

XÂY DỰNG QUY TRÌNH ĐỊNH LƯỢNG 2,3,5,4'-TETRAHYDROXYSTILBEN-2-O- β -D-GLUCOSID TRONG CAO HÀ THỦ Ô ĐỎ BẰNG PHƯƠNG PHÁP HPLC-UV

DEVELOPMENT OF A HPLC-UV METHOD FOR 2,3,5,4'-TETRAHYDROXYSTILBENE-2-O- β -D-GLUCOSIDE QUANTIFICATION IN THE EXTRACT OF *RADIX FALLOPIAE MULTIFLORAE*

Huỳnh Trần Quốc Dũng¹, Phạm Ngọc Thạc¹, Huỳnh Lôi², Nguyễn Thị Thanh Thủy², Văn Phạm Kim Thương^{2*}

¹Bệnh viện y học cổ truyền Thành phố Hồ Chí Minh

²Khoa Y Dược – Đại học Đà Nẵng

*Tác giả liên hệ: vpkthuong@smp.udn.vn

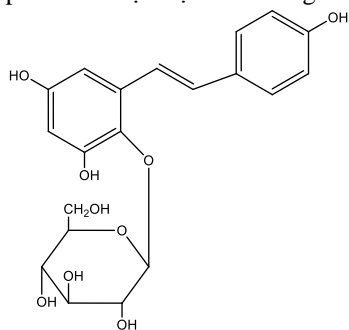
(Nhận bài: 21/01/2022; Chấp nhận đăng: 17/02/2022)

Tóm tắt - Hà thủ ô đỏ (HT) được biết đến từ xưa với tác dụng dưỡng huyết, bổ can thận, nhuận tràng, xanh râu tóc. Định lượng 2,3,5,4'-tetrahydroxystilbene-2-O- β -D-glucoside (THSG) đóng vai trò quan trọng trong kiểm soát chất lượng của cao HT. Nghiên cứu xây dựng quy trình định lượng THSG trong cao HT bằng HPLC-UV, được thực hiện theo hướng dẫn của ICH. Kết quả cho thấy, methanol 50% được dùng làm dung môi chiết xuất THSG, tỉ lệ cao HT-methanol 50% (300:25) (mg/ml). Điều kiện sắc ký dùng cột C18 (250×4,6 mm; 5 μ m), bước sóng phát hiện 320 nm, nhiệt độ cột 30°C, tốc độ dòng 1 ml/phút, thể tích tiêm là 10 μ l. Pha động acetonitril - nước (20:80). Mối tương quan hồi quy cao giữa diện tích đỉnh và nồng độ THSG ($r^2 = 0,9996$). Độ chính xác trung gian RSD = 0,79%, độ hồi phục 95-105%, hàm lượng THSG trong cao HT là 0,53%.

Từ khóa - Hà thủ ô đỏ; 2,3,5,4'-tetrahydroxystilbene-2-O- β -D-glucoside (THSG)

1. Đặt vấn đề

Hà thủ ô đỏ (HT) là một trong những dược liệu phổ biến ở các nước nhiệt đới với công dụng chính bổ gan, thận, bổ máu, điều hòa khí huyết, mạnh gân xương [1]. THSG (Hình 1) là một hoạt chất của HT được ghi nhận có tác dụng hỗ trợ điều trị xơ vữa động mạch, rối loạn chuyển hóa lipid, tái tạo mạch máu, thiếu máu cơ tim cục bộ, rối loạn trí nhớ, viêm thần kinh, bệnh Alzheimer, Parkinson, biến chứng tiểu đường, các vấn đề về mọc tóc và nhiều bệnh lý khác [2], [3], [4]. THSG cũng là chất đánh dấu cho dược liệu Hà thủ ô theo Dược điển Trung quốc 2010 [5]. Cao chiết là một trong những bán thành phẩm quan trọng trong việc sản xuất các sản phẩm từ dược liệu nói chung và Hà thủ ô nói



Hình 1. Cấu trúc hóa học của THSG

Abstract - *Radix Fallopieae multiflorae* (HT) is a traditional medicine in Blood nourishment, Liver and Kidneys nourishment, laxative, hair recovery. Quantification of 2,3,5,4'-tetrahydroxystilbene-2-O- β -D-glucoside (THSG), plays an important role in quality control of *Radix Fallopieae multiflorae* extract. This study developed a method for THSG quantification in extract of HT by HPLC-UV. This study used methanol 50% as a solvent for extraction and the ratio of HT extract-methanol 50% (300:25) (mg/ml). The HPLC condition: C18 column (250×4.6 mm; 5 μ m), a detection wavelength of 320 nm, a column temperature of 30°C, a flow rate of 1 ml/min, and an injection volume of 10 μ l, mobile phase mixture of CH₃CN-H₂O (20:80). There was good correlation between peak areas and THSG concentrations ($r^2 = 0.9996$). The RSD values of inter-day precision were found at 0.79%. The recovery percentages were of 95 – 105% and THSG content in the HT extract was 0.53%.

