

Nghiên cứu xây dựng phương pháp điều chế cao định chuẩn diếp cá (*Houttuynia cordata*)

Nguyễn Thị Khánh Linh, Lê Tiên Khang
Phan Nguyễn Trường Thắng*, Trần Việt Hùng
Viện Kiểm nghiệm thuốc TP. Hồ Chí Minh

Summary

Houttuynia cordata Thunb. is a medicinal plant in Vietnam, has many biological activities including anti-inflammatory, anti-oxidant, anti-microbial and immunological effects. The active components in *Houttuynia cordata* are flavonoids, specially including quercitrin and hyperoside. In this study, *Houttuynia cordata* extracts was obtained by ethanol 70%. Then, spray-dried extract powder was made by spray-drying process. The results showed that quercitrin and hyperoside content in extract powder were 1.9 mg/g and 4.0 mg/g, respectively. The result of study will help to check up material and enhance the quality of herbal products.

Keywords: Diếp cá, *houttuynia cordata*, flavonoid, quercitrin, hyperoside.

Đặt vấn đề

Diếp cá (*Houttuynia cordata*) hay còn gọi là dấp cá, ngư tinh thảo - là dược liệu đã được trồng từ lâu tại Việt Nam. Cây dễ trồng và phân bố rộng khắp cả nước, được xem là nguồn nguyên liệu lớn để phát triển các sản phẩm chăm sóc sức khỏe theo hướng đi hiện đại hóa; nhờ vào diếp cá có tính hàn, tác dụng kháng khuẩn, kháng viêm, hạ sốt, điều trị loét dạ dày, các chứng ho, viêm phế quản, bệnh trĩ và tăng cường miễn dịch. Hiện nay đã có mặt các chế phẩm chứa diếp cá trên thị trường như trà túi lọc, viên nang, viên nén,... Vì vậy, việc kiểm soát chất lượng dược liệu hay nguồn nguyên liệu đầu vào nhằm xây dựng quy trình sản xuất ổn định là hết sức cần thiết. Đề tài nghiên cứu bào chế cao định chuẩn diếp cá góp phần nâng cao tiêu chuẩn cho dược liệu ban đầu và là cơ sở cho đánh giá chất lượng của các sản phẩm có nguồn gốc dược liệu này về sau.

Nguyên vật liệu và phương pháp nghiên cứu

Chịu trách nhiệm: Phan Nguyễn Trường Thắng

Email: pntruongthang@gmail.com

Ngày nhận: 14/12/2020

Ngày phản biện: 28/01/2021

Ngày duyệt bài: 19/02/2021

Nguyên liệu

Diếp cá được trồng và thu hái tại khu vực Hà Nội tháng 02-03/2018, đạt tiêu chuẩn chất lượng theo Dược điển Việt Nam V và Dược điển Hong Kong (HKCMMS).

Hóa chất, thuốc thử

Quercitrin (98,48%), số lô: 4-AZP-18-1 và hyperosid (99,16%), số lô: 6-CAL-37-1, TRC - Canada. Các hóa chất, thuốc thử đạt tiêu chuẩn tinh khiết phân tích.

Dụng cụ, trang thiết bị

Dụng cụ thủy tinh các loại. Cân phân tích Mettler Toledo AT – 200, d = 0,1 mg, Mettler Toledo XP86, d = 0,002 mg. Bể siêu âm gia nhiệt Elma Sonic (Đức). Bếp cách thủy Memmert WMB 40 (Đức). Bể điều nhiệt Thermostate Jeio Tech (Hàn Quốc). Tủ sấy Heraeus VT 6025 (Đức). Máy đo hàm ẩm - Ohaus (Mỹ). Kính hiển vi điện tử. Hệ thống chiết xuất - cô cao của Công ty TNHH Máy Dược phẩm T&T (Việt Nam). Máy phun sấy - tạo hạt tầng sôi của Công ty TNHH Cơ khí Minh Trí (Việt Nam),...

