

# Phân lập acid asperulosidic và định tính dược liệu nhàu trong bài thuốc hỗ trợ điều trị thoái hóa cột sống của Lương y Nguyễn Thiện Chung

Phạm Ngọc Thạc<sup>1,2</sup>, Huỳnh Trần Quốc Dũng<sup>2</sup>  
Võ Thanh Hóa<sup>3</sup>, Nguyễn Đức Hạnh<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Khoa Dược, Đại học Y Dược Thành phố Hồ Chí Minh

<sup>2</sup>Bệnh viện Y học cổ truyền Thành phố Hồ Chí Minh

<sup>3</sup>Khoa Dược, Đại học Y Khoa Đà Nẵng, Đà Nẵng

## Summary

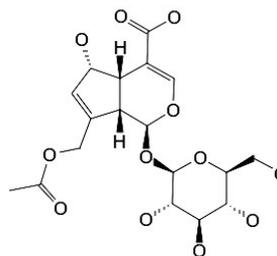
The spinal degeneration remedy of physician Nguyen Thien Chung (BT) has been using as an effective remedy in An Giang province for a long time. Callus Morindae citrifoliae (CM) is the major herbal medicine of BT. This study aimed at isolating asperulosidic acid from CM and employing asperulosidic acid as a marker of BT for HPLC qualification. CM was extracted using ethanol 70% as a solvent and the extract was fractionated by partition separation, several column chromatography methods. Asperulosidic acid was purified using a preparative high performance liquid chromatography (HPLC) method to obtain a purity of 97.30%. The structure of asperulosidic acid was confirmed by MS, <sup>1</sup>H-NMR and <sup>13</sup>C-NMR spectra and compared with the reference data. Asperulosidic acid was further employed for CM qualification in BT using an HPLC qualitative method of which the specificity and repeatability were validated. It was the first report on the isolation of asperulosidic acid from CM and employing asperulosidic acid as a marker for HPLC qualitative method of CM in BT.

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

## Đặt vấn đề

Bài thuốc hỗ trợ điều trị thoái hóa cột sống của lương y Nguyễn Thiện Chung (BT) là bài thuốc gồm 13 dược liệu, được lương y Nguyễn Thiện Chung sử dụng điều trị thành công bệnh thoái hóa cột sống lưng, lợi thủy, trĩ nội trĩ ngoại tại tỉnh An Giang và một số tỉnh lân cận. Dược liệu thân nhàu được sử dụng với vai trò là vị Quân của BT. Dược liệu nhàu đã được sử dụng trong Y học cổ truyền với công dụng hạ sốt, chữa ho, điều kinh, đau nhức xương khớp, huyết áp, tăng cường miễn dịch, tăng sức đề kháng cho cơ thể [1]. Acid asperulosidic (hình 1) là một hoạt chất của dược liệu nhàu, thuộc nhóm iridoid, 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- $\alpha$ ), interleukin-6 (IL-6)

dược liệu nhàu (vị Quân) trong BT là một tiêu và cyclooxygenase-2 (COX-2) [2]. Tiêu chí định tính chỉ quan trọng để xây dựng tiêu chuẩn cao chiết từ BT. Trong nghiên cứu này, hợp chất acid asperulosidic được phân lập từ dược liệu nhàu và được sử dụng làm chất điểm chỉ để định tính cao khô BT bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC).



Hình 1. Cấu trúc hóa học của acid asperulosidic

Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

Hóa chất, dung môi

Dược liệu thân nhàu (thu mua tại An Giang)

Chịu trách nhiệm: Nguyễn Đức Hạnh

Email: duchanh@ump.edu.vn

Ngày nhận: 22/4/2021

Ngày phản biện: 13/4/2021

Ngày duyệt bài: 25/5/2021

được định danh bằng phương pháp DNA tại Đại học Khoa học Tự nhiên TP. Hồ Chí Minh. Cao khô phun sấy BT (số lô NC1019, do nhóm nghiên cứu sản xuất thử nghiệm). *n*-hexan, chloroform, ethyl acetat (EtOAc), *n*-butanol, methanol (MeOH), ethanol (EtOH), acid sulfuric, acid formic đạt tiêu chuẩn phân tích (Merck, Đức). Silica gel 60 cỡ hạt 0,043 - 0,06 mm, silica gel pha đảo C<sub>18</sub> cỡ hạt 0,055 mm (Merck). Acetonitril (CH<sub>3</sub>CN), acid phosphoric (Scharlau, Tây Ban Nha) và nước cất 2 lần đạt tiêu chuẩn dùng cho **HPLC**.

