

Nghiên cứu xây dựng quy trình định lượng allylpyrocatechol 3,4-diacetat (4-APCD) trong sản phẩm từ lá trầu (*Piper betle*) bằng phương pháp GC-MS

Phan Nguyễn Trường Thắng, Hà Minh Hiền*
Viện Kiểm nghiệm Thuốc TP. Hồ Chí Minh

Summary

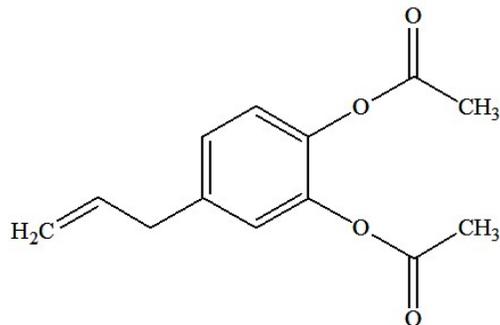
A GC-MS method for determination of allylpyrocatechol 3,4-diacetate (4-APCD) in syrup containing essential oil of *Piper betle* L. leaves was developed: Column – ZB-624 (30 m × 0.32 mm ID, film thickness 0.18 μm); carrier gas: helium for chromatography; flow rate: 1.24 mL/min; split ratio: 15:1; injection port temperature: 250 °C; column temperature: 60 °C (4 min) → 2 °C/min to 80 °C (2 min) → 10 °C/min to 120 °C → 20 °C/min to 240 °C (14 min); injection volume: 1 μL. MS condition: ionisation type: electron impact ionisation (70 eV); interface temperature: 250 °C; ion source temperature: 200 °C; acquisition mode: SCAN and SIM; quantitative ion: target ions: m/z 150 (4-APCD) and m/z 164 (isoeugenol); reference ions: m/z 192 (4-APCD) and m/z 103 (isoeugenol). The 4-APCD standard and the analyzed samples were dissolved in acetone for quantification using internal standard solution of isoeugenol in acetone. The method was validated following the ICH guidelines: The linearity was good at the range of 20.7 – 103.7 μg·mL⁻¹ (r > 0.999); RSD of intra- and inter-day precision variations < 1.0 %; mean recovery was (101.22 ± 0.53)% (RSD = 0.68 %). For quantitative purpose, the method was specific and applicable to quality control of product containing essential oil of betel leaf.

Keywords: *Piper betle*, allylpyrocatechol 3,4-diacetate, GC-MS.

Đặt vấn đề

Từ xa xưa, trầu (*Piper betle*) có vai trò quan trọng trong cuộc sống vật chất và tinh thần của người Việt chúng ta không chỉ vì “Miếng trầu là đầu câu chuyện” mà còn là dưới ánh sáng của khoa học, tác dụng kháng khuẩn, kháng nấm, kháng viêm, kháng oxy hóa, chữa lành vết thương của tinh dầu lá trầu cũng đã được biết. Các tác dụng dược lý trên là do sự hiện diện của các hợp chất phenol, thành phần chính trong tinh dầu lá trầu [1]. Thành phần chính của tinh dầu lá trầu bao gồm: Chavibetol, chavibetol acetat, 4-allylpyrocatechol diacetat (4-APCD) [2]. Một số công trình nghiên cứu phát triển sản phẩm từ tinh dầu chuẩn hóa lá trầu

để khử khuẩn, nấm và đặc biệt bất hoạt virus trong bệnh tay chân miệng ở trẻ em do *Enterovirus 71* của tinh dầu. Bài báo này công bố quy trình phân tích xác định 4-APCD trong sirô chứa tinh dầu chuẩn hóa lá trầu (*Extractum Folium Piper betle*) bằng kỹ thuật **GC-MS**, kỹ thuật đầu tay trong phân tích tinh dầu, cho mục đích kiểm tra chất lượng sản phẩm.



