

Xây dựng quy trình định lượng acid asperulosidic trong cao chiết từ bài thuốc thoái hóa cột sống của Lương y Nguyễn Thiện Chung bằng phương pháp *HPLC*

Phạm Ngọc Thạc^{1,2}, Huỳnh Trần Quốc Dũng²
Võ Thanh Hóa³, Nguyễn Đức Hạnh^{1*}

¹Khoa Dược, Đại học Y Dược TP. Hồ Chí Minh

²Bệnh viện Y học cổ truyền TP. Hồ Chí Minh

³Khoa Dược, Đại học Y khoa Đà Bắc, Đà Loan

Summary

A remedy of physician Nguyen Thien Chung which comprises 13 medicinal herbs (BT) has been using for spinal degeneration treatment due to its analgesic and anti-inflammatory activities. Quantification of asperulosidic acid, one major bioactive compound of BT, plays an important role in controlling the quality of the extract of BT. This study was conducted to develop a method for asperulosidic acid quantification in extract of BT by high performance liquid chromatography (HPLC). Different conditions for asperulosidic acid extraction and HPLC determination from extract of BT was screened and the best condition was selected. The HPLC method was validated according to the ICH guidelines on system suitability, specificity, linearity, precision and accuracy. The method of sample preparation was optimized using methanol as a solvent for asperulosidic acid extraction and the ratio of BT extract and methanol was at 500:25 (mg/ml). The best HPLC condition for determination of asperulosidic acid employed a C18 Synchronis column (250×4.6 mm; 5 μm), a detection wavelength of 236 nm, a column temperature of 30 °C, a flow rate of 1 ml/min, and an injection volume of 10 μl. Mobile phase was mixture of acetonitrile and H₃PO₄ 0.1 % at a ratio of 10:90 (v/v). There was good correlation between peak areas and asperulosidic acid concentrations ($r^2 = 0.9998$). The RSD values of inter-day precision were found to be at 0.41 %. The recovery percentages were of 95 – 105%. The HPLC method for asperulosidic acid quantification in the extract of BT was reported for the first time. The proposed method met the requirements of validation and could be useful for establishing the quality standards of the extract of BT and its related products.

Keywords: Asperulosidic acid, HPLC, the spinal degeneration remedy.

Đặt vấn đề

Bài thuốc (BT) thoái hóa cột sống của Lương y Nguyễn Thiện Chung là bài thuốc gồm 13 dược liệu (mã đề, cốt xay, cỏ tranh, dây măng bát, râu mèo, ý dĩ, cỏ xước, nhàu, đũng định, mía dò, rau bợ, mướp gai, đinh lăng lá xé). BT đã được Lương y Nguyễn Thiện Chung sử dụng

điều trị thành công bệnh thoái hóa cột sống lưng, lợi thủy, trị sỏi thận tại tỉnh An Giang và một số tỉnh lân cận. Năm 2020, Nguyễn Cao Sang và CS. đã chứng minh các tác dụng giảm đau và kháng viêm của BT trên chuột [1].

Acid asperulosidic (hình 1) là một hoạt chất của BT được ghi nhận có tác dụng kháng viêm với cơ chế giảm sản xuất oxit nitric (NO), prostaglandin E2 (PGE2), yếu tố hoại tử khối u (TNF-α), interleukin-6 (IL-6) và ức chế synthase oxit cảm ứng (iNOS), cyclooxygenase-2 (COX-2) [2]. Với mục tiêu xây dựng tiêu chuẩn cơ sở và góp phần kiểm soát quá trình sản xuất cao chiết từ BT, việc định lượng acid asperulosidic

Chịu trách nhiệm: Nguyễn Đức Hạnh

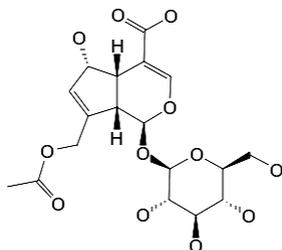
Email: duchanh@ump.edu.vn

Ngày nhận: 04/9/2020

Ngày phản biện: 26/10/2020

Ngày duyệt bài: 29/10/2020

trong cao chiết BT cần được nghiên cứu. Vì vậy, nghiên cứu được thực hiện với mục tiêu là xây dựng và thẩm định quy trình định lượng acid asperulosidic trong cao chiết từ BT bằng phương pháp **HPLC**.



