

Xây dựng phương pháp định tính, định lượng hoạt chất physcion trong rễ hà thủ ô đỏ (*Fallopia multiflora* Thunb.) bằng phương pháp HPLC

Nguyễn Thị Hồng Thanh^{1,2}, Doãn Văn Thành³
Trần Đình Thắng⁴, Bùi Thị Thúy Luyện¹, Nguyễn Đình Luyện^{1*}

¹Trường Đại học Dược Hà Nội

²Trường Đại học Y khoa Vinh

³Trung tâm Kiểm nghiệm Thuốc, Mỹ phẩm, Thực phẩm Nghệ An

⁴Trường Đại học Công nghiệp Thành phố Hồ Chí Minh

Summary

The presence and content of physcion in *Fallopia multiflora* Thunb. was determined using a high-performance liquid chromatography (HPLC) method. The analysis was performed on column - RP C18 (250 x 4.6 mm, 5 μ m) with a gradient elution of acetonitrile – 0.1% formic acid at flow rate of 1.0 ml/min and injection volume of 10 μ l. The detection wavelength was set at 275 nm. For assessment of the practical application, the *Fallopia multiflora* sample collected in Ky Son, Con Cuong, Que Phong, Nghe An province, was tested and the content of physcion was found 0.56 - 0.57 mg/g.

Keywords: *Fallopia multiflora*, physcion, HPLC.

Đặt vấn đề

Rễ cây hà thủ ô đỏ (*Fallopia multiflora* Thunb.) là một loại dược liệu quý, được sử dụng lâu đời trong nhân dân để điều trị các bệnh thần kinh suy nhược, thiếu máu, chóng mặt, ù tai, đau lưng, mỏi gối, râu tóc bạc sớm. Tuy nhiên, bên cạnh tác dụng trị bệnh thì các tác dụng phụ trên gan của *Fallopia multiflora* cũng đã được báo cáo phổ biến ở Trung Quốc và nhiều nước khác. Độc tính cấp trên gan của loại dược liệu này cũng được báo cáo thường xuyên [1, 2]. Yu J. và CS. đã báo cáo rằng, physcion cho thấy độc tính tế bào yếu đối với dòng tế bào gan người LO2 nhưng lại gây ra tổn thương màng phụ thuộc vào liều (20 - 300 μ M) và sự bài tiết enzym của tế bào LO2 bằng cách tăng nồng độ LDH, AST, ALT và ALP [3]. Bên cạnh đó, physcion cũng gây độc đáng kể đối với tế bào HepG2, tế bào gan chính của chuột và tế bào gan của chuột được nuôi cấy [4, 5].

Một nghiên cứu khác đã chứng minh rằng emodin, rhein và physcion có thể ức chế đáng kể sự tăng sinh của tế bào HK-2 với các giá trị IC₅₀ tương ứng là 130,65; 82,97 và 76,02 μ mol/L [6]. Physcion cũng gây độc tế bào rõ rệt đối với tế bào u nguyên bào thần kinh HaCaT và SHSY5Y ở người [7]. Một số nghiên cứu khác cũng cho thấy physcion gây độc gan [8]. Từ lý do trên, physcion được coi là hoạt chất đánh dấu quan trọng của loại dược liệu hà thủ ô đỏ và cần thiết phải được xác định hàm lượng để lựa chọn được dược liệu đảm bảo chất lượng. Tuy nhiên hiện nay mới có ít nghiên cứu về định tính và định lượng thành phần physcion trong dược liệu hà thủ ô đỏ. Bởi vậy, trong nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành xây dựng phương pháp định tính và định lượng hoạt chất physcion trong rễ hà thủ ô đỏ, bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC), với mong muốn đóng góp cơ sở khoa học cho việc kiểm nghiệm chất lượng dược liệu rễ hà thủ ô đỏ và cao điều chế từ dược liệu này.

