

Nghiên cứu xây dựng phương pháp điều chế cao định chuẩn giàu alkaloid từ khổ sâm bắc (*Sophora flavescens* Ait.)

Phan Nguyễn Trường Thắng^{1*}, Nguyễn Huỳnh Tâm²
Trần Anh Vũ², Nguyễn Ngọc Vinh³

¹Viện Kiểm nghiệm Thuốc TP. Hồ Chí Minh

²Khoa Dược – Đại học Y Dược TP. Hồ Chí Minh

³Khoa Y Dược – Đại học Quốc gia TP. Hồ Chí Minh

Summary

Ku Shen (Sophora flavescens Ait.) has been used in traditional medicine to treat various diseases. Ku Shen root contains two prominent ingredients (flavonoids and alkaloids) that have remarkable biological effects. In particular, the alkaloids inhibit the replication of the HBV virus, reduce the destruction of hepatocytes and protect the liver against fibrosis. The research team recognized the precious effects of these ingredients and carried out this project to prepare Ku Shen standardized extract that enriches alkaloid components. This study established the method to prepare for standardized alkaloid extracts with alkaloid content of 3.4 times higher than total extracts. Validation for quantitative method of three alkaloids: Matrine, oxymatrine, sophoridine in total extracts and standardized alkaloid extracts by HPLC was conducted.

Keywords: *Sophora flavescens* Ait., standardized alkaloid extracts, matrine, sophoridine, oxymatrine.

Đặt vấn đề

Khổ sâm bắc là một dược liệu quý được sử dụng lâu đời, có nguồn gốc từ Trung Quốc, trong đó có chứa thành phần alkaloid với nhiều tác dụng sinh học đáng chú ý đã được chứng minh và ứng dụng trong điều trị như chống loạn nhịp, trị hen, chống viêm loét, chống ung thư, ức chế sự nhân lên của virus HBV, giảm sự phá hủy tế bào gan và bảo vệ gan chống lại xơ hóa^[1, 2]. Để tăng tác dụng của nhóm hoạt chất này, nhóm nghiên cứu đề xuất tiến hành chiết cao định chuẩn giàu alkaloid từ rễ khổ sâm bắc (*Sophora flavescens* Ait.) với mục tiêu kiểm soát hàm lượng tổng ba alkaloid chính trong cây là matrin, oxymatrin, sophoridin; đồng thời đề xuất mức chất lượng cho cao chiết này.

Chịu trách nhiệm: Phan Nguyễn Trường Thắng

Email: pntthang@gmail.com

Ngày nhận: 14/12/2020

Ngày phân biên: 10/01/2021

Ngày duyệt bài: 22/01/2021

Nguyên liệu và phương pháp nghiên cứu

Nguyên liệu

Rễ khổ sâm bắc của Công ty Cổ phần sản xuất chế biến nông lâm sản Dược liệu sạch Đắc Nông, thu hái vào tháng 7/2017. Mẫu thực vật đã được định danh bằng kỹ thuật PCR bởi nhóm nghiên cứu, giám định tên khoa học là: *Sophora flavescens* Ait., họ Đậu – Fabaceae^[3].

Chất chuẩn

Matrin độ tinh khiết 98,0%, sophoridin độ tinh khiết 98,97%, oxymatrin độ tinh khiết 97,92%. Nguồn gốc: Khoa NCPT – Viện Kiểm nghiệm Thuốc TP. Hồ Chí Minh.

Dung môi, hóa chất

Nước cất, acetonitril (ACN), methanol (MeOH) đạt tiêu chuẩn dùng cho sắc ký lỏng. Ethanol 96%, acid acetic, ethyl acetat (EA), cloroform (Cf), methanol (MeOH), amoniac, natri hydroxyd, thuốc thử Dragendorff đạt tiêu chuẩn phân tích.