**So sánh thành phần dịch chiết dược liệu nhàu và cao khô BT**

Mẫu cao khô BT: Cân 200 mg cao khô BT vào bình định mức 10 ml. Thêm 8 ml MeOH, siêu âm 5 phút, để nguội đến nhiệt độ phòng, bổ sung MeOH đến vạch. Lọc dịch chiết cho vào chén sứ, cô đến cạn. Thêm 2 ml MeOH vào chén sứ để hòa cồn, lọc qua màng lọc 0,22 µm.

Mẫu thử dược liệu nhàu: Cân 1 g bột thân cây nhàu, thêm 15 ml MeOH siêu âm trong 20 phút. Lọc và cô các dịch chiết tới cạn. Hòa cồn trong 1 ml MeOH.

Chăm riêng biệt từng mẫu và triển khai sắc ký lớp mỏng (**SKLM**). Phun dung dịch acid sulfuric 10% trong EtOH, sấy bản mỏng ở 105 °C trong 10 phút.

**Phân lập hợp chất từ thân cây nhàu**

Dược liệu nhàu (2 kg) được ngâm lạnh trong EtOH 70%, cô thu hồi dung môi thu được cao lỏng toàn phần. Tiến hành lãc phân bố cao lỏng nhàu lần lượt với các dung môi *n*-hexan và EtOAc, cô thu hồi dung môi thu được cao *n*-hexan và cao EtOAc. Kết hợp các kỹ thuật sắc ký cột pha thuận, pha đảo để phân lập hợp chất tinh khiết.

**Kiểm tra độ tinh khiết và xác định cấu trúc hợp chất phân lập**

Độ tinh khiết của hợp chất phân lập được kiểm tra bằng phương pháp **SKLM** với 3 hệ dung môi có độ phân cực khác nhau và bằng phương pháp **HPLC**.

Cấu trúc của hợp chất phân lập được xác định dựa vào kết quả của phổ **MS**, phổ <sup>1</sup>H-NMR, <sup>13</sup>C-NMR (đo trên máy Bruker Avance 500 MHz) và đối chiếu với dữ liệu từ tài liệu tham khảo để xác định cấu trúc hóa học của hợp chất phân lập.

**Định tính dược liệu nhàu trong BT bằng phương pháp HPLC sử dụng chất điểm chỉ acid asperulosidic**

**Mẫu thử cao khô BT:** Cân 30 mg cao khô

BT phân tán trong 6 ml H<sub>2</sub>O (siêu âm 5 phút) làm dung dịch mẫu nạp lên cột SPE C<sub>18</sub>. Lần lượt cho qua cột 30 ml các dung môi H<sub>2</sub>O, MeOH 10%, gom các dịch rửa giải MeOH 10%, cô đến cạn. Thêm 2 ml MeOH để hòa tan cồn, lọc qua màng lọc 0,22 µm.

**Mẫu dược liệu nhàu:** Cân 30 mg cao dược liệu nhàu (dược liệu nhàu được chiết bằng MeOH 100%, cô đến cạn thu được cao nhàu) phân tán trong 6 ml nước (siêu âm 5 phút) làm dung dịch mẫu nạp lên cột SPE C<sub>18</sub>. Tiến hành như phương pháp chuẩn bị mẫu thử cao khô BT.

**Mẫu thử cao khô BT không chứa dược liệu nhàu:** Cân 30 mg cao khô BT không chứa dược liệu nhàu phân tán trong 6 ml nước (siêu âm 5 phút) làm dung dịch mẫu nạp lên cột SPE C<sub>18</sub>. Tiếp tục tiến hành như phương pháp chuẩn bị mẫu thử cao khô BT.