Hình 1. Cấu trúc hóa học của acid asperulosidic

Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

Đối tượng và nguyên liệu

Cao khô phun sấy BT (số lô NC1019), acid asperulosidic chuẩn làm việc (hàm lượng 97,41 %) được cung cấp bởi Khoa Dược, Đại học Y Dược Thành phố Hồ Chí Minh. Methanol đạt tiêu chuẩn phân tích (Hãng Merck, Đức). Acetonitril (Scharlau, Tây Ban Nha) và nước cất 2 lần đạt tiêu chuẩn dùng cho **HPLC**.

Phương pháp nghiên cứu

Khảo sát quy trình xử lý mẫu

Chọn loại dung môi chiết xuất acid asperulosidic chuẩn bị mẫu thử

Dung dịch đối chiếu: Dung dịch acid asperulosidic nồng độ 30 µg/ml trong methanol.

Dung dịch thử: Cân chính xác khoảng 500 mg cao BT, cho vào bình định mức 25 ml. Thêm 20 ml methanol, siêu âm 15 phút, để nguội đến nhiệt độ phòng, bổ sung methanol đến vạch, lắc đều, lọc. Tiến hành tương tự với các dung môi ethanol, acetonitril và nước.

So sánh kết quả chiết xuất bằng phương pháp sắc ký lớp mỏng (**TLC**) với hệ dung môi triển khai CH₃Cl – MeOH – H₂O (65:35:10, lớp dưới) và phát hiện bằng thuốc thử H₂SO₄ 10% trong ethanol (sấy ở 105 °C). Dựa vào kết quả **TLC** lựa chọn dung môi chiết được acid asperulosidic và ít tạp nhất.

Khảo sát chọn tỷ lệ cao BT : dung môi chuẩn bị mẫu thử

Dùng dung môi chiết xuất được chọn ở trên để khảo sát chọn tỷ lệ cao BT : dung môi

chuẩn bị mẫu thử. Tiến hành thực nghiệm với 2 tỷ lệ cao BT : dung môi sau:

Tỷ lệ 1: Cân chính xác 500 mg cao BT và chiết với 25 ml dung môi được chọn.

Tỷ lệ 2: Cân chính xác 500 mg cao BT và chiết với 50 ml dung môi được chọn.

Chiết xuất bằng phương pháp siêu âm trong 15 phút, chuẩn bị 3 mẫu thử riêng biệt cho mỗi tỷ lệ. Kiểm tra hiệu suất chiết acid asperulosidic của 2 tỷ lệ khảo sát bằng phương pháp **HPLC** theo điều kiện sắc ký được chọn. Chọn tỷ lệ có thể tích dung môi chiết thấp và chiết được tối đa chất điểm chỉ acid asperulosidic.

Khảo sát điều kiện HPLC định lượng acid asperulosidic trong cao BT

Khảo sát điều kiện **HPLC** định lượng acid asperulosidic trong cao BT sử dụng hệ thống Shimadzu LC-2030C 3D plus, detector PDA (Nhật Bản), cột sắc ký C18 Synchronis™ (250 x 4,6 mm; 5 µm) và tiền cột HQ 105 C18 (10 x 4,6 mm; 5 µm) (Thermo Scientific, Mỹ), nhiệt độ cột 30 °C, bước sóng phát hiện 236 nm, thể tích tiêm mẫu 10 µl. Thẩm dò một số chương trình pha động (bảng 1). Chọn điều kiện **HPLC** sao cho pic acid asperulosidic tách hoàn toàn khỏi các pic tạp trong mẫu thử và các thông số sắc ký đạt yêu cầu.