Trang thiết bị

Hệ thống sắc ký lỏng hiệu năng cao SHIMADZU-2030C 3D, detector PDA; Bồn soi UV SPECTROLINE; Máy cô quay YAMATO RRE 801; Máy cô quay dung môi Model: Rocket Synergy; Lò nung NABERTHERM; Bản mỏng silica gel F₂₅₄ Macherey – Nagel; Máy phổ khối nguồn phát xạ Plasma Agilent 7900 IPC-MS; Tủ sấy Binder EB-53.

Phương pháp nghiên cứu

Tiến hành kiểm tra chất lượng nguyên liệu

Theo Tiêu chuẩn Dược liệu của Hồng Kông - Trung Quốc (HKCMMS) [4] với các chỉ tiêu: Mô tả, định tính, độ ẩm, định lượng alkaloid. Sau đó, tiến hành điều chế cao toàn phần bằng phương pháp ngâm lạnh với ethanol 70% (tỉ lệ 1:5), có siêu âm. Ngâm trong 24 giờ, lấy dịch chiết. Lặp lại 4 lần. Cuối cùng ép bã, gộp dịch chiết, để lắng, lọc. Dịch chiết được cô quay thu hồi dung môi thu được cao toàn phần. Cao toàn phần được phân tán vào nước, acid hóa dịch nước bằng acid acetic và lactic phân bố với EA (tỉ lệ dịch: EA = 1:2; 4 lần), lấy lớp nước.

Tiến hành khảo sát các điều kiện điều chế cao định chuẩn giàu alkaloid

Các tác nhân điều chỉnh pH: NH₃, NaOH 10%. Tác nhân: Amoniac kiềm hóa về pH 10, dung dịch NaOH 10% kiềm hóa về pH 11, lactic phân bố với Cf (tỉ lệ dịch:Cf = 1:2; 5 lần). Dịch Cf thu được đem cô quay loại dung môi thu được cao giàu alkaloid. Dịch Cf thu được sau mỗi lần lactic được kiểm tra trên SKLM với hệ dung môi amoniac – nước – ethanol – EA (1,5:1:3,5:15) [4]. Chọn tác nhân điều chỉnh pH dựa vào kết quả sắc ký đồ SKLM và lượng cần thu được, chọn tác nhân ít độc. Sau khi chọn được tác nhân điều chỉnh pH, tiến hành điều chế cao toàn phần, cao giàu alkaloid ở quy mô với 4,0 kg dược liệu rễ khổ sâm bắc.

Tiến hành xây dựng và thẩm định phương pháp định tính, định lượng alkaloid trên cao chiết

Xây dựng phương pháp định tính alkaloid trên các cao chiết bằng SKLM với hệ dung môi khai triển: amoniac – nước – ethanol – EA (1,5:1:3,5:15), với thuốc thử phát hiện là Dragendorff.

Xây dựng và thẩm định phương pháp định lượng alkaloid trên các cao chiết bằng phương pháp HPLC-PDA, sử dụng cột pha đảo silica gel C18, và chương trình pha động gradient

của acetonitril – hỗn hợp dung dịch H₃PO₄ 0,3% và triethylamin 0,3% trong nước; phát hiện ở bước sóng 220 nm. Phương pháp được thẩm định theo ICH [5].

Từ các kết quả thu được, nhóm nghiên cứu đã đề xuất tiêu chuẩn cơ sở cho cao định chuẩn giàu alkaloid