Nguyên liệu, thiết bị và phương pháp nghiên cứu

Nguyên liệu, thiết bị

Rễ hà thủ ô đỏ thu hái từ nguồn trồng được tại huyện Kỳ Sơn, nguồn mọc hoang tại huyện

Chịu trách nhiệm: Nguyễn Đình Luyện

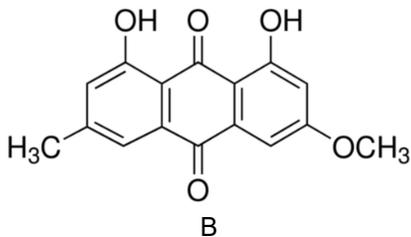
Email: ngdluyen@hotmail.com

Ngày nhận: 18/6/2021

Ngày phân biện: 13/7/2021

Ngày duyệt bài: 24/9/2021

Con Cuông và huyện Quế Phong, tỉnh Nghệ An (Việt Nam).



Hình 1. Chất physcion

Chất chuẩn physcion: Hãng Merck – Đức, số lô 103174295, hàm lượng 98,0 %. Nước (RO), methanol, acid formic, acetonitril (Hãng Merck – Đức).

Máy sắc ký lỏng hiệu năng cao Chromaster/HITACHI với detector DAD, cột HiQ sil C18HS (250 x 4,6 mm; 5 µm). Cân phân tích Sartorius GP ISOBP, PO3TB.01.01, bộ lọc dùng cho sắc ký với màng lọc 0,45 µm, bình định mức, pipet, máy chiết siêu âm.

Phương pháp nghiên cứu

Xây dựng phương pháp phân tích định tính, định lượng chất physcion bằng sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC): Sử dụng phương pháp chiết siêu âm để chiết xuất hợp chất từ dược liệu bằng dung môi methanol. Khảo sát lựa chọn chương trình sắc ký HPLC thích hợp để định tính, định lượng hợp chất physcion trong dược liệu. Từ đó tìm ra điều kiện tối ưu gồm qui trình chuẩn bị mẫu từ dược liệu, qui trình định lượng được thẩm định theo hướng dẫn chung của EMA bao gồm: Khảo sát độ đặc hiệu, tính thích hợp của hệ thống, độ tuyến tính, khoảng nồng độ tuyến tính, độ đúng, độ chính xác. Quy trình thẩm định sẽ được áp dụng để tiến hành định lượng hợp chất physcion trong mẫu dược liệu hà thủ ô đỏ thu hái tại Huyện Kỳ Sơn, Con Cuông và Quế Phong - Tỉnh Nghệ An.

Chuẩn bị mẫu

Mẫu chuẩn: Cân chính xác khoảng 5,0 mg chất physcion đối chiếu, hoà tan với 20,0 ml methanol trong bình định mức 20,0 ml (0,25 mg/ml). Sau đó pha loãng mẫu thành các nồng độ 12,5; 25,0; 50,0; 75,0; 100,0 µg/ml, lọc qua màng lọc kích cỡ 0,45 µm được dãy các dung dịch chuẩn.

Mẫu thử: Cân chính xác khoảng 1,0 gam dược liệu hà thủ ô đỏ đã nghiền mịn cho vào bình định mức có nút mài. Ngâm dược liệu ở

nhệt độ phòng với 20,0 ml dung môi methanol trong 60 phút rồi chiết bằng sóng siêu âm 60 phút ở nhiệt độ 40°C. Lọc qua màng lọc kích cỡ 0,45 µm (bỏ 5,0 ml dịch lọc đầu) được dung dịch tiêm sắc ký.

Điều kiện chạy sắc ký: Cột sắc ký RP C18 (250 x 4,6 mm, 5 µm), pha động: Acetonitril (ACN) – acid formic 0,1%, tốc độ dòng 1,0 ml/phút, thể tích mẫu tiêm vào cột 10 µl, detector bước sóng 275 nm, nhiệt độ 30 °C.