Phương pháp nghiên cứu

Tiến hành kiểm tra chất lượng nguyên liệu diếp cá các tiêu chuẩn ĐVN V và HKCMMS.

Tiến hành khảo sát lần lượt các dung môi: Ethanol tuyệt đối, ethanol 96%, ethanol 70%,

ethanol 50%, ethanol 30% và nước với 1 g dược liệu diếp cá, mỗi dung môi tiến hành chiết 2 lần, mỗi lần chiết với 20 ml dung môi, siêu âm, 30 phút. Gom các dịch chiết, cho vào cốc đã cân bì, cô trên cách thủy đến khô. Đánh giá chọn dung môi dựa trên: Cảm quan, khối lượng cần chiết được, sắc ký đồ **TLC** theo HKCMMS.

Sau đó, tiến hành chiết xuất trên 10 kg dược liệu diếp cá với dung môi đã khảo sát. Cô thu hồi áp suất giảm đến tỉ trọng phù hợp. Sử dụng dịch chiết này để khảo sát tá dược sấy phun theo các tỷ lệ:

1. Syloid_{244FP} : lactose = 1:2.
2. Aerosil : syloid_{244FP} : maltodextrin = 1:1:2.
3. Aerosil : maltodextrin = 1:2.
4. Aerosil : florite : lactose = 1:1:2.

Sau khi phun sấy, chọn hệ tá dược ít hút ẩm nhất, thể chất khô toại, dễ chảy. Tiến hành khảo sát điều kiện sấy phun: Nhiệt độ phun sấy: 55 - 65 °C, tốc độ bơm 35 - 45 vòng/phút, tốc độ quạt 500 - 1.400 vòng/phút, thời gian chờ phun 3 phút - 5 phút, thời gian phun 0,1 - 0,2 phút. Sau khi phun sấy, đánh giá dựa trên hiệu suất thu hồi, tỉ trọng...

Sau khi có các điều kiện phun sấy phù hợp, tiến hành bào chế cao từ 30 kg dược liệu diếp cá theo các điều kiện đã khảo sát. Đánh giá sơ bộ cao diếp cá thu được qua các thông số gồm: Tính chất, hàm ẩm, tỷ trọng biểu kiến, hiệu suất thu hồi và định tính bằng sắc ký lớp mỏng.

Dựa theo ĐBVN V và Dược điển Hong Kong HKCMMS, thực hiện đánh giá trên 3 lô cao thành phẩm, từ đó đề xuất mức chất lượng cho tiêu chuẩn cơ sở cho cao diếp cá bao gồm các chỉ tiêu: Mô tả, định tính, mất khối lượng làm khô, độ mịn, kim loại nặng, định lượng (quercitrin, hyperosid), giới hạn nhiễm khuẩn.

Quy trình định lượng quercitrin, hyperosid trong cao diếp cá bằng **HPLC** đã thẩm định:

Điều kiện sắc ký:

Máy sắc ký lỏng **HPLC** - đầu dò PDA.

Cột sắc ký: C18 (250 mm x 4,6 µm x 5 µm) hoặc tương đương.

Bước sóng: 254 nm.

Tốc độ dòng: 0,8 ml/phút.

Thể tích tiêm: 10 µl.

Pha động:

Thời gian (phút)	Acid acetic 0,2% (% , tt/tt)	Acetonitrile
0 - 20	95 → 81	5 → 19
20 - 40	81	19
40 - 50	81 → 60	19 → 40
50 - 52	60 → 95	40 → 5
52 - 60	95	5

Quy trình xử lý mẫu

- Dung dịch chuẩn gốc quercitrin: Cân chính xác lượng 1,0 mg chuẩn quercitrin vào bình định mức 10 ml, thêm 5 ml methanol 70%, lắc siêu âm 5 phút. Để nguội và định mức đến vạch bằng methanol 70%, lắc đều.