Kết quả và bàn luận

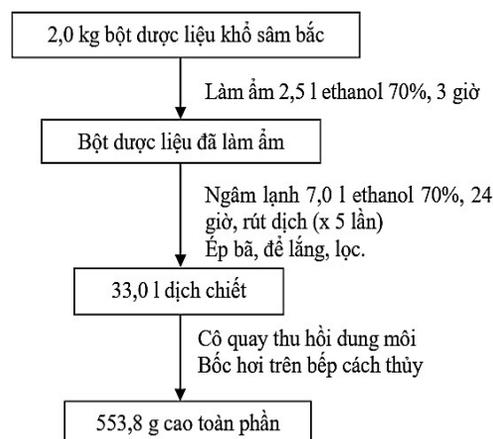
Chiết xuất cao giàu alkaloid

Dược liệu được đánh giá chất lượng theo HKCMMS

Bảng 1. Kết quả đánh giá chất lượng dược liệu theo HKCMMS

Chỉ tiêu	Yêu cầu	Kết quả
Mô tả	Rễ hình trụ dài, phân nhiều nhánh. Vỏ ngoài màu vàng. Mùi thơm nhẹ, vị đắng.	Đạt
Định tính	Matrin, oxymatrin, sophoridin	Đúng
Độ ẩm	Không quá 11,0 %	Đạt (5,4%)
Định lượng	Không dưới 1,9 %	Đạt (2,9 %)

Dược liệu đạt yêu cầu được tiến hành điều chế cao toàn phần như sơ đồ hình 1

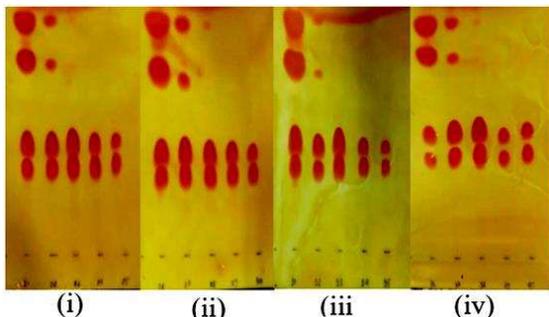


Hình 1. Quy trình điều chế cao toàn phần

Lặp lại phương pháp trên lô thứ 2 với 2,0 kg dược liệu, thu được 542,2 g cao toàn phần.

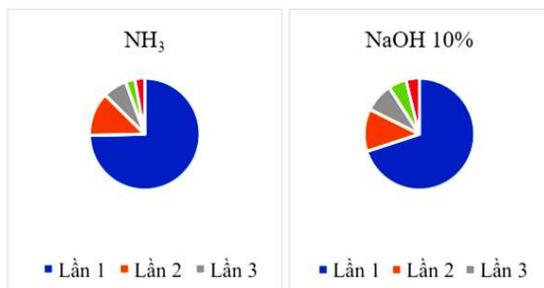
Từ 5 g cao toàn phần được phân tán vào nước điều chỉnh pH 2,0 bằng acid acetic, tiến hành lactic 3 lần với EA với tỉ lệ (1:2), dịch nước còn lại được bay hơi dung môi và tiến hành

khảo sát tác nhân pH và chiết Cf thu được cần như sau: Tác nhân amoniac thu được 0,71 g cần, tác nhân NaOH 10 % thu được 0,65 g cần.



Hình 2. Kết quả SKLM khảo sát chiết xuất alkaloid

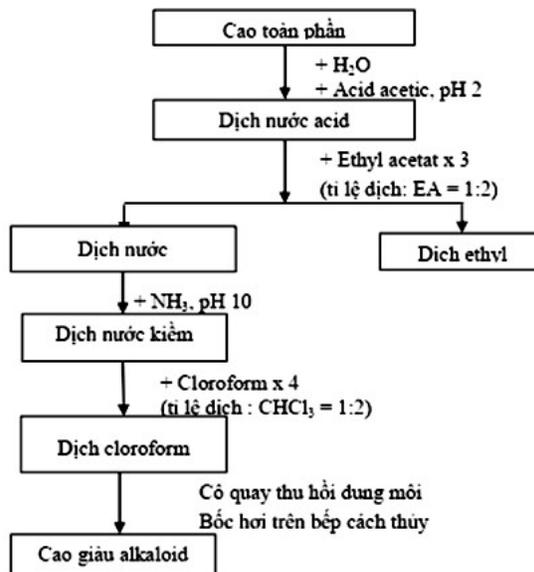
- (i) Kiểm hóa bằng amoniac lần 1,
- (ii) Kiểm hóa bằng amoniac lần 2,
- (iii) Kiểm hóa bằng NaOH lần 1,
- (iv) Kiểm hóa bằng NaOH lần 2.