Bảng 1. Các pha động khảo sát điều kiện HPLC định lượng acid asperulosidic trong cao BT

Điều kiện pha động	% acetonitril	% nước	% dung dịch H ₃ PO ₄ 0,1%
I	12	88	-
II	12	-	88
III	10	-	90

Thẩm định quy trình định lượng acid asperulosidic trong cao BT

Thẩm định quy trình định lượng acid asperulosidic trong cao BT theo hướng dẫn của ICH về tính tương thích hệ thống, tính đặc hiệu, tính tuyến tính, độ chính xác và độ đúng [3].

Kết quả và bàn luận

Khảo sát quy trình xử lý mẫu

Chọn loại dung môi chuẩn bị mẫu thử

Kết quả **TLC** khảo sát thành phần dịch chiết cao BT bằng 4 dung môi khác nhau (nước, methanol, acetonitril, ethanol tuyệt đối) được trình bày trong hình 2.



AS: Dung dịch acid asperulosidic đối chiếu
ACN: Dịch chiết acetonitril
Et: Dịch chiết ethanol tuyệt đối
Me: Dịch chiết methanol
H₂O: Dịch chiết nước

Hình 2. TLC phân tích các dịch chiết cao BT bằng các dung môi chuẩn bị mẫu khác nhau

Kết quả **TLC** cho thấy acetonitril gần như không chiết được chất diềm chỉ acid asperulosidic. Ethanol tuyệt đối, methanol và nước đều chiết được acid asperulosidic, trong đó methanol chiết được nhiều chất diềm chỉ acid asperulosidic và kéo theo ít tạp chất hơn. Vì vậy, methanol được chọn làm dung môi chiết xuất acid asperulosidic từ cao BT để điều chế mẫu thử.

Khảo sát chọn tỷ lệ cao BT : dung môi methanol chuẩn bị mẫu thử

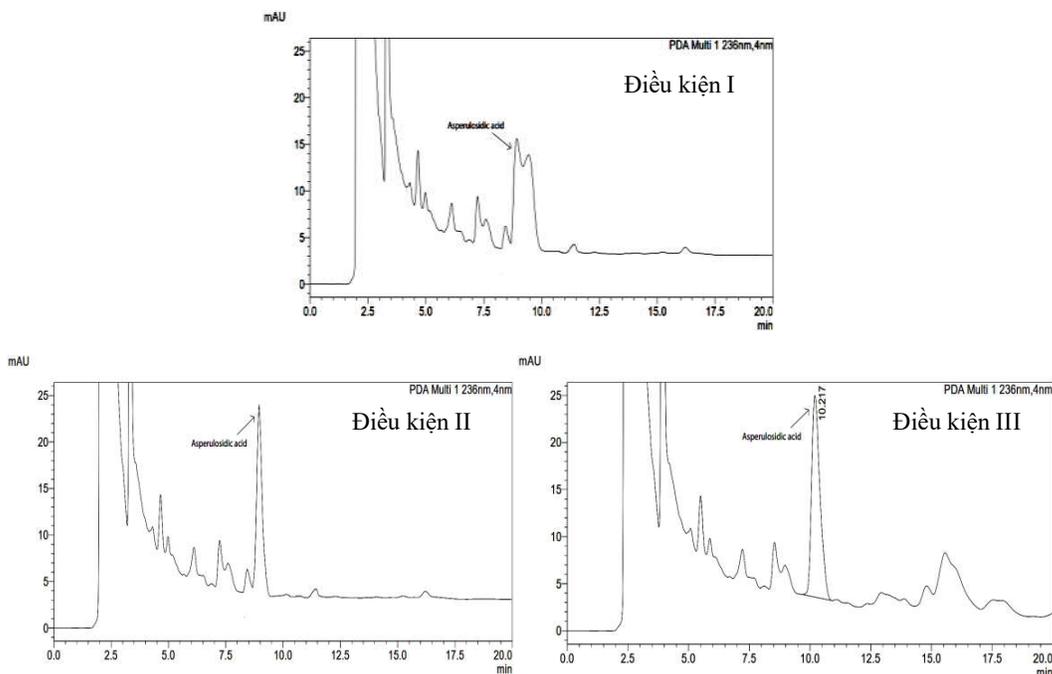
Bảng 2. Hàm lượng acid asperulosidic chiết được với 2 tỷ lệ cao BT: methanol khảo sát