Hình 1. Công thức cấu tạo của allylpyrocatechol 3,4-diacetat

Chịu trách nhiệm: Hà Minh Hiền
Email: haminhkien@yahoo.com
Ngày nhận: 21/4/2021
Ngày phản biện: 26/5/2021
Ngày duyệt bài: 24/9/2021

Nguyên liệu và phương pháp

Mẫu nghiên cứu

Siro thuốc lá trà do công ty GEA-NUS sản xuất.

Chế phẩm: Cho 1 chai 90 ml: Tinh dầu lá trà: 0,27 g; tá dược (chất diện hoạt, đường trắng, natri benzoat, caramen, nước tinh khiết) vừa đủ 90 ml.

Thiết bị, thuốc thử và chất chuẩn

Cân phân tích, dụng cụ thủy tinh

Đã được hiệu chuẩn theo GLP và ISO/IEC 17025: 2005 và các dụng cụ thông thường khác.

Máy sắc ký khí khối phổ GCMS-QP Shimadzu 2010

Bộ chính mẫu tự động AOC-20i, phần mềm xử lý dữ kiện LabSolutions GCMSSolution phiên bản 2.5.

Chất chuẩn

Allylpyrocatechol 3,4-diacetat, số lô: BCBN0625V, hàm lượng: 96,9 % C₁₃H₁₄O₄; nguồn gốc: Sigma-Aldrich.

Isoeugenol, số lô: BCBR8059V, hàm lượng: 98,9 % C₁₀H₁₂O₂; nguồn gốc: Sigma-Aldrich.

Hóa chất: Aceton (dùng trong phương pháp sắc ký).

Phương pháp nghiên cứu

Chuẩn bị dung dịch chuẩn và dung dịch thử

Dung dịch chuẩn gốc: Cân chính xác khoảng 5 mg chuẩn allylpyrocatechol 3,4-diacetat vào mỗi bình định mức 25 ml. Định mức đến thể tích bằng aceton.

Dung dịch nội chuẩn: Cân chính xác khoảng 50 mg chuẩn isoeugenol vào bình định mức 50 ml. Định mức đến thể tích bằng aceton.

Dung dịch chuẩn làm việc: Theo bảng sau:

Nồng độ (µg/ml)	Thể tích dung dịch chuẩn gốc (ml)	Thể tích dung dịch nội chuẩn (ml)	Bình định mức (ml)
20	1	2	10
40	2	2	10
60	3	2	10
80	4	2	10
100	5	2	10

Mẫu thử: Hút chính xác 5 ml mẫu thử cho vào bình lắng gạn, thêm 20 ml aceton, lắc đều trong vòng 10 phút, gạn lấy dịch aceton vào bình định mức 100 ml, tiến hành tương tự thêm 2 lần nữa. Hút chính xác 20 ml dung dịch nội chuẩn thêm vào bình định mức chứa mẫu thử, bổ sung aceton đến thể tích. Lắc đều,

chuyển 10 ml dung dịch trên vào ống ly tâm, tiến hành ly tâm 4000 vòng trong 10 phút, lấy lớp dịch trong, lọc qua màng lọc 0,2 µm.

Điều kiện vận hành GC

Cột sắc ký: ZB-624 (30 m x 0,32 mm ID x độ dày lớp film 0,18 µm).

Khí mang: Heli dùng cho sắc ký với tốc độ dòng 1,24 ml/phút.

Nhiệt độ buồng tiêm: 250 °C, tỷ lệ chia dòng 15:1.

Nhiệt độ cột: Giữ ở 60 °C trong 4 phút, tăng đến 80 °C với tốc độ gia nhiệt 2 °C/phút; giữ ở trong 2 phút; tiếp tục tăng đến 120 °C với tốc độ gia nhiệt 10 °C/phút; tiếp tục tăng đến 240 °C với tốc độ gia nhiệt 20 °C/phút, giữ ở nhiệt này trong 14 phút.

Điều kiện vận hành MS

+ Kiểu ion: Bắn phá điện tử (70 eV).

+ Nhiệt độ giao diện: 250 °C.

+ Nhiệt độ nguồn ion hóa: 200 °C.