Cách tiến hành và tính toán kết quả

Tiêm lần lượt dung dịch thử và dung dịch chuẩn vào hệ thống sắc ký. Tiến hành sắc ký theo điều kiện đã nêu, ghi thời gian lưu và diện tích của pic chất của từng dung dịch. Hàm lượng physcion trong nguyên liệu tính theo công thức sau:

$$HL (\%) = \frac{C_{th} \times V \times P \times K \times 100}{1000 \times M \times (100 - b) \times 10}$$

Trong đó: C_{th}: nồng độ chất trong mẫu thử tính từ đường chuẩn (mg/ml); M: khối lượng mẫu dược liệu (g); b: độ ẩm dược liệu (%); K: Hệ số pha loãng; V: thể tích mẫu thử (ml); P: độ tinh khiết của chất chuẩn.

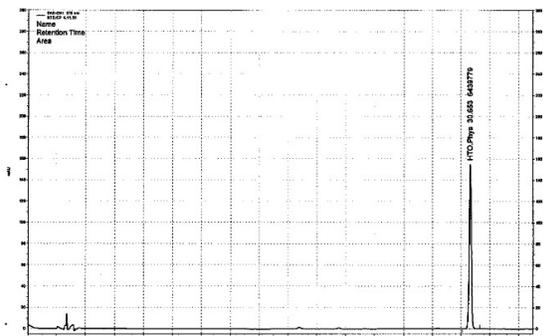
Xử lý và đánh giá kết quả

Các số liệu thực nghiệm được xử lý bằng phương pháp thống kê thông qua các giá trị trung bình, độ lệch chuẩn tương đối (RSD).

Kết quả và bàn luận

Điều kiện sắc ký thích hợp

Pha tĩnh: Cột sắc ký RP C18 (250 x 4,6 mm, 5 µm). Pha động là hỗn hợp dung môi acetonitril (A) – acid formic 0,1% (B) với sự rửa giải theo chương trình gradient là 0 - 10 phút, 44% A; 10 - 25 phút, 44 - 82% A; 25 - 30 phút, 82 - 90% A; 30 - 35 phút, 90% A, tốc độ dòng chảy 1,0 ml/phút, thể tích mẫu tiêm vào cột 10 µl, detector bước sóng 275 nm, nhiệt độ 30 °C.



Hình 2. Sắc ký đồ của chất chuẩn

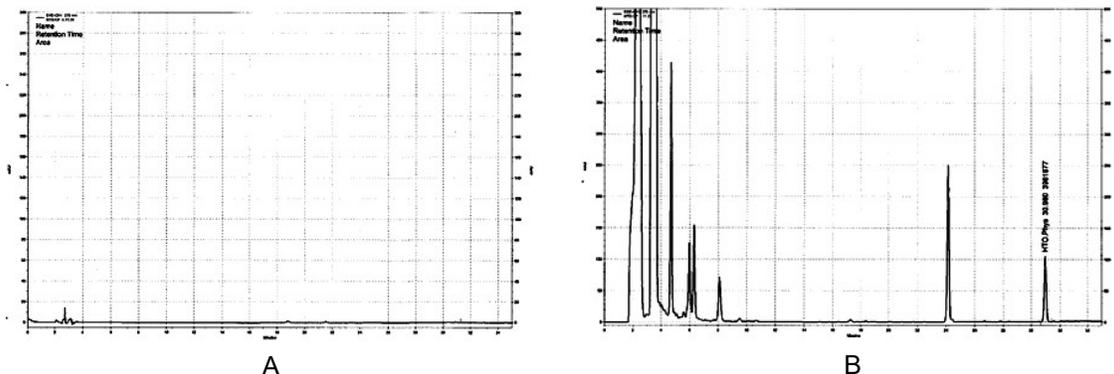
Sắc ký đồ **HPLC** thu được cho các pic của chất physcion tách rõ ràng, thời gian lưu là $t_R = 30,653$ phút.