Hình 3. Biểu đồ so sánh khối lượng cần khảo sát chiết xuất alkaloid

Nhận xét: Màu sắc các vết trên SKĐ nhạt dần và nhạt hẳn sau 5 lần. Chênh lệch khối lượng cần giữa việc sử dụng tác nhân điều chỉnh pH là natrihydroxid hay amoniac không đáng kể. Tác nhân amoniac an toàn, ít độc hại, dễ điều chỉnh pH và ít nguy cơ phá vỡ cấu trúc hơn tác nhân natrihydroxid. Chọn tác nhân điều chỉnh pH là amoniac. Khối lượng cần ở lần 1 chiếm lượng lớn nhất, lần 5 còn lại không đáng kể. Để tiết kiệm dung môi, thực hiện 4 lần lắc để thu được cao giàu alkaloid. Lượng cần thu được chiếm tỉ lệ lớn hơn khi sử dụng amoniac (97,2%) so với sử dụng natrihydroxyd 10% (96,2%).

Quy trình chiết cao giàu alkaloid được đề xuất như sau (hình 4):

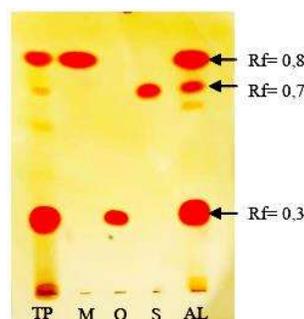


Hình 4. Phương pháp điều chế cao giàu alkaloid

Theo quy trình trên hình 4, từ 280 g cao toàn phần và 270 g cao toàn phần nhóm nghiên cứu thu được 50,9 g và 44,2 g cao alkaloid với độ ẩm lần lượt là 13,41 % và 15,58 %. Chứng tỏ phương pháp chiết tương đối ổn định.

Xây dựng và thẩm định phương pháp định tính, định lượng alkaloid trên các cao chiết

Xây dựng phương pháp định tính alkaloid trên các cao chiết



Hình 5. Kết quả định tính alkaloid bằng SKLM

TP: Mẫu thử cao toàn phần,
AL: Mẫu thử cao giàu alkaloid, M: Chuẩn matrin,
O: Chuẩn oxymatrin, S: Chuẩn sophoridin.

Nhận xét: Trên sắc ký đồ mẫu thử cao toàn phần và cao giàu alkaloid có các vết tương ứng với các vết trên sắc ký đồ mẫu chuẩn. Mẫu thử

cao giàu alkaloid có xuất hiện nhiều vết hơn, đồng thời, các vết chuẩn matrin, oxymatrin, sophoridin đều đậm hơn mẫu thử cao toàn phần.

Xây dựng và thẩm định phương pháp định lượng alkaloid trên các cao chiết

Đề xuất quy trình phân tích

Hệ thống HPLC đầu dò PDA, bước sóng phát hiện 220 nm.

Cột sắc ký: Nucleodur-C18 Isis (250mm x 4,6 mm x 5 µm).

Thể tích tiêm: 5 µL.

Tốc độ dòng: 1 mL/phút.

Chương trình pha động theo bảng sau:

Bảng 2. Chương trình pha động định lượng alkaloid

Thời gian (phút)	Acetonitril (%)	Hỗn hợp dung dịch H ₃ PO ₄ 0,3%, 0,3% trimethylamin (%)
0	2	98
30	2	98
35	60	40
50	60	40
53	2	2
60	2	2

Quy trình xử lý mẫu

Chuẩn bị chuẩn gốc theo bảng sau:

Bảng 3. Cách pha các dung dịch chuẩn gốc

STT	Khối lượng cân (mg)	Bình định mức (ml)
Chuẩn gốc matrin	25,0	50
Chuẩn gốc sophoridin	15,0	50
Chuẩn gốc oxymatrin	45,0	50

Bảng 4. Kết quả thẩm định phương pháp định lượng đồng thời các alkaloid trong cao toàn phần