+ Kiểu thu dữ liệu: SCAN và SIM.

+ Các ion định lượng:

– Ion đích: *m/z* 150 (Allylpyrocatechol 3,4-diacetat) và *m/z* 164 (Isoeugenol).

– Ion xác nhận: *m/z* 192 (Allylpyrocatechol 3,4-diacetat) và *m/z* 103 (Isoeugenol).

– Thể tích tiêm mẫu: 1 µl.

Tiến hành

Tiêm lần lượt dung dịch thử và các dung dịch chuẩn làm việc vào máy **GC-MS** và ghi sắc ký đồ. Định tính bằng cách so sánh thời gian lưu và các mảnh ion của dung dịch thử và dung dịch đối chiếu ở kiểu thu dữ liệu SCAN.

Vẽ đồ thị tương quan giữa tỷ lệ cường độ mảnh *m/z* 150 của allylpyrocatechol 3,4-diacetat và mảnh *m/z* 164 của isoeugenol có được từ sắc ký đồ của các dung dịch chuẩn làm việc trong kiểu thu dữ liệu SIM.

Dựa vào đường chuẩn trên và tỷ lệ cường độ mảnh *m/z* 150 của allylpyrocatechol 3,4-diacetat và mảnh *m/z* 164 của isoeugenol có được từ sắc ký đồ của dung dịch thử trong kiểu thu dữ liệu SIM, tính nồng độ C (µg/ml) của allylpyrocatechol 3,4-diacetat trong dung dịch thử.

Hàm lượng X (mg /100 ml) của allylpyrocatechol 3,4-diacetat trong sản phẩm được tính theo công thức sau:

$$X (mg/100 ml) = C \times 2.$$

Thẩm định phương pháp phân tích

Thẩm định phương pháp phân tích với các chỉ tiêu: Tính đặc hiệu, tính tuyến tính, độ chính

xác, độ đúng theo hướng dẫn của ICH [3].

Kết quả và bàn luận

Khảo sát tính phù hợp của hệ thống sắc ký

Tiến hành sắc ký 6 lần dung dịch chuẩn làm việc 60 µg/ml, ghi lại sắc ký đồ. Thông số về sắc ký như hệ số đối xứng (A), số đĩa lý thuyết (N),

độ phân giải (Rs) và thông số về độ chụm của kết quả định tính, định lượng thể hiện ở % RSD đối với: Tỷ lệ thời gian lưu và diện tích giữa pic 4-APCD và isoeugenol trên 6 lần tiêm được trình bày trong bảng 1.

Bảng 1. Thử tính phù hợp của hệ thống sắc ký (n = 6)

STT	Thời gian lưu pic 4-APCD (phút)	Thời gian lưu pic isoeugenol (phút)	Tỷ lệ thời gian lưu giữa pic 4-APCD và isoeugenol
1	30,871	28,175	1,0957
2	30,872	28,174	1,0958
3	30,871	28,174	1,0957
4	30,867	28,172	1,0957
5	30,872	28,174	1,0958
6	30,871	28,174	1,0957
Trung bình			1,0957
RSD (%)			0,01 (< 1,0 %)

STT	Diện tích pic 4-APCD	Diện tích pic isoeugenol	Tỷ lệ diện tích giữa pic 4-APCD và isoeugenol
1	43296	86530	0,5004
2	43696	88566	0,4934
3	44072	89894	0,4903
4	43548	88504	0,4920
5	43458	88508	0,4910
6	43311	88120	0,4915
Trung bình			0,4931
RSD (%)			0,75 (< 2,0 %)

STT	Số đĩa lý thuyết		Hệ số đối xứng		Độ phân giải giữa pic 4-APCD và isoeugenol
	4-APCD	Isoeugenol	4-APCD	Isoeugenol	
1	1345850	2459712	1,037	1,062	30,326
2	1433823	2408010	1,006	1,083	30,788
3	1449625	2323927	1,023	1,068	30,646
4	1347688	2376202	1,043	1,092	30,114
5	1411292	2409935	1,011	1,067	30,652
6	1439290	2428932	1,019	1,080	30,862
Trung bình			0,9 < 1,0 < 2,0	0,9 < 1,1 < 2,0	30,6 (> 1,5)