Thẩm định phương pháp

Độ đặc hiệu: Tiến hành phân tích mẫu trắng (methanol), mẫu chất chuẩn physcion, mẫu thử theo điều kiện sắc ký đã lựa chọn. Kết quả thu được trình bày ở bảng 1 và hình 3.

Bảng 1. Kết quả khảo sát độ đặc hiệu

Mẫu	t_R (phút)	Spic (AU.s)
Mẫu trắng	0	0
Mẫu chuẩn	30,653	6439779
Mẫu thử	30,980	3981877



Hình 3. Sắc ký đồ của mẫu trắng (A) và mẫu thử (B)

Kết quả cho thấy tín hiệu pic của chất physcion xuất hiện tại thời gian lưu $t_R = 30,653$ phút. Trên sắc ký đồ mẫu trắng, không thấy xuất hiện tín hiệu pic tại thời gian lưu này và trên sắc ký đồ mẫu thử hà thủ ô đồ có tín hiệu pic này ($t_R = 30,980$), tín hiệu này tách khỏi các tín hiệu khác xuất hiện trên sắc ký đồ. Điều này chứng tỏ phương pháp có tính đặc hiệu - chọn lọc

phù hợp cho phân tích physcion trong dược liệu rễ hà thủ ô đồ.

Tính tương thích hệ thống: Để đánh giá tính thích hợp của hệ thống, tiến hành pha một mẫu đối chiếu có nồng độ 50,0 µg/ml như đã mô tả ở trên. Tiến hành sắc ký lặp lại 06 lần với điều kiện đã lựa chọn cho kết quả như bảng 2.

Bảng 2. Kết quả khảo sát tính thích hợp của hệ thống

Mẫu	1	2	3	4	5	6	RSD (%)
t_R (phút)	30,653	30,460	30,433	30,427	30,400	30,587	0,33
Spic (AU.s)	6439779	6459876	6474391	6501478	6609836	6496540	0,92

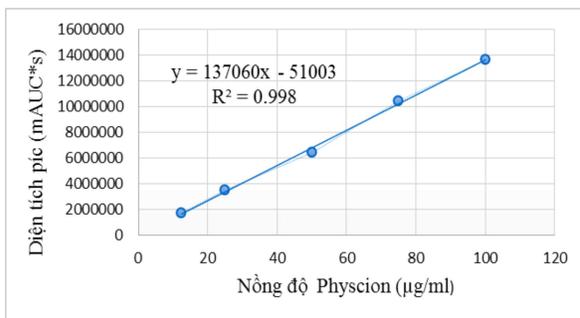
Độ lệch chuẩn tương đối của thời gian lưu và diện tích pic lần lượt là 0,33 và 0,92 (đều < 2 %). Kết quả cho thấy các điều kiện sắc ký đã lựa chọn và hệ thống **HPLC** sử dụng là phù hợp và đảm bảo sự ổn định của phép phân tích định lượng chất physcion.

Độ tuyến tính và khoảng tuyến tính: Chuẩn bị một dãy gồm 5 dung dịch mẫu đối chiếu

physcion như trên rồi tiến hành chạy sắc ký. Kết quả khảo sát (bảng 3) và phương trình hồi quy (hình 4) cho thấy với khoảng nồng độ từ 12,5 µg/ml đến 100,0 µg/ml có sự tương quan tuyến tính giữa nồng độ của chất physcion (x) và diện tích pic (y) với phương trình hồi quy: $y = 137060x - 51003$ (hệ số tương quan $R^2 = 0,998$ nằm trong khoảng giới hạn $0,99 \leq R^2 \leq 1$).