Tỷ lệ cao BT : methanol (mg/ml)	Hàm lượng acid asperulosidic trong cao (% , kl/kl)
500:25	0,345 ± 0,002
500:50	0,345 ± 0,001

Bảng 2 cho thấy hàm lượng acid asperulosidic chiết được với 2 tỷ lệ cao BT : methanol khảo sát khác nhau không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$). Như vậy, với cùng một lượng cao BT, khi dùng gấp đôi lượng dung môi chiết xuất methanol, lượng acid asperulosidic chiết được không tăng thêm. Vậy, dung môi methanol và tỷ lệ cao BT : methanol (500:25) được chọn làm điều kiện chiết xuất acid asperulosidic trong phương pháp chuẩn bị mẫu thử.

Khảo sát điều kiện HPLC định lượng acid asperulosidic trong cao BT

Kết quả khảo sát các chương trình pha động **HPLC** định lượng acid asperulosidic trong mẫu thử cao BT được trình bày trong hình 3.



Hình 3. Sắc ký đồ HPLC phân tích mẫu thử cao BT với các chương trình pha động khác nhau

Hình 3 cho thấy điều kiện III có pic acid asperulosidic đạt yêu cầu về độ phân giải. Vì vậy, chọn chương trình III là hệ dung môi rửa giải để định lượng acid asperulosidic trong mẫu thử cao BT.

Quy trình định lượng acid asperulosidic trong cao BT

Mẫu chuẩn: Cân chính xác khoảng 1 mg acid asperulosidic chuẩn vào bình định mức 10 ml, thêm 7 ml methanol, siêu âm 15 phút, để nguội, bổ sung methanol đến vạch, lắc đều, lọc qua màng lọc 0,45 µm.

Mẫu thử: Cân chính xác khoảng 500 mg cao BT cho vào bình định mức 25 ml. Thêm 20 ml methanol, siêu âm 15 phút, để nguội đến nhiệt độ phòng, bổ sung methanol đến vạch, lắc đều, lọc qua màng lọc 0,45 µm.

Điều kiện HPLC: Máy HPLC Shimadzu LC-2030C 3D Plus, detector PDA (Nhật Bản), cột C18 Synchronis™ (250 × 4,6 mm; 5 µm), bước sóng phát hiện 236 nm, nhiệt độ cột 30 °C, tốc độ dòng 1 ml/phút, thể tích tiêm mẫu 10 µl. Pha động gồm acetonitril và dung dịch H₃PO₄ 0,1% với tỷ lệ 10:90.

Hàm lượng acid asperulosidic (%) trong cao BT được tính theo công thức:

$$X (\%) = \frac{S_t \times C \times 25}{S_c \times m_t \times 1000} \times a \times 100$$

S_t, S_c: Diện tích pic acid asperulosidic của mẫu thử và mẫu chuẩn.

C: Nồng độ dung dịch acid asperulosidic chuẩn (µg/ml).

m_t: Khối lượng cân của mẫu thử (đã trừ độ ẩm) (mg).

a: Hàm lượng của acid asperulosidic chuẩn.

Thẩm định quy trình định lượng acid asperulosidic trong cao BT

Tính tương thích hệ thống

Kết quả khảo sát tính tương thích hệ thống được trình bày trong bảng 3. Các thông số thời gian lưu, diện tích pic có RSD% ≤ 2 %. Hệ số bất đối, độ phân giải, số đĩa lý thuyết đạt yêu cầu phân tích. Vậy, phương pháp **HPLC** định lượng acid asperulosidic trong cao BT đạt tính tương thích hệ thống.