**Mẫu chất đối chiếu acid asperulosidic:** Dung dịch acid asperulosidic pha trong MeOH nồng độ 0,1 mg/ml.

**Điều kiện sắc ký:** Hệ thống sắc ký Shimadzu LC-2030C 3D plus, sử dụng đầu dò DAD. Cột: C18 Shim-pack GIST (250 x 4,6 mm, 5 µm). Nhiệt độ cột 30 °C. Thể tích tiêm 10 µl. Tốc độ dòng 1 ml/phút và bước sóng phát hiện là 236 nm. Chương trình pha động được trình bày trong bảng 1.

**Bảng 1.** Chương trình pha động HPLC định tính dược liệu nhàu trong cao khô BT

Thời gian (phút)	Dung dịch acid	
	H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> 0,1 % trong H <sub>2</sub> O (%)	Acetonitril (%)
0	95	5
50	60	40
50,01	5	95
70	5	95
70,01	95	5
80	95	5

**Độ đặc hiệu của quy trình định tính:** Tiến hành sắc ký **HPLC** lần lượt mẫu cao khô BT, mẫu cao khô BT không chứa dược liệu nhàu, mẫu dược liệu nhàu và mẫu chất điểm chỉ acid asperulosidic. Ghi nhận thành phần các mẫu khảo sát, độ tinh khiết các pic tương ứng với pic acid asperulosidic trong các mẫu khảo sát.

**Độ lặp lại của quy trình định tính:** Tiến hành phân tích bằng phương pháp **HPLC** 6 mẫu thử cao khô BT ở cùng một điều kiện. Yêu cầu RSD của thời gian lưu chất điểm chỉ trong mẫu thử cao khô BT không quá 2%.

## Kết quả và bàn luận

### So sánh thành phần dịch chiết dược liệu nhàu và cao khô BT

Hình 2 cho thấy mẫu dịch chiết MeOH của cao khô BT chứa nhiều thành phần có  $R_f$  tương ứng với  $R_f$  của các vết trong dược liệu nhàu (vị

Quần của BT). Như vậy, việc phân lập các chất từ dược liệu nhàu có  $R_f$  tương ứng với  $R_f$  của các vết trong mẫu cao khô BT có thể là phương pháp tiếp cận tốt cho việc phân lập chất điểm chỉ cho cao khô BT.



Bản mỏng: Silica gel 60 F<sub>254</sub>  
Hệ dung môi: CHCl<sub>3</sub> - MeOH - H<sub>2</sub>O (65:35:10, lớp dưới)  
Phát hiện: Thuốc thử H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 10%/EtOH sấy 105 °C (b)  
TP: Dịch chiết MeOH của cao khô BT  
N: Dịch chiết MeOH của dược liệu nhàu

Hình 2. SKLM so sánh thành phần dịch chiết MeOH của dược liệu nhàu và cao khô BT

### Phân lập hợp chất từ nhàu

Kết quả SKLM cho thấy cao EtOAc chứa các vết chính trong cao lỏng nhàu và các vết tách

nhau rõ (hình 3). Vì vậy, cao EtOAc được chọn để tiếp tục phân lập hợp chất.

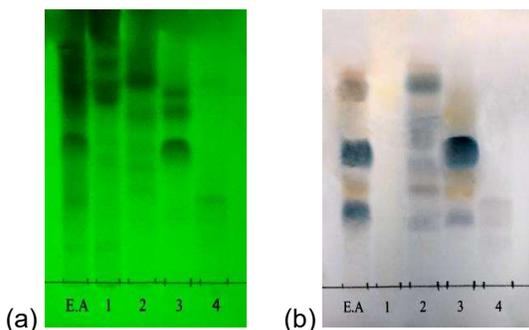


Bản mỏng: Silica gel 60 F<sub>254</sub>  
Hệ dung môi: CHCl<sub>3</sub> - MeOH - H<sub>2</sub>O (65:35:10, lớp dưới)  
Phát hiện: H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 10%/EtOH sấy 105 °C  
CTP: Cao lỏng nhàu  
hex: Phân đoạn n-hexan  
E.A: Cao EtOAc

Hình 3. SKLM kiểm tra các phân đoạn chiết phân bố cao nhàu

Cao EtOAc được tiến hành sắc ký cột pha thuận với hệ dung môi pha động gồm CHCl<sub>3</sub> - MeOH lần lượt với tỉ lệ 98:2 (phân đoạn 1), 96:4

(phân đoạn 2), 94:6 (phân đoạn 3) và 100:0 (phân đoạn 4). Sau khi cô thu hồi dung môi phân đoạn 3, thu được 2,95 g cặn.