Bảng 3. Kết quả khảo sát khoảng tuyến tính

Nồng độ (µg/ml)	12,5	25,0	50,0	75,0	100,0
Spic (AU.s)	1693457	3510322	6439779	10439086	13640470



Hình 4. Đường chuẩn và phương trình hồi quy của physcion

Độ đúng: Độ đúng của phương pháp được xác định bằng phương pháp thêm chuẩn, tức là thêm vào mẫu thử đã được xác định hàm lượng một lượng chính xác chất physcion sao cho tổng nồng độ của chúng vẫn nằm trong khoảng tuyến tính đã khảo sát. Cụ thể, mỗi thí nghiệm thực hiện trên 2 mẫu rẽ HTO, mỗi mẫu cân chính xác khoảng 1,0 gam (1 mẫu thực không thêm

chuẩn, 1 mẫu được bổ sung thêm chuẩn). Pha dung dịch mẫu chuẩn có nồng độ 26,0 µg/ml. Hút chính xác 1,0 ml dung dịch thử và 1,0 ml chất chuẩn, lắc cho đồng đều rồi tiến hành định lượng. Hiệu suất thu hồi được tính theo công thức:

$$H(\%) = \frac{(2 \times C_{th+ch} - C_{th})}{C_{chuanthemvao}} \times 100\%$$

Trong đó: C_{th+ch} : Nồng độ mẫu thử được bổ sung thêm chuẩn; C_{th} : Nồng độ mẫu thử không thêm chuẩn; $C_{chuanthemvao}$: Nồng độ chất chuẩn được thêm vào.

Độ đúng của phương pháp được xác định từ tỷ lệ (%) thu hồi của chất đối chiếu thu được từ kết quả định lượng so với lượng chất chuẩn thêm vào. Kết quả thu được ghi ở bảng 5 cho thấy qui trình định lượng chất physcion có khả năng thu hồi > 95,88 % với RSD = 1,51 %, tức là phương pháp này có độ đúng cao.

Bảng 5. Kết quả khảo sát độ đúng của phương pháp

Mẫu	Nồng độ chuẩn thêm vào (µg/ml)	Nồng độ thử (µg/ml)		Nồng độ thử thêm chuẩn (µg/ml)		Hiệu suất thu hồi (%)
		Spic (AU.s)	Nồng độ	Spic (AU.s)	Nồng độ	
1	26,0	3944192	29,1492	3653110	27,0255	95,78
2	26,0	3923298	28,9968	3636497	26,9043	95,43
3	26,0	3902278	28,8434	3600882	26,6444	94,02
4	26,0	3904487	28,8596	3646722	26,9789	96,53
5	26,0	3954220	29,2224	3647947	26,9878	95,20
6	26,0	3912983	28,9215	3682895	27,2428	98,32
TB	26,0	3923576,3	28,9988	3644675,5	26,9639	95,88
RSD(%)		0,55	0,54	0,73	0,72	1,51

Độ chính xác

Độ lặp lại của phương pháp

Độ lặp lại của phương pháp được xác định bằng cách tiến hành 06 thí nghiệm riêng biệt để định lượng 1 mẫu hà thủ ô đo thu hái tại huyện

Kỳ Sơn, tỉnh Nghệ An. Kết quả thu được ở bảng 6 cho thấy hàm lượng trung bình của chất physcion trong hà thủ ô đo Kỳ Sơn là 0,57 mg/g (0,057 %), với RSD = 1,12 %).

Bảng 6. Kết quả khảo sát độ lặp lại của quy trình định lượng physcion

TT	Lượng mẫu thử (g)	t_R (phút)	Spic (AU.s)	Hàm lượng (mg/g)
1	1,0032	30,119	3813490	0,5595
2	1,0056	30,387	3903485	0,5712
3	1,0034	30,498	3863358	0,5666
4	1,0028	30,298	3899498	0,5722
5	1,0012	30,457	3913137	0,5751
6	1,0089	30,346	3844490	0,5608
TB	1,0042	30,351	3872910	0,5675
RSD(%)		0,004	0,01	1,12

Độ tái lập của phương pháp

Độ tái lập của phương pháp được đánh giá dựa trên độ lệch chuẩn tương đối của 12 thí nghiệm trên cùng một mẫu phân tích trong 2 ngày khác nhau, mỗi ngày phân tích lặp lại

06 lần theo phương pháp đã xác định. Kết quả thu được cho thấy các giá trị RSD đều nhỏ hơn 2%, chứng tỏ phương pháp phân tích đạt yêu cầu về độ chính xác khác ngày.