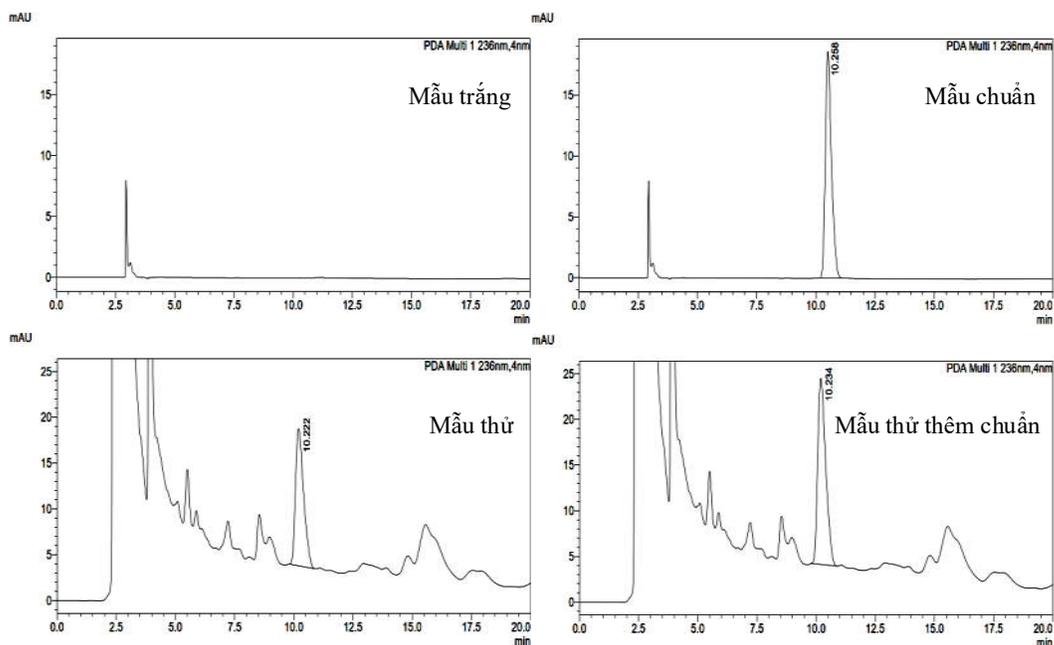
Bảng 3. Tính tương thích hệ thống của phương pháp định lượng acid asperulosidic trong mẫu thử

STT	t _R (phút)	S (mAU.s)	Độ phân giải R _{S1}	Độ phân giải R _{S2}	Hệ số kéo đuôi	N
1	10,21	556703	1,57	1,65	1,16	4583
2	10,23	552482	1,50	1,64	1,16	4521
3	10,28	554652	1,53	1,67	1,07	4266
4	10,27	557890	1,56	1,66	1,01	4236
5	10,24	553445	1,59	1,64	1,12	4139
6	10,34	558378	1,57	1,61	1,01	4106
TB	10,26	555592	1,55	1,65	1,09	4309
% RSD	0,44	0,44	R _s ≥ 1,5	R _s ≥ 1,5	0,8 ≤ A _s ≤ 1,2	

Tính đặc hiệu

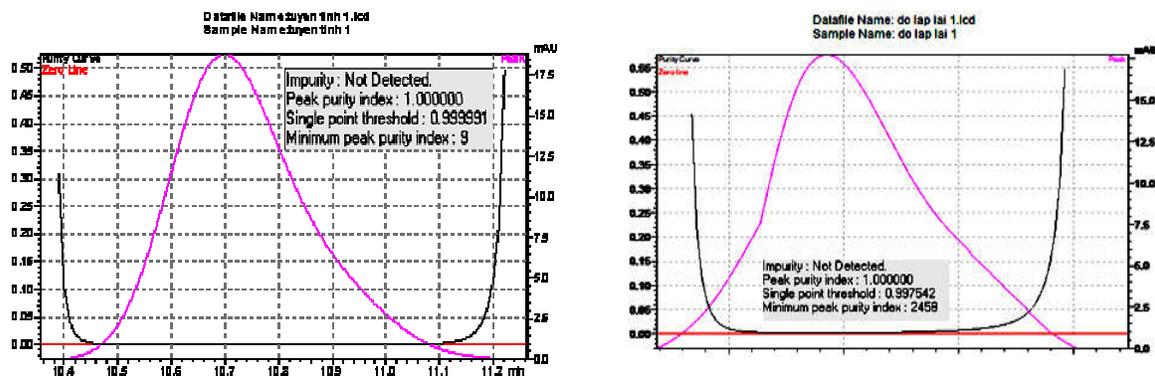
Hình 4 cho thấy sắc ký đồ của mẫu trắng không có pic xuất hiện trong khoảng thời gian lưu tương ứng với thời gian lưu của pic acid asperulosidic trong mẫu chuẩn (khoảng