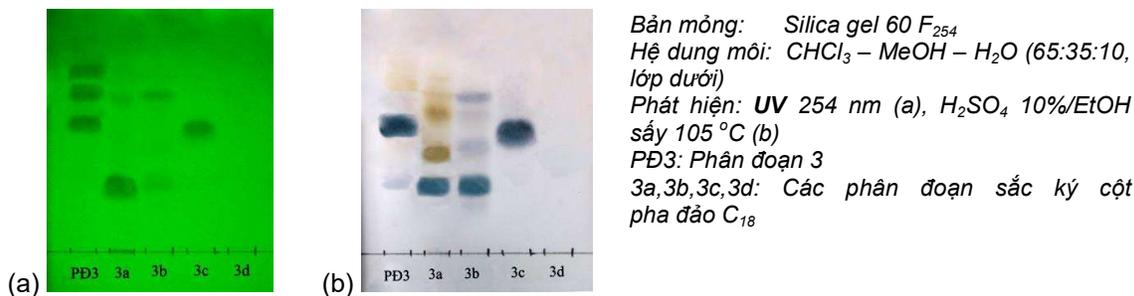


Bản mỏng: Silica gel 60 F<sub>254</sub>  
Hệ dung môi: CHCl<sub>3</sub> - MeOH - H<sub>2</sub>O (65:35:10, lớp dưới)  
Phát hiện: (a) UV 254 nm và (b) H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 10%/EtOH sấy 105 °C  
E.A: Cao EtOAc  
1: Phân đoạn 1  
2: Phân đoạn 2  
3: Phân đoạn 3  
4: Phân đoạn 4

Hình 4. SKLM các phân đoạn sắc ký cột pha thuận từ cao EtOAc

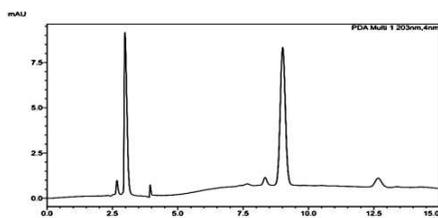
Phân đoạn 3 được tiếp tục tinh chế bằng sắc ký cột pha đảo với hệ dung môi MeOH - H<sub>2</sub>O lần lượt với tỉ lệ 0:100 (phân đoạn 3a), 5:95

(phân đoạn 3b), 5:95 (phân đoạn 3c), 100:0 (phân đoạn 3d). Phân đoạn 3c được cô thu hồi dung môi, thu được 967 mg cặn.



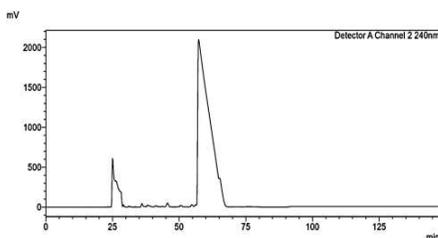
Hình 5. SKLM các phân đoạn sắc ký cột đảo từ phân đoạn 3

Kiểm tra bằng phương pháp HPLC cho thấy phân đoạn 3c còn lẫn nhiều pic tạp (hình 6). Từ đó, tiếp tục tinh khiết hóa phân đoạn 3c bằng phương pháp sắc ký điều chế (hình 7) thu được 822 mg một hợp chất đặt tên là NH.