- Dung dịch chuẩn gốc hyperosid: Cân chính xác lượng 1,0 mg chuẩn hyperosid vào bình định mức 10 ml, thêm 5 ml methanol 70%, lắc siêu âm 5 phút. Để nguội và định mức đến vạch bằng methanol 70%, lắc đều. Hút chính xác 5 ml dung dịch trên vào bình định mức 20 ml, định mức đến vạch bằng methanol 70%, lắc đều.

- Dung dịch chuẩn làm việc: Hút 3 ml dung dịch chuẩn gốc quercitrin và 2 ml dung dịch chuẩn gốc hyperosid vào bình định mức 10 ml, lắc đều, lọc qua màng lọc 0,45 µm.

- Dung dịch thử: Cân chính xác khoảng 0,250 g cao khô vào bình định mức 50 ml, thêm 30 ml methanol 70%, lắc siêu âm 30 phút. Để nguội và định mức đến vạch bằng methanol 70%, lắc đều, lọc qua màng lọc 0,45 µm.

Sự phù hợp của hệ thống sắc ký

Tiêm lặp lại 6 lần dung dịch chuẩn vào hệ thống sắc ký. Phép thử đạt yêu cầu khi độ lặp lại tương đối (thời gian lưu, diện tích pic) tiêm lặp lại 6 lần dung dịch chuẩn có RSD nhỏ hơn 2,0%. Hệ số kéo đuôi không lớn hơn 2,0. Số đĩa lý thuyết không nhỏ hơn 2000.

Tiến hành tiêm dung dịch chuẩn và dung dịch thử vào hệ thống sắc ký và ghi lại đáp ứng pic.

Hàm lượng % quercitrin ($C_{21}H_{20}O_{11}$)/hyperosid ($C_{21}H_{20}O_{12}$) trong cao, tính theo công thức:

$$X (\%) = \frac{R_E \times C_S}{R_S \times m_i \times (100\% - \emptyset)} \times D$$

Trong đó:

R_E : Diện tích pic quercitrin ($C_{21}H_{20}O_{11}$)/hyperosid ($C_{21}H_{20}O_{12}$) trong sắc đồ dung dịch thử.

R_s : Diện tích pic quercitrin ($C_{21}H_{20}O_{11}$)/ hyperosid ($C_{21}H_{20}O_{12}$) trong sắc đồ dung dịch chuẩn.

C_s : Nồng độ quercitrin ($C_{21}H_{20}O_{11}$)/ hyperosid ($C_{21}H_{20}O_{12}$) trong dung dịch chuẩn (mg/ml).

D : Độ ẩm cao dược liệu.

m_t : Khối lượng cao mẫu thử (g).

D : Độ pha loãng mẫu thử ($D = 50$).

Kết quả nghiên cứu

Kiểm tra chất lượng nguyên liệu

Kết quả đánh giá dược liệu diếp cá theo bảng 1.

Bảng 1. Kết quả đánh giá chất lượng dược liệu

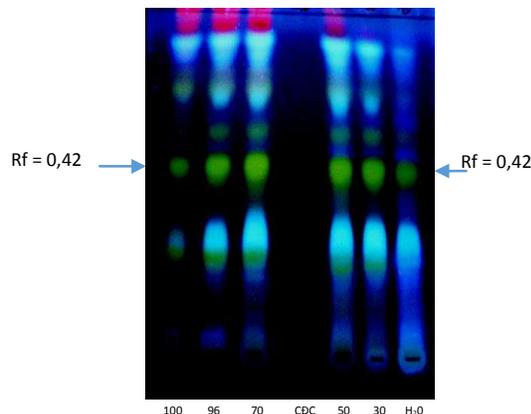
Chỉ tiêu	Kết quả
<i>ĐEVN V</i>	
Mô tả	Đạt
Vị phần	Đạt
Bột	Đạt
Định tính	Đúng
Độ ẩm	Đạt (11,9%)
Tro toàn phần	Đạt (10,3%)
Tạp chất	Đạt
Tỷ lệ vụn nát	Đạt (0%)
Chất chiết được trong ethanol	Đạt (20,3%)
Định lượng tinh dầu	Đạt (0,22%)
<i>HKCMMS</i>	
Định tính bằng TLC	Đúng

Dược liệu đánh giá đạt yêu cầu chất lượng, đủ điều kiện để tiến hành chiết xuất cao định chuẩn.