Tính đặc hiệu

Tiêm vào hệ thống GC-MS dung dịch chuẩn, dung dịch thử, dung môi. Trên sắc ký đồ dung dịch thử, thời gian lưu của pic 4-APCD tương ứng với thời gian lưu của pic chính trên sắc ký đồ dung dịch thử. Dung dịch mẫu placebo không xuất hiện pic tại vị trí pic 4-APCD trong sắc ký đồ dung dịch chuẩn. Phổ khối lượng của 4-APCD (Scan mode) trong mẫu thử cho thấy mảnh ion phân tử tại m/z 234, mảnh ion tại m/z 192, mảnh ion cơ bản tại m/z 150 tương tự

phổ khối lượng của dung dịch 4-APCD chuẩn.

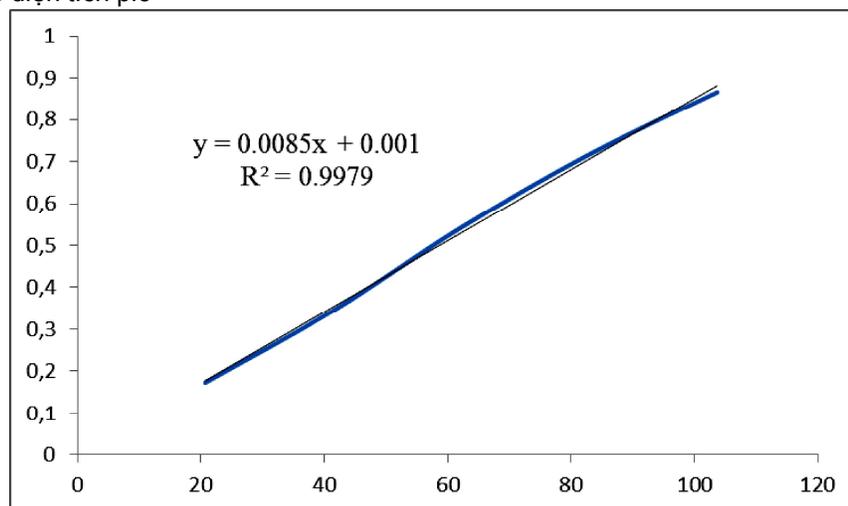
Tính tuyến tính

Tiến hành trên 5 mức nồng độ. Xây dựng đồ thị tương quan giữa nồng độ các dung dịch chuẩn allylpyrocatechol 3,4-diacetat và tỷ lệ diện tích giữa pic của allylpyrocatechol 3,4-diacetat và pic isoeugenol thu được trên các sắc ký đồ (đường chuẩn) bằng phương pháp bình phương tối thiểu (hình 2). Hệ số tương quan r, phương trình Y = ax + b và hệ số chặn được ghi trong bảng 2.

Bảng 2. Kết quả khảo sát tính tuyến tính

Nồng độ ($\mu\text{g/ml}$)	20,7	41,5	62,2	82,9	103,7
Tỷ lệ diện tích pic trung bình	0,1725	0,3449	0,5425	0,7165	0,8661
Phương trình hồi quy	$0,00848x + 0,001044$				
Hệ số tương quan	0,9989 ($> 0,998$)				
Hệ số chặn	0,19 % ($< 2,0$ %)				

Tỷ lệ diện tích pic



Nồng độ ($\mu\text{g/ml}$)

Hình 2. Đồ thị tương quan giữa nồng độ các dung dịch allylpyrocatechol 3,4-diacetat chuẩn và tỷ lệ diện tích giữa pic của allylpyrocatechol 3,4-diacetat và pic isoeugenol

Độ chính xác

Đánh giá dựa vào độ lặp lại trong ngày, kiểm nghiệm viên (KNV) 1 chuẩn bị mẫu để định lượng 6 lần theo quy trình phân tích. KNV 2 tiến hành tương tự nhưng khác ngày. Độ chính xác trung gian của phương pháp là RSD% kết quả định lượng của 2 KNV.