Bảng 7. Kết quả khảo sát độ tái lập của quy trình định lượng physcion

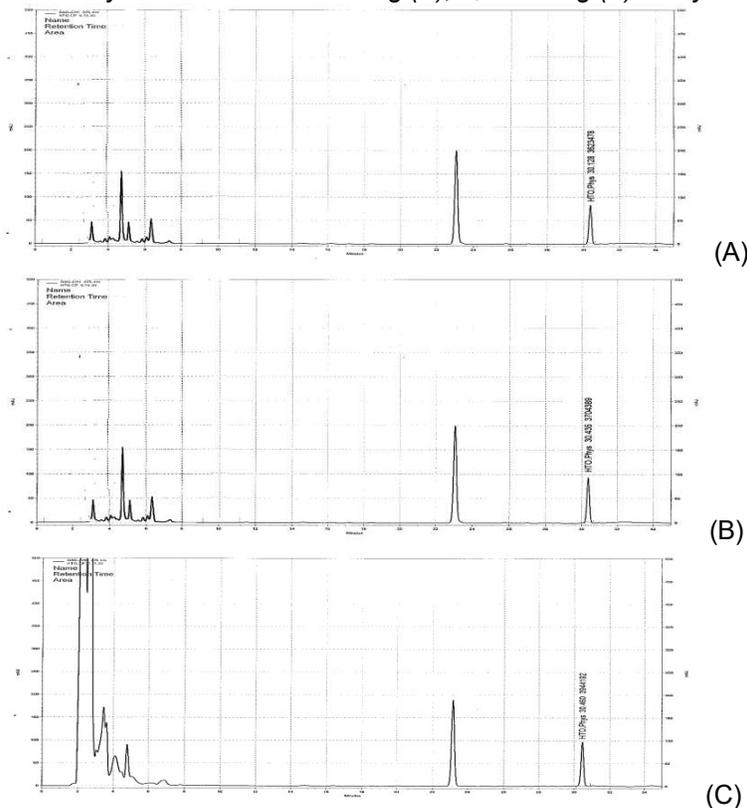
TT	Lượng mẫu thử (g)	Ngày thứ nhất			Ngày thứ hai		
		t_R (phút)	Spic (AU.s)	Hàm lượng (mg/g)	t_R (phút)	Spic (AU.s)	Hàm lượng (mg/g)
1	1,0011	30,460	3944192	0,5770	30,111	3804457	0,5568
2	1,0011	30,534	3923298	0,5740	30,986	3903487	0,5711
3	1,0011	30,119	3902278	0,5709	30,117	3863894	0,5654
4	1,0011	30,597	3904487	0,5713	30,386	3898542	0,5704
5	1,0011	30,620	3954220	0,5784	30,002	3816390	0,5585
6	1,0011	30,447	3912983	0,5725	30,875	3846745	0,5629
TB		30,463	3923576,3	0,5740	30,413	3855585,8	0,5642
RSD (%)		0,60	0,55	0,54	1,39	1,07	1,05

Ứng dụng quy trình đã thẩm định để định lượng thành phần physcion trong rễ hà thủ ô đỏ

Tiến hành áp dụng phân tích 3 mẫu rễ hà thủ ô đỏ thu hái tại huyện Con Cuông, Quế Phong,

Kỳ Sơn, tỉnh Nghệ An thu được sắc ký đồ của mẫu thử HTO có pic có thời gian lưu trùng với thời gian lưu ($t_R = 30,0$ phút) của chất physcion, nhiều nền thấp ở cả mẫu chuẩn và mẫu thử. Kết quả trình bày trong hình 5 và bảng 8.