10,2 phút). Sắc ký đồ của mẫu thử cho pic có thời gian lưu tương ứng với pic acid asperulosidic trong mẫu chuẩn. Khi thêm chuẩn vào mẫu thử, chiều cao và diện tích pic acid asperulosidic trong mẫu thử tăng.



Hình 4. Sắc ký đồ HPLC khảo sát tính đặc hiệu của quy trình định lượng acid asperulosidic trong cao BT (t_R của acid asperulosidic là 10,2 phút)

Độ tinh khiết pic acid asperulosidic trong mẫu chuẩn và mẫu thử đạt yêu cầu (hình 5).



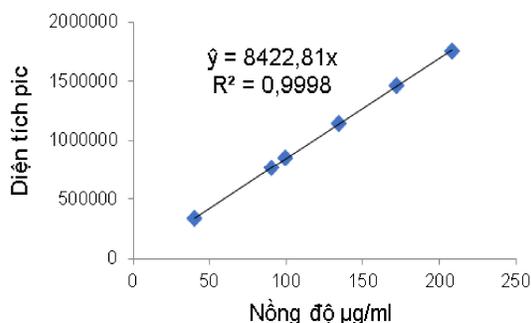
Hình 5. Độ tinh khiết pic (peak purity) acid asperulosidic trong mẫu chuẩn và mẫu thử

Tính tuyến tính

Kết quả khảo sát mối tương quan giữa diện tích pic và nồng độ acid asperulosidic được trình bày trong bảng 4 và hình 6.

Bảng 4. Tính tuyến tính của quy trình định lượng acid asperulosidic

Nồng độ ($\mu\text{g/ml}$)	Diện tích đỉnh
39,8095	334170
90,1569	762294
99,5238	846965
134,6498	1140625
172,1176	1461547
208,4145	1750461



Hình 6. Tương quan giữa nồng độ và diện tích pic acid asperulosidic

Độ lặp lại và độ chính xác trung gian

Kết quả khảo sát độ lặp lại và độ chính xác trung gian của quy trình định lượng acid asperulosidic trong cao BT được trình bày trong bảng 5.

Bảng 5. Độ lặp lại và độ chính xác trung gian của phương pháp định lượng

STT	Ngày 1		Ngày 2	
	Diện tích pic	Hàm lượng acid asperulosidic trong cao BT (%)	Diện tích pic	Hàm lượng acid asperulosidic trong cao BT (%)
1	557618	0,345	558154	0,346
2	552683	0,341	556111	0,343
3	556308	0,343	557491	0,344
4	557779	0,344	559794	0,345
5	554107	0,342	556525	0,344
6	557926	0,344	558840	0,345
TB		0,343		0,344
RSD (%)		0,47		0,31
Giá trị thống kê 2 ngày		TB = 0,344 %		RSD = 0,41 %

Hàm lượng trung bình của acid asperulosidic trong cao BT là 0,343 % và RSD nhỏ hơn 2%. Như vậy, qui trình định lượng acid asperulosidic trong cao BT đạt yêu cầu về độ lặp lại.