Xây dựng phương pháp điều chế cao định chuẩn diếp cá

Khảo sát dung môi chiết cao toàn phần

Dung môi	Mô tả	Hiệu suất chiết cao
Ethanol tuyệt đối	Cao khô, màu vàng nâu, ít bám dính	11,93%
Ethanol 96%	Cao khô, màu vàng nâu, ít bám dính	19,28%
Ethanol 70%	Cao hơi khô, màu vàng nâu, ít bám dính	34,79%
Ethanol 50%	Cao ít khô, màu nâu đen đậm, hơi dính, dẻo	30,24%
Ethanol 30%	Cao ướt, màu đen đậm, dính, dẻo	33,15%
Nước	Cao ướt, màu đen đậm, dính, dẻo	26,74%



Hình 1. Kết quả khảo sát dung môi chiết xuất

Ghi chú:

CDC: Chuẩn đối chiếu Quercitrin.

100, 96, 70, 50, 30, H₂O: Lần lượt các dịch chiết ethanol tuyệt đối, ethanol 96%, ethanol 70%, ethanol 50%, ethanol 30%, nước

Từ cảm quan, hiệu suất chiết đến vết trên TLC nhóm nghiên cứu chọn ethanol 70% để chiết xuất vì nồng độ còn không quá cao nên giảm chi phí, hàm lượng hoạt chất khá lớn và đồng thời với nồng độ ethanol 70% có thể loại hầu hết các nhựa nhầy, giúp dễ dàng hơn trong việc phun sấy.

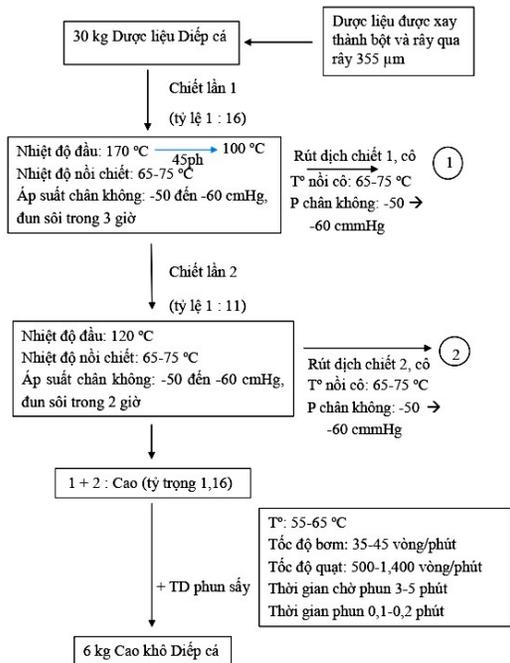
Khảo sát điều kiện sấy phun

Dịch chiết ethanol 70% thu được cô đến tỉ trọng $d = 1,16$ (ở $\sim 70^\circ\text{C}$) được phun sấy với các hệ tá dược. Nhận thấy hệ Syloid : lactose = 1:2 cho cao có cảm quan bột khô tơi, màu xanh nâu, mùi thơm dược liệu, dễ chảy, ít dính tay. Chọn hệ tá dược này để khảo sát điều kiện sấy phun. Hiệu suất thu hồi tại các điều kiện khảo sát lần lượt là 70,27%; 71,73%; 72,04%. Điều kiện khảo sát tại nhiệt độ phun sấy $55 - 65^\circ\text{C}$, tốc độ bơm 35 - 45 vòng/phút, tốc độ quạt 500 - 1.400 vòng/phút, thời gian chờ phun 3 - 5 phút, thời gian phun 0,1 - 0,2 phút, ta thu được cao khô diếp cá có hiệu suất thu hồi tối ưu.

Xây dựng TCCS cho cao diếp cá

Điều chế cao diếp cá

Từ 30 kg dược liệu diếp cá, với quy trình được trình bày bên dưới, nhóm nghiên cứu thu được 6,15 kg cao khô diếp cá.