Bảng 3. Kết quả khảo sát độ lặp lại của phương pháp định lượng allylpyrocatechol 3,4-diacetat

STT	Thể tích mẫu thử (ml)	Tỷ lệ diện tích pic	Hàm lượng (mg/100 ml)
1	5	0,5249	122,54
2	5	0,5251	122,60
3	5	0,5308	123,93
4	5	0,5284	123,37
5	5	0,5322	124,25
6	5	0,5312	124,02
Trung bình			123,45
RSD% (n = 6)			0,60 (2,0 %)

Bảng 4. Kết quả khảo sát độ lặp lại và độ chính xác trung gian của phương pháp định lượng allylpyrocatechol 3,4-diacetat

KNV 1 Ngày 1 (n = 6)	Hàm lượng (mg/100 ml)		
	Kết quả kiểm nghiệm	Trung bình	RSD% (n = 12)
	123,45 \pm 0,78		
KNV 2 Ngày 2 (n = 6)	123,52 \pm 0,40	123,49 \pm 0,36	0,46 ($< 2,0$ %)

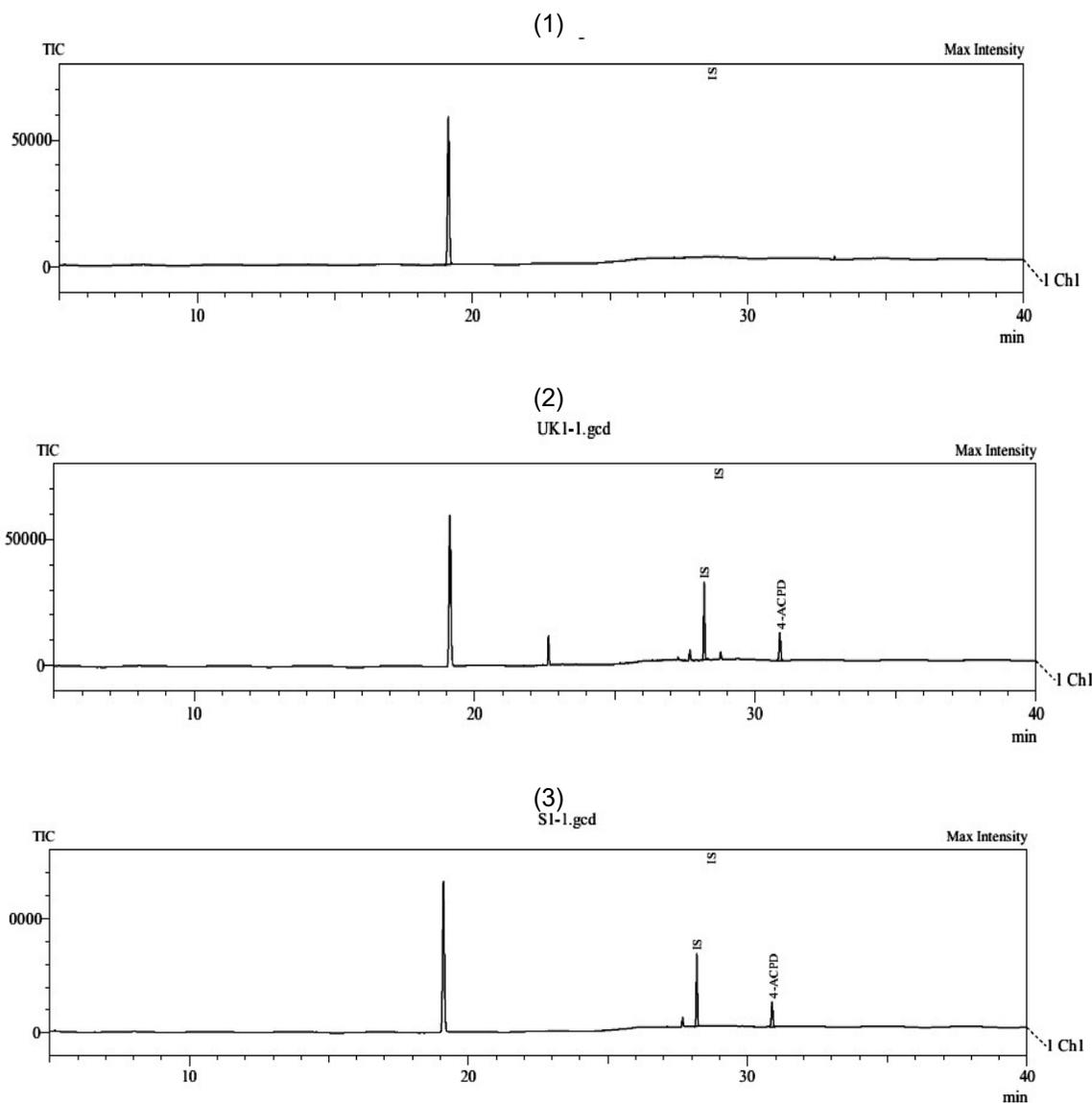
Độ đúng

Cân một lượng chuẩn allylpyrocatechol 3,4-diacetat cho vào mẫu thử để khi chuẩn bị mẫu theo quy trình phân tích thì thu được các dung dịch có nồng độ nằm trong khoảng 80 %, 100 % và 140 % so với nồng độ định lượng. Ở mỗi mức nồng độ thực hiện 3 lần. Tính lượng allylpyrocatechol 3,4-diacetat tìm thấy dựa vào phương trình hồi quy xác định ở mục tính tuyến tính. Tính tỷ lệ phục hồi là phần trăm lượng tìm thấy trên lượng chuẩn thêm.

Bảng 5. Kết quả khảo sát độ đúng

Mức nồng độ	Tỷ lệ phục hồi (%)	RSD (n = 3) (%)
80 %	101,73	0,20
100 %	100,02	0,14
140 %	100,00	0,13
Trung bình (n = 9)	101,22 ± 0,53	0,68

