúc của sản phẩm MeSA phù hợp với dự kiến.

Kiểm nghiệm

Bảng 5: Kiểm nghiệm theo chuyên luận MeSA của Dược điển Việt Nam V

Chỉ tiêu	Mức chất lượng	Kết quả	
Tính chất	Chất lỏng không màu hay màu vàng nhạt; rất khó tan trong nước, trộn lẫn được với ethanol 96%, dầu béo và tinh dầu	Đạt	
Định tính	Phản ứng A	Tủa tinh thể tạo thành	Đúng
	Phản ứng B	Tủa này phải có điểm chảy từ 156°C đến 161°C	Tủa có điểm chảy là 159°C
		Dung dịch chuyển sang màu tím	Đúng
	Độ trong	Dung dịch thu được trong suốt	Đúng
	Màu sắc dung dịch	Không được đậm màu hơn dung dịch màu mẫu V ₇	Đúng
Giới hạn acid	Lượng dung dịch natri hydroxyd 0,1 N (CĐ) dùng để giữ màu xanh lam không được quá 0,4 mL	Đúng; 0,1 mL	
Định lượng	Lượng dung dịch natri hydroxyd 0,1 N (CĐ) đã dùng để xà phòng hóa	Đạt, hàm lượng MeSA 99,6% (Thử nghiệm được lặp lại 06 lần với RSD% = 0,43%)	

V. KẾT LUẬN

Qua khảo sát quá trình tổng hợp MeSA, các yếu tố ảnh hưởng đến hiệu suất gồm: nhiệt độ, thời gian, nồng độ xúc tác và tỉ lệ tác chất. Thiết kế thí nghiệm trên phần mềm Minitab 19 và tiến hành thực nghiệm theo ma trận do phần mềm vạch ra để khảo sát đồng thời ảnh hưởng của các yếu tố trên. Xác định được điều kiện tối ưu là thời gian 6 giờ, nhiệt độ 82,12°C, nồng độ xúc tác 10%, tỉ lệ tác chất 10% với hiệu suất 89,07%. Các phổ IR, MS, ¹H-NMR, ¹³C-NMR đã chứng minh được cấu trúc sản phẩm tổng hợp là MeSA. Sản phẩm được đánh giá chất lượng đạt tiêu chuẩn của Dược điển Việt Nam V [10]. Đây là thông tin cần thiết, góp phần bổ sung dữ liệu cho những nghiên cứu trước đó cũng như khảo sát được điều kiện tối ưu để nâng cao hiệu suất tổng hợp MeSA.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Kim J, Seo S. M, Park IK. Nematicidal activity of plant essential oils and components from *Gaultheria fragrantissima* and *Zanthoxylum alatum* against the pine wood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus*. *Nematology*. 2011;13(1): 87–93.
- [2] Zhang D, Liu R, Sun L, Huang C, Wang C, Zhang D-M, et al. Anti-inflammatory activity of methyl salicylate glycosides isolated from *Gaultheria yunnanensis* (Franch.) Rehd. *Molecules*. 2011;16(5): 3875–3884.
- [3] Park SW, Liu PP, Forouhar F, Vlot AC, Tong L, Tietjen K, et al. Use of a synthetic salicylic acid analog to investigate the roles of methyl salicylate and its esterases in plant disease resistance. *Journal of Biological Chemistry*. 2009;284(11): 7307–7317.
- [4] Sayyari M, Babalar M, Kalantari S, Martínez-Romero D, Guillén F, Serrano M, et al. Vapour treatments with methyl salicylate or methyl jasmonate alleviated chilling injury and enhanced antioxidant potential during postharvest storage of pomegranates. *Food Chemistry*. 2011;124(3): 964–970.
- [5] Zhang Xuhong. *Synthesis method of methyl salicylate patent, CN102267911A*. 2011. <https://patents.google.com/patent/CN102267911A/en> [Ngày truy cập 04/04/2023].
- [6] Isa KM, Daud S, Hamidin N, Ismail K, Saad SA, Kasim FHJIC, et al. Thermogravimetric analysis and the optimisation of bio-oil yield from fixed-bed pyrolysis of rice husk using response surface methodology (RM). *Materials Science*. 2011;33(2): 481–487.
- [7] Yoo In Sang, Park SJ, Yoon HH. Enzymatic synthesis of sugar fatty acid esters. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*. 2007;13(1): 1–6.
- [8] Yahya AR, Anderson WA, Moo-Young MJE. Ester synthesis in lipase-catalyzed reactions. *Enzyme and Microbial Technology*. 1998;23(7-8): 438–450.
- [9] Mathews PG. *Design of Experiments with MINITAB: Quality Press*. USA: New Age International; 2004.
- [10] Bộ Y tế. *Dược điển Việt Nam V*. Hà Nội: Nhà Xuất bản Y học; 2018.