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

Tiến hành phân tích mẫu chuẩn acid asperulosidic ở nồng độ còn có thể xuất hiện tín hiệu của chất phân tích và xác định tỉ lệ S/N. Phân tích chuẩn asperulosidic acid ở nồng độ

40 µg/ml, sau đó pha loãng dần đến khi dung dịch chuẩn không còn xuất hiện tín hiệu của chất phân tích (bảng 6). Nồng độ dung dịch chuẩn là 0,08 µg/ml, thì tỷ lệ của tín hiệu và độ nhiễu đường nền S/N = 3, đạt trong khoảng từ 2-3. Như vậy, nồng độ 0,08 µg/ml là giới hạn phát hiện (LOD) của phương pháp. Giới hạn định lượng (LOQ) = 3 × LOD = 3 × 0,08 = 0,24 µg/ml [4].

Bảng 6. Kết quả xác định nồng độ giới hạn LOD

Nồng độ chuẩn (µg/ml)	40	10	2	0,4	0,08	0,008
Diện tích pic	340883	84863	16916	3487	1063	Không có tín hiệu

Độ đúng

Độ đúng được tiến hành bằng cách thêm chất chuẩn acid asperulosidic vào mẫu thử ở 3 mức 80%, 100% và 120% so với nồng độ acid asperulosidic định lượng (hàm lượng

acid asperulosidic trong cao BT là 0,343 % được dựa vào kết quả trung bình độ lặp lại, bảng 5). Mỗi mẫu được lặp lại 3 lần. Kết quả khảo sát độ đúng được trình bày trong bảng 7.

Bảng 7. Kết quả khảo sát độ đúng

Mức nồng độ thêm vào	Tỉ lệ hồi phục (%)	Giá trị trung bình
80%	99,80	TB = 98,60% RSD = 1,22%
	97,39	
	98,61	
100%	99,79	TB = 99,24% RSD = 1,10%
	97,98	
	99,95	
120%	98,91	TB = 100,28% RSD = 1,21%
	100,72	
	101,22	

Theo yêu cầu về độ hồi phục và RSD % tương ứng với nồng độ chất phân tích, tỉ lệ phục hồi cho phép phương pháp định lượng acid asperulosidic trong khoảng 95 - 105 % (hàm lượng trung bình acid asperulosidic trong cao BT là 0,343 %, bảng 5) [3]. Vậy quy trình định lượng đạt yêu cầu về độ đúng.

Kết luận

Quy trình định lượng acid asperulosidic trong cao BT bằng phương pháp **HPLC** được xây dựng và thẩm định. Kết quả thẩm định đạt các yêu cầu về tính tương thích hệ thống, tính tuyến tính, độ đặc hiệu. Độ chính xác trung gian là 0,41 % và độ đúng đạt yêu cầu với độ phục hồi trong khoảng 95-105 %.

Công trình nghiên cứu được tài trợ theo đề tài mã số 103.2019.01 cấp bởi Sở Khoa học và Công nghệ Tỉnh An Giang.

Tài liệu tham khảo

1. Nguyễn Cao Sang, Nguyễn Lê Thanh Tuyên, Nguyễn Thị Kim Oanh, Nguyễn Đức Hạnh, Đỗ Thị Hồng Tươi (2020), "Khảo sát độc tính cấp và tác động giảm đau, kháng viêm của bài thuốc của Lương y Nguyễn Thiện Chung, tỉnh An Giang", *Tạp chí Dược học*, 60 (529), tr. 84-88.
2. He J., Lu X., Wei T., Dong Y., Cai Z., Tang L., Liu M. (2018), "Asperuloside and asperulosidic acid exert an anti-inflammatory effect via suppression of the NF- κ B and MAPK signaling pathways in LPS-induced RAW 264.7 Macrophages", *Int. J. Mol. Sci.*, 19 (7), pp. 2027.
3. Ludwig Huber (2007), *Validation and qualification in analytical laboratories*, New York: Informa Healthcare.
4. International Conference on Harmonization of technical requirements for registration of Pharmaceuticals for Human Use (2005), *Validation of analytical procedure: Text and methodology*.