Cột C18 Shim-pack GIST (250 x 4,6 mm, 5 μm)  
 Thể tích tiêm: 10 μl  
 Tốc độ dòng: 1 ml/phút  
 Bước sóng phát hiện: 203 nm  
 Pha động: CH<sub>3</sub>CN - dung dịch H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 0,1 % trong H<sub>2</sub>O (12:82)

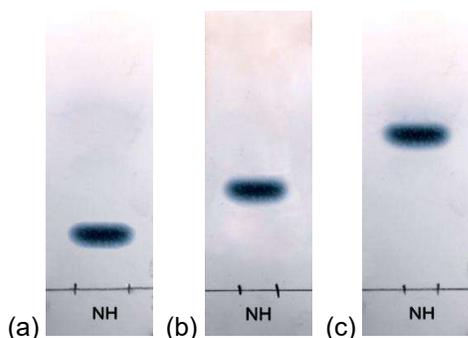
Hình 6. Sắc ký đồ HPLC kiểm tra độ tinh khiết của phân đoạn 3c



Cột C18 Shim-pack GIST (250 x 20 mm, 10 μm)  
 Thể tích tiêm: 10 ml  
 Tốc độ dòng: 7 ml/phút  
 Bước sóng phát hiện: 203 nm  
 Pha động: CH<sub>3</sub>CN - dung dịch H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 0,1 % trong H<sub>2</sub>O (10:90)

Hình 7. Sắc ký đồ HPLC điều chế phân đoạn 3c

Kiểm tra độ tinh khiết và xác định cấu trúc hợp chất NH phân lập kiểm tra bằng phương pháp SKLM với ba hệ dung môi có độ phân cực khác nhau. Kết quả trình bày trong hình 8.

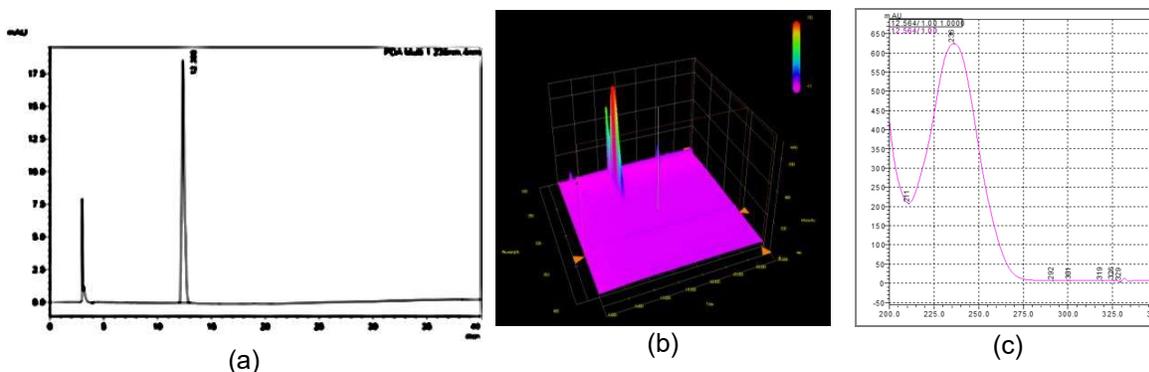


Bản mỏng Silica gel 60 F<sub>254</sub> – Merck.  
 Phát hiện: H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 10%/EtOH, sấy 105 °C.  
 (a) Hệ dung môi: CHCl<sub>3</sub> – EtOAc – MeOH – H<sub>2</sub>O (14:40:22:10)  
 (b) Hệ dung môi: n-BuOH – H<sub>2</sub>O – CH<sub>3</sub>COOH (5:4:1, lớp trên)  
 (c) Hệ dung môi: CHCl<sub>3</sub> – MeOH – H<sub>2</sub>O (65:35:10, lớp dưới)

Hình 8. SKLM khảo sát độ tinh khiết của hợp chất NH

Kiểm tra độ tinh khiết của hợp chất **NH** bằng phương pháp **HPLC-PDA** cho thấy hợp chất **NH** cho một pic chính trên sắc ký đồ ở

thời gian lưu khoảng 12 phút, có độ tinh khiết pic 97,30% (hình 9).