Chỉ tiêu thẩm định và yêu cầu	Kết quả			
	A1	A2	A3	
<i>Độ đặc hiệu</i>				
Thời gian lưu và phổ UV phải giống pic chuẩn của mẫu chuẩn, mẫu trắng không xuất hiện pic chuẩn	Thời gian lưu (phút)	8,682	11,076	17,726
<i>Tính tương thích hệ thống</i>	RSD% diện tích	1,78	1,20	0,51
RSD% thời gian lưu ≤ 2,0%	RSD% thời gian lưu	1,31	1,59	1,34
RSD% diện tích ≤ 2,0%	Tf	0,8	0,8	0,8
Rf ≤ 1,5	Rs		3,7	6,6
Rs ≥ 1,5	N	3693	3850	3132
N ≥ 5000				

Dung dịch chuẩn hỗn hợp: Hút chính xác 5,0 ml mỗi dung dịch chuẩn gốc cho vào bình định mức 25 ml, lắc đều. Thêm methanol đến vạch, lắc đều. Lọc qua màng lọc 0,45 µm.

Mẫu thử cao giàu alkaloid: Cân chính xác khoảng 65,0 mg cao giàu alkaloid vào bình định mức 100 ml, hòa tan bằng methanol, sau đó thêm dung môi vừa đủ 100 ml, lắc đều. Lọc qua màng lọc 0,45 µm.

Tiến hành sắc ký 6 lần cùng dung dịch mẫu chuẩn, ghi lại SKĐ.

Yêu cầu: RSD%_{thời gian lưu} ≤ 2,0%, RSD%_{diện tích} ≤ 2,0%, Rf ≤ 1,5, Rs ≥ 1,5, N ≥ 3000.

Tiến hành tiêm các mẫu thử, ghi nhận kết quả sắc ký đồ, thời gian lưu và diện tích pic.

Tính kết quả

Hàm lượng chất phân tích X (%) trong cao được liệu được tính theo công thức:

$$X = \frac{St}{Sc} \times \frac{a.C\%}{m \times (1-H)} \times \frac{D_T}{D_C} \times 100\%$$

Trong đó:

St: Diện tích pic chất phân tích trong mẫu thử.

m: Khối lượng cân cao dược liệu (mg).

Sc: Diện tích pic chất phân tích trong mẫu chuẩn.

a: Khối lượng cân chất chuẩn (mg).

H: Hàm ẩm cao dược liệu (%).

C%: Độ tinh khiết chất chuẩn.

D_T, D_C: độ pha loãng của mẫu thử và mẫu chuẩn.

Thẩm định phương pháp định lượng đồng thời matrin (A1), sophoridin (A2) và oxymatrin (A3) trong các cao chiết bằng phương pháp HPLC

<i>Tính tuyến tính</i> R ≥ 0,995	Hệ số a	6752,3	7513,5	11594	
	Hệ số b	28149	-24960	-102862	
	R	0,9991	0,9985	0,9984	
<i>Độ đúng</i> 98,0 - 102,0%	Độ phục hồi	100,24	99,55	99,72	
<i>Khoảng xác định (µg/ml)</i> Độ phục hồi 98 - 102%, RSD% ≤ 2,0%		71,88 - 119,80	43,00 - 71,68	136,75 - 227,90	
<i>Độ chính xác</i> RSD (%) ≤ 2,0%	Độ lặp lại	RSD%	1,72	1,59	1,55
	Độ CXTG	RSD%	1,27	1,23	1,86

Bảng 5. Kết quả thẩm định phương pháp định lượng đồng thời alkaloid trong cao giàu alkaloid