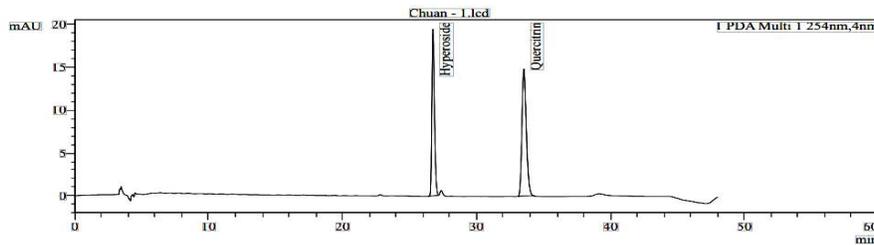


Đánh giá sơ bộ nhận thấy cao thu được dạng bột màu xanh khô tươi, kích thước đồng nhất, có mùi thơm dược liệu, có độ ẩm: 6,5 %, tỷ trọng biểu kiến: 0,46 g/ml với hiệu suất thu hồi: 71,35% và có vết của quercitrin và hyperosid.

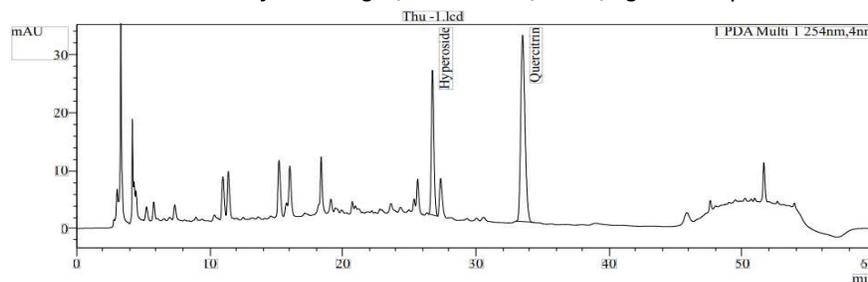
Xây dựng tiêu chuẩn cho cao diếp cá

Thực hiện đánh giá trên 6 mẫu cao thành phẩm, thu được kết quả như sau:

STT	Chỉ tiêu	Khoảng kết quả ghi nhận
1	Mất khối lượng làm khô	6,4 % - 6,7 %
2	Độ mịn	
	- Qua rây 710	95,3 % - 96,8 %
	- Qua rây 250	33,6 % - 35,2 %
3	Kim loại nặng	Không quá 20 ppm
4	Hàm lượng	
	- Quercitrin	3,9975 – 4,1264 (mg/g)
	- Hyperosid	1,8965 – 1,9951 (mg/g)



Hình 2. Sắc ký đồ dung dịch chuẩn định lượng cao diếp cá



Hình 3. Sắc ký đồ dung dịch mẫu thử định lượng cao diếp cá

Từ kết quả trên, nhóm nghiên cứu xây dựng tiêu chuẩn cơ sở cho cao diếp cá với các chỉ tiêu và mức chất lượng như sau:

STT	Chỉ tiêu	Yêu cầu
1	Mô tả	Bột màu nâu đồng nhất, dễ hút ẩm, có mùi thơm đặc trưng của Diếp cá. Vị đắng nhẹ
2	Định tính - Quercitrin - Hyperosid	Dương tính

3	Mất khối lượng do làm khô	Không quá 7,0%
4	Độ mịn	Không ít hơn 95,0% qua rây số 710 Không quá 40,0% qua rây số 250
5	Kim loại nặng	Không quá 20 ppm
6	Định lượng	
	- Quercitrin - Hyperosid	Không ít hơn 2,0 mg/g chế phẩm Không ít hơn 1,0 mg/g chế phẩm
7	Giới hạn nhiễm khuẩn	
	Đếm tổng số vi khuẩn hiếu khí	Không lớn hơn 10000 cfu/g hoặc ml
	Đếm tổng số nấm men và nấm mốc	Không lớn hơn 100 cfu/g hoặc ml
	Tim <i>Enterobacteria</i> và các vi khuẩn Gram âm khác	Không lớn hơn 500 cfu/g hoặc ml
	Tim vi khuẩn gây bệnh	
	Tim <i>E. coli</i>	Không có trong 1 g hoặc 1 ml
	Tim <i>Salmonella spp</i>	Không có trong 10 g hoặc 10 ml
	Tim <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Không có trong 1 g hoặc 1 ml
	Tim <i>Staphylococcus aureus</i>	Không có trong 1 g hoặc 1 ml