**Hình 9. Sắc ký đồ HPLC (a) 2 chiều và (b) 3 chiều và (c) phổ UV của hợp chất NH**  
 Cột  $C_{18}$  Shim-pack GIST (250 x 4,6 mm, 5  $\mu$ m), thể tích tiêm: 10  $\mu$ l, tốc độ dòng: 1 ml/phút,  
 bước sóng 236 nm, pha động:  $CH_3CN$  - dung dịch  $H_3PO_4$  0,1% trong  $H_2O$   
 (từ 5 đến 65%  $CH_3CN$  trong 40 phút)

#### Xác định cấu trúc hợp chất **NH**

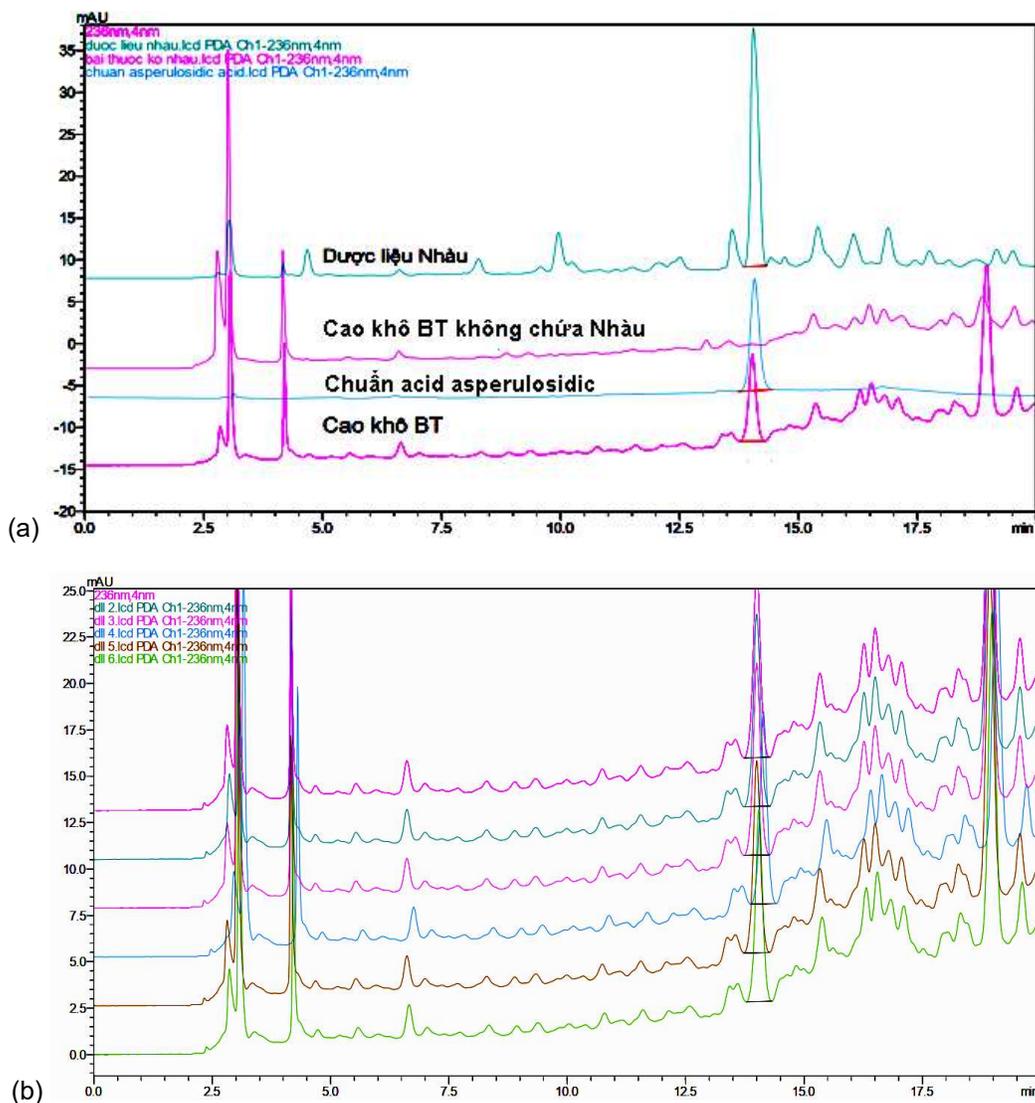
Chất rắn màu vàng nhạt; **ESI-MS**  $m/z$  : 431,15  $[M-H]^-$ ;  **$^1H-NMR$**  (500 MHz,  $CD_3OD$ )  $\delta_H$  (ppm): 7,58 (1H, s, H-3), 6,02 (1H, s, H-7), 5,04 (1H, d,  $J = 8,99$  Hz, H-1), 4,95 (1H, m, H-10), 4,87 (1H, m, H-6), 4,74 (1H, d,  $J = 7,82$  Hz, H-1'), 3,64 (1H, dd,  $J = 11,70$  Hz, H-6'a), 3,87 (1H, brd,  $J = 11,70$  Hz, H-6'b), 3,05 (1H, m, H-3), 2,63 (1H, dd,  $J = 7,83$  Hz, H-9), 2,11 (3H, s, - $CH_3$ ).  **$^{13}C-NMR$**  (125 MHz,  $CD_3OD$ )  $\delta_C$  (ppm): 172,57 (CO), 170,18 (COOH), 153,90 (C-3), 146 (C-8), 131,77 (C-7), 109,18 (C-4), 100,97 (C-1), 100,46 (C-1'), 78,55 (C-3'), 77,85 (C-5'), 75,61 (C-6), 74,95 (C-2'), 71,56 (C-1'), 63,88 (C-10), 62,96 (C-6'), 46,46 (C-9), 43 (C-5), 20,73 ( $CH_3$ ).