<i>Chi tiêu thẩm định và yêu cầu</i>	<i>Kết quả</i>				
	A1	A2	A3		
<i>Độ đặc hiệu</i> Thời gian lưu và phổ UV phải giống pic chuẩn của mẫu chuẩn, Mẫu trắng không xuất hiện pic chuẩn.	Thời gian lưu (phút)	8,277	10,503	16,574	
<i>Tính tương thích hệ thống</i> RSD% thời gian lưu ≤ 2,0%	RSD% diện tích	0,79	1,23	1,63	
RSD% diện tích ≤ 2,0%	RSD% thời gian lưu	1,01	1,21	1,53	
Rf ≤ 1,5	Tf	0,8	0,8	0,8	
Rs ≥ 1,5	Rs		3,8	7,2	
N ≥ 5000	N	3776	4423	3870	
<i>Tính tuyến tính</i> R ≥ 0,995	Hệ số a	6752,3	7513,5	11594	
	Hệ số b	28149	-24960	-102862	
	R	0,9991	0,9985	0,9984	
<i>Độ đúng</i> 98,0 - 102,0%	Độ phục hồi	100,27	99,02	99,63	
<i>Khoảng xác định (µg/ml)</i> Độ phục hồi 98 - 102%, RSD% ≤ 2,0%		71,88-119,80	43,00-71,68	136,75-227,90	
<i>Độ chính xác</i> RSD (%) ≤ 2,0%	Độ lặp lại	RSD%	1,2	0,78	0,78
	Độ CXTG	RSD%	1,18	1,23	1,34

Nhận xét: Phương pháp định lượng đồng thời matrin, sophoridin và oxymatrin trong cao dược liệu đạt yêu cầu thẩm định trên các chỉ tiêu ở cả 2 mẫu thử cao toàn phần và cao giàu flavonoid theo ICH.

Tiến hành so sánh kết quả định lượng hàm lượng các alkaloid trong mẫu cao toàn phần và cao giàu alkaloid. Kết quả như sau:

Bảng 6. Kết quả định lượng alkaloid

<i>Hàm lượng (%)</i>	<i>Cao toàn phần</i>	<i>Cao giàu alkaloid</i>
<i>Matrin</i>	4,788	19,745
<i>Sophoridin</i>	3,026	12,199
<i>Oxymatrin</i>	7,439	27,133
<i>Tổng</i>	15,253	59,077

Nhận xét: Hàm lượng các alkaloid đã được làm giàu lên trong cao định chuẩn alkaloid, matrin được làm giàu gấp 4,12 lần, sophoridin gấp 4,03 lần và oxymatrin gấp 3,65 lần.

Tổng hàm lượng các alkaloid đã được làm giàu gấp 3,87 lần.

Xây dựng tiêu chuẩn cơ sở cho cao định chuẩn giàu alkaloid

Bảng 7. Đề xuất các chỉ tiêu và mức chất lượng cho các cao định chuẩn

Chỉ tiêu	Yêu cầu kỹ thuật	
<i>Mô tả</i>	Thể chất lỏng, sệt, màu vàng nâu, mùi thơm đặc trưng	
<i>Định tính</i>	Định tính sự có mặt của các alkaloid matrin, sophoridin, oxymatrin	
<i>Mất khối lượng do làm khô</i>	Không quá 20%	
<i>Định lượng</i>	Tổng hàm lượng các alkaloid là matrin, sophoridin, oxymatrin không được thấp hơn 32,4%.	
<i>Tro toàn phần</i>	Không quá 1,0%	
<i>Cặn không tan trong nước</i>	Không quá 5,0%	
<i>Kim loại nặng</i>	As không quá 1 ppm Hg không quá 1 ppm	Cd không quá 1 ppm Pb không quá 1 ppm
<i>Giới hạn nhiễm khuẩn</i>	Đạt yêu cầu giới hạn nhiễm khuẩn cho chế phẩm thuốc uống có nguồn gốc tự nhiên (động thực vật, khoáng vật); cao thuốc, còn thuốc dùng để sản xuất thuốc uống từ được liệu. (Phụ lục 13.6. ĐEVN V)	

Bàn luận

Đã xây dựng được phương pháp điều chế cao định chuẩn giàu alkaloid từ cao toàn phần khô sâm bắc. Sử dụng các tác nhân hữu cơ để điều chỉnh pH sẽ an toàn cho môi trường và cho người thực hiện, đồng thời dễ dàng loại bỏ khỏi sản phẩm cao thu được. Tuy nhiên phương pháp được xây dựng ở quy mô phòng thí nghiệm, sản phẩm thu được chỉ phục vụ cho mục đích nghiên cứu thành phần hóa học hay thử hoạt tính sinh học,... Vì vậy khi tiến hành điều chế với quy mô lớn hơn để đưa vào sản xuất cần xây dựng quy trình với rất nhiều các yếu tố cần khảo sát.