So với các tiêu chuẩn ĐVN V hiện hành thì nhóm nghiên cứu đã nâng cấp tiêu chuẩn cho diếp cá khi kiểm soát thêm quercitrin và hyperosid, đây là những flavonoid hỗ trợ việc tăng cường hệ tim mạch, bền thành mạch.

Nghiên cứu này đã đưa quy mô chiết xuất cao từ phòng thí nghiệm đến quy mô sản xuất và sử dụng hệ tá dược có độ trơn chảy tốt, hệ số thu hồi cao thu được cao khô có tỉ lệ 1 : 5.

Nghiên cứu đã kiểm soát được 2 flavonoid chính trong cao định chuẩn diếp cá là quercitrin và hyperosid với yêu cầu hàm lượng từ 0,1 % trở lên. Nghiên cứu điều chế cao định chuẩn diếp cá là cơ sở cho việc sản xuất thuốc ổn định vì nguồn nguyên liệu đầu vào được kiểm soát chất lượng một cách chặt chẽ, hạn chế các ảnh hưởng lên quá trình bào chế thuốc, góp phần nâng cao chất lượng các sản phẩm có nguồn gốc từ dược liệu.

Kết luận

Nhóm đề tài đã nghiên cứu khảo sát chiết xuất dược liệu diếp cá bằng dung môi ethanol 70% và ứng dụng phương pháp sấy phun để bào chế cao diếp cá cho hiệu suất thu hồi đạt 71,35%.

Đã xác định được hàm lượng hoạt chất trong cao diếp cá thu được là quercitrin (4,1 mg/g) và hyperosid (1,9 mg/g).

Qua đó, đã xây dựng được tiêu chuẩn cơ sở cho cao diếp cá thu được với các chỉ tiêu bao gồm: Mô tả, định tính, mất khối lượng do làm khô, độ mịn, kim loại nặng, định lượng và giới hạn nhiễm khuẩn.

Tài liệu tham khảo

1. Dược điển Việt Nam V, *Diếp cá*, Bộ Y tế, tr. 1141-1142.
2. HKCMMS Vol 4, *Houttuyniae herba*, pp. 180-19.
3. H. Lu, Y. Liang, L. Yi and X. Wu (2006), "Anti-inflammatory effect of *Houttuynia cordata* injection", *Journal of Eth - Nopharmacology*, 104 (1-2), pp. 245-249. doi: 10.1016/j.jep.2005.09.012.
4. K. Hayashi, M. Kamiya and T. Hayashi (1995), "Virucidal effects of the steam distillate from *Houttuynia cordata* and its components on HSV-1, influenza virus, and HIV," *Planta Medica*, 61 (3), pp. 237-241. doi: 10.1055/s-2006-958063.
5. N. Nuengchamnon, K. Krittasilp and K. Ingkaninan (2009), "Rapid screening and identification of antioxidants in aqueous extracts of *Houttuynia cordata* using LC-ESI- MS coupled with DPPH assay," *Food Chemistry*, 117 (4), pp. 750-756. doi: 10.1016/j.foodchem.2009.04.071.
6. S. Oyama (1950), "Extraction of an active principle from *Hout-tuynia cordata*," JP Patent No. 25000880.
6. Yuen J. W, Gohel M. D. (2005), "Anticancer effects of *Ganoderma lucidum*: A review of scientific evidence", *Nutr. Cancer.*, 53, pp. 11-17.