Phổ  **$^1H-NMR$**  cho thấy tín hiệu proton ở vị trí 7,69 ppm và 6,02 ppm (s, 1H) của hai nhóm methyl (CH) chứng tỏ có hai nối đôi. Phổ  **$^1H-NMR$**  còn cho thấy tín hiệu proton ở vị trí 4,99 ppm và 4,83 ppm (m, 1H) chứng tỏ có hai nhóm methyl (CH) hoặc một nhóm  $CH_2$  với hai hydro phân đỉnh. Ngoài ra, có tín hiệu proton ở vị trí 2,12 ppm (s, 3H) chứng tỏ có một nhóm  $CH_3$ . Phổ  **$^{13}C-NMR$**  cho thấy có 18 tín hiệu C, trong đó tín hiệu 170,8 ppm và 172,5 ppm,

chứng tỏ có hai nhóm CO. Ngoài ra có 6 tín hiệu carbon ở 62,96; 71,56; 74,95; 77,85; 78,55 và 100,46; các tín hiệu carbon này dự đoán có một phân tử đường hexose. Hợp chất **NH** có  $\Delta = 7$  nhưng trên phổ  **$^1H-NMR$**  và  **$^{13}C-NMR$**  thì thấy được có 4 liên kết pi và 1 vòng của đường hexose nên dự đoán trong cấu trúc của **NH** còn có thêm 2 vòng. Dữ liệu phổ khối và **NMR** được tham khảo tài liệu xác định cấu trúc hợp chất **NH** là acid asperulosidic [3].

#### Định tính dược liệu nhàu trong BT bằng phương pháp HPLC sử dụng chất điểm chỉ acid asperulosidic

Hợp chất acid asperulosidic phân lập được ứng dụng làm chất điểm chỉ định tính dược liệu nhàu trong cao khô BT bằng phương pháp **HPLC**. Sau khi sàng lọc các điều kiện **HPLC**, chọn điều kiện cho pic của acid asperulosidic tách hoàn toàn với các pic khác trên sắc ký đồ của mẫu cao khô BT. Quy trình định tính được thẩm định với độ đặc hiệu và độ lặp lại. Kết quả được trình bày trong hình 10.