Xây dựng được phương pháp định tính, định lượng alkaloid trên các cao chiết thu được. Có thể định tính, định lượng được các thành phần trong cao là chỉ tiêu quan trọng nhất giúp đánh giá chất lượng của sản phẩm. Phương pháp đã được xây dựng sẽ là tài liệu tham khảo hữu ích sau này khi tiến hành xây dựng phương pháp định lượng các thành phần tương tự trên các nền mẫu thử khác, phức tạp hơn như trong dược liệu và trong sản phẩm thuốc.

Cao định chuẩn alkaloid đã được xây dựng tiêu chuẩn cơ sở. Tuy chưa thể ứng dụng vào mục đích sản xuất nhưng có thể dùng để đánh giá tác dụng sinh học cũng như độc tính, phân tích thành phần hóa học. Có thể tiến hành phân lập xác định cấu trúc các hoạt chất, thu được lượng chất tinh khiết lớn hơn, rút ngắn thời gian phân lập do tạp chất đã được loại bỏ. Ghi nhận kết quả kiểm nghiệm các chỉ tiêu làm cơ sở giúp đánh giá sản phẩm cao định chuẩn được điều chế ở quy mô lớn hơn sau này.

Kết luận

Đã xây dựng được phương pháp chiết cao toàn phần sử dụng ethanol 70 % làm dung môi chiết từ mỗi 2 kg dược liệu thu được 553,8 g và 542,2 g cao toàn phần. Từ 280 g và 270 g cao

toàn phần theo quy trình xây dựng thu được 50,9 g và 44,2 g cao định chuẩn alkaloid với độ ẩm lần lượt là 13,41 % và 15,58 %. Hàm lượng alkaloid trong cao định chuẩn gấp 3,87 lần so với cao toàn phần.

Đã xây dựng và thẩm định phương pháp định tính, định lượng ba hoạt chất chính: matrin, sophoridin, oxymatrin trong cao toàn phần và cao giàu alkaloid bằng phương pháp **HPLC** đạt theo ICH về các chỉ tiêu tuyến tính, độ lặp, độ chính xác trung gian, độ đặc hiệu, độ đúng.

Đã xây dựng tiêu chuẩn cơ sở cho cao định chuẩn giàu alkaloid với các chỉ tiêu định tính, định lượng, mất khối lượng do làm khô, tro toàn phần, cặn không tan trong nước, kim loại nặng, giới hạn nhiễm khuẩn.

Tài liệu tham khảo

- Ding P. L., Liao Z. X., Huang H. *et al.*, (2006), "(+)-12 α -hydroxysophocarpine - a new quinolizidine alkaloid and related anti-HBV alkaloids from *Sophora flavescens*", *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 16 (5), pp. 1231-1235.
- Lin Z., Huang C. F., Liu X. S. *et al.*, (2011), "In vitro anti-tumour activities of quinolizidine alkaloids derived from *Sophora flavescens* Ait.", *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, 108 (5), pp. 304-309.
- Lương Ngọc Lan Thanh (2017), "Nghiên cứu quy trình chiết xuất, phân lập flavonoid trong rễ khô sâm bắc (*Sophora flavescens* Ait.)", *Khóa luận tốt nghiệp Dược sĩ đại học, Trường Đại học Y Dược Thành phố Hồ Chí Minh*.
- "*Sophora flavescens Radix*" monographs (2018), 4, Hong Kong Chinese Material Medicine Standard.
- ICH Harmonised Tripartite Guideline (2005), Validation of analytical procedures: Text and methodology, pp. 1-13.
- Bộ Y tế (2017), *Dược điển Việt Nam V*, tập 2, NXB Y học, Hà Nội, tr. 188-190.