Tỷ lệ phục hồi ở các mức nồng độ đều nằm trong khoảng 98 % - 102 % với RSD% không quá 1,0 % (< 2,0 %). Kết quả thẩm định các thông số cho thấy đạt tiêu chuẩn chấp nhận theo ICH [3].



Hình 3. Sắc ký đồ của dung dịch mẫu placebo (1), thử (2) và chuẩn (3) chuẩn bị theo phương pháp đề xuất

Kết luận

Phương pháp đề nghị để định lượng allylpyrocatechol 3,4-diacetat trong sirô chứa tinh dầu *Piper betle* bằng sắc ký khí ghép khối phổ được thẩm định theo hướng dẫn của ICH cho thấy đơn giản, đặc hiệu, và đạt độ đúng, chính xác và tin cậy phù hợp với phòng thí nghiệm được trang bị máy **GC-MS** với cấu hình cơ bản. Phương pháp này có thể ứng dụng vừa định tính, vừa định lượng allylpyrocatechol 3,4-diacetat trong chế phẩm từ lá trà cho mục đích kiểm tra chất lượng.

Tài liệu tham khảo

1. Rekha V. P. B., Kollipara M., Srinivasa Gupta B. R. S. S., Bharath Y., Pulicherla K. K. (2014), "A review on *Piper betle* L.: Nature's promising medicinal reservoir", *American Journal of Ethnomedicine*, 1 (5), pp. 276-289.
2. Huynh Ky Tran, Tran Nguyen Ngoc Chau, Nguyen Khoa Nam, Pham Thi Anh, Nguyen Xich Lien, Chu Pham Ngoc Son (2011), "Investigation on the composition of Vietnam: *Piper betle* L. leaf essential oil", *The 2nd Analytica Vietnam Conference 2011, Conference Proceeding*, pp. 193-197.
3. International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use (2005), *Validation of analytical procedure: Text and methodology*, pp. 1-13.