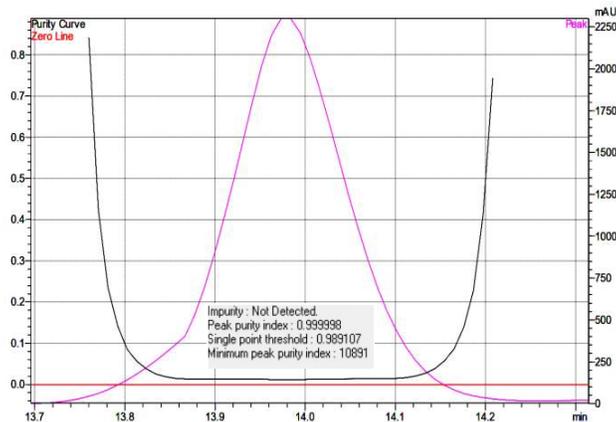


**Hình 10. (a) Độ đặc hiệu và (b) độ lặp lại của quy trình định tính dược liệu nhàu trong cao khô BT ( $R_t$  của acid asperulosidic khoảng 14 phút)**

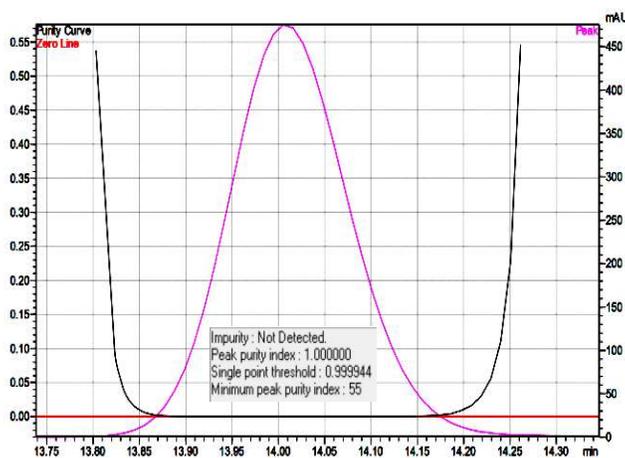
Hình 10a cho thấy sắc ký đồ mẫu thử cao khô BT và dược liệu nhàu cho pic có thời gian lưu (khoảng 14 phút) tương ứng với thời gian lưu của acid asperulosidic trong mẫu chuẩn. Sắc ký đồ mẫu thử cao khô BT không chứa dược liệu nhàu không cho pic trùng với thời gian lưu của acid asperulosidic trong mẫu thử cao khô BT và dược liệu nhàu. Phổ **UV - Vis** tại thời gian lưu của pic acid asperulosidic trong mẫu thử cao khô BT giống với phổ **UV - Vis** của pic acid asperulosidic tại thời gian lưu tương ứng

trong dược liệu nhàu và các pic acid asperulosidic đạt yêu cầu về độ tinh khiết pic (hình 11). Kết quả khảo sát độ lặp lại cho thấy thời gian lưu ( $t_R$ ) của các pic acid asperulosidic có RSD nhỏ hơn 2% (hình 10b).

Quy trình định tính dược liệu nhàu trong cao khô BT sử dụng acid asperulosidic làm chất điểm chỉ đạt yêu cầu độ lặp lại và độ đặc hiệu. Vậy, quy trình có thể được áp dụng để định tính dược liệu nhàu trong cao khô BT.



(a)



(b)

Hình 11. Độ tinh khiết pic acid asperulosidic trong (a) cao khô BT và (b) dược liệu nhàu

### Kết luận

Hợp chất acid asperulosidic đã được nghiên cứu phân lập thành công từ dịch chiết EtOH 70% của dược liệu nhàu. Hợp chất acid asperulosidic được dùng để định tính dược liệu nhàu trong cao khô BT bằng phương pháp **HPLC**. Quy trình định tính đạt yêu cầu về độ đặc hiệu và độ lặp lại và có thể được ứng dụng trong xây dựng tiêu chuẩn chất lượng cao khô BT và các sản phẩm liên quan.

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. Bộ Y tế (2018), *Dược điển Việt Nam V*, tập 2, NXB Y học Hà Nội.
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- $\kappa$ B and MAPK signaling pathways in LPS-induced RAW 264.7 Macrophages", *Int. J. Mol. Sci.*, 19 (7), pp. 20-27.
3. Tzakoua O., Mylonasa P., Vagiassa C., Petrakis P. V. (2007), "Iridoid glucosides with insecticidal activity from *Galium melanantherum*", *Z. Naturforsch. C.*, 62 (7-8), pp. 597-602.