Hình 5. Sắc ký đồ của mẫu Con Cuông (A), Quế Phong (B) và Kỳ Sơn (C)



Bảng 8. Hàm lượng physcion trong dịch chiết rễ hà thủ ô ở Nghệ An

TT	M _{cân} (g)	Độ ẩm (%)	MeOH (ml)	Spic (mAU*s)	HSPL	Nồng độ (µg/ml)	Hàm lượng (mg/g)
Con Cuông	1,0002	6,46	20	3623478	1	26,8093	0,5616
	1,0005			3597771		26,6217	0,5575
	1,0001			3602312		26,6549	0,5585
$\bar{X} \pm SD, n = 3$							0,5592 ± 0,002
Quế Phong	1,0011	5,34	20	3704389	1	27,3996	0,5667
	1,0007			3721897		27,5274	0,5696
	1,0001			3771923		27,8924	0,5775
$\bar{X} \pm SD, n = 3$							0,5713 ± 0,006
Kỳ Sơn	1,0289	2,98	20	3944192	1	29,1492	0,5723
	1,0278			3813490		28,1956	0,5542
	1,0276			3890081		28,7544	0,5653
$\bar{X} \pm SD, n = 3$							0,5639 ± 0,009

Các mẫu rễ hà thủ ô thu hái tại Tỉnh Nghệ An chứa hàm lượng physcion khoảng từ 0,56 đến 0,57 mg/g tính theo dược liệu khô kiệt. Như vậy có thể dùng các điều kiện sắc ký đã lựa chọn để phân tích định tính, định lượng chất physcion trong dược liệu.

Kết luận

Nghiên cứu đã xây dựng thành công quy trình định tính, định lượng physcion bằng phương pháp **HPLC**. Quy trình đã được thẩm định đạt theo hướng dẫn của EMA. Quy trình phân tích có độ đúng, độ chính xác cao, các điều kiện về trang thiết bị, dung môi hóa chất phù hợp với đa số phòng thí nghiệm. Quy trình được ứng dụng vào thực tế để kiểm tra và đã xác định được hàm lượng chất physcion trong rễ hà thủ ô thu hái tại tỉnh Nghệ An khoảng từ 0,56 đến 0,57 mg/g.

Tài liệu tham khảo

1. Min H. J. (2008), "Twelve cases of toxic hepatitis related to the root of *Polygonum multiflorum* Thunb", *Journal of Hepatology*, 48, pp. S356.
2. Jung K. A. (2011), "Drug-induced liver injury: Twenty five cases of acute hepatitis following ingestion of *Polygonum multiflorum* Thunb", *Gut and Liver*, 5 (4), pp. 493

3. Yu J. (2011), "Hepatotoxicity of major constituents and extractions of radix polygoni multiflori and Radix *Polygoni multiflori* praeparata", *Journal of Ethnopharmacology*, 137 (3), pp. 1291-1299.

4. Panigrahi G. K. (2015), "Activity - guided chemo toxic profiling of *Cassia occidentalis* (CO) seeds: Detection of toxic compounds in body fluids of CO-exposed patients and experimental rats", *Chemical Research in Toxicology*, 28 (6), pp. 1120-1132.

5. Kang L. (2017), "*Polygoni multiflori* Radix derived anthraquinones alter bile acid disposition in sandwich - cultured rat hepatocytes", *Toxicology In Vitro*, 40, pp. 313-323.

6. Wang C. F. (2007), "Emodin induces apoptosis through caspase 3-dependent pathway in HK-2 cells", *Toxicology*, 231 (2-3), pp. 120-128.

7. Ho S. L. (2015), "Inhibition of β -amyloid aggregation by albiflorin, aloemodin and neohesperidin and their neuroprotective effect on primary hippocampal cells against β -amyloid induced toxicity", *Current Alzheimer Research*, 12 (5), pp. 424-433.

8. Wu X. (2012), "Toxicity of raw and processed roots of *Polygonum multiflorum*", *Fitoterapia*, 83, pp. 469-475.