Key words - *Radix Fallopieae multiflorae*; 2,3,5,4'-tetrahydroxystilbene-2-O- β -D-glucoside (THSG)

riêng. Với mục tiêu xây dựng tiêu chuẩn cơ sở và góp phần kiểm soát quá trình sản xuất cao chiết từ HT, việc định lượng THSG trong cao chiết HT cần được nghiên cứu. Vì vậy, nghiên cứu được thực hiện với mục tiêu là xây dựng và thẩm định quy trình định lượng THSG trong cao chiết từ HT bằng phương pháp HPLC-UV.

2. Phương pháp nghiên cứu

2.1. Đối tượng và nguyên liệu

Cao chiết HT (số lô NC0721): Dược liệu HT được chế biến theo quy trình đặc thù, chiết xuất với nước (3 lần) ở 100 \pm 5°C, cô lại thành cao (độ ẩm 30,11%).

Chuẩn THSG làm việc (hàm lượng 99,5%) được phân lập và tinh chế bởi nhóm nghiên cứu. Methanol đạt tiêu chuẩn phân tích (Merck, Đức). Acetonitril (Scharlau, Tây Ban Nha) và nước cất 2 lần đạt tiêu chuẩn dùng cho HPLC.

2.2. Khảo sát quy trình xử lý mẫu

2.2.1. Chọn loại dung môi chiết xuất THSG chuẩn bị mẫu thử

Dung dịch đối chiếu: Dung dịch THSG nồng độ 30 μ g/ml trong methanol.

Dung dịch thử: Cân chính xác khoảng 300 mg cao HT, cho vào bình định mức 25 ml. Thêm 23 ml methanol 50%, siêu âm 30 phút, để nguội đến nhiệt độ phòng, bổ sung

¹ Traditional medicine hospital at Ho Chi Minh city (Huynh Tran Quoc Dung, Pham Ngoc Thac)

² The University of Danang - School of Medicine & Pharmacy (Huynh Loi, Nguyen Thi Thanh Thuy, Van Pham Kim Thuong)

methanol đến vạch, lắc đều, lọc. Tiến hành tương tự với các dung môi methanol 100%, ethanol 96% và nước.

So sánh kết quả chiết xuất bằng phương pháp sắc ký lớp mỏng (SKLM) với hệ dung môi triển khai dicloromethan – ethanol – acid acetic (12:3:0,4) và phát hiện bằng thuốc thử H₂SO₄ 10% trong ethanol (sấy ở 105°C). Dựa vào kết quả SKLM lựa chọn dung môi chiết được THSG và ít tạp nhất.

2.2.2. Khảo sát chọn tỷ lệ cao HT : dung môi chuẩn bị mẫu thử

Dùng dung môi chiết xuất được chọn ở trên để khảo sát chọn tỷ lệ cao HT : dung môi chuẩn bị mẫu thử. Tiến hành thực nghiệm với 3 tỷ lệ cao HT: dung môi sau:

Tỷ lệ 1: Cân chính xác 300 mg cao HT và chiết với 10 ml dung môi được chọn.

Tỷ lệ 2: Cân chính xác 300 mg cao HT và chiết với 25 ml dung môi được chọn.

Tỷ lệ 3: Cân chính xác 300 mg cao HT và chiết với 50 ml dung môi được chọn.

Chiết xuất bằng phương pháp siêu âm trong 30 phút, chuẩn bị 3 mẫu thử riêng biệt cho mỗi tỉ lệ. Kiểm tra hiệu suất chiết THSG của 3 tỉ lệ khảo sát bằng phương pháp HPLC theo điều kiện sắc ký được chọn. Chọn tỉ lệ có thể tích dung môi chiết thấp và chiết được tối đa chất đánh dấu THSG.

2.3. Điều kiện HPLC định lượng THSG trong cao HT

Mẫu chuẩn: Cân chính xác khoảng 1 mg THSG chuẩn vào bình định mức 10 ml, thêm 7 ml methanol, siêu âm 15 phút, để nguội, bổ sung methanol đến vạch, lắc đều, lọc qua màng lọc 0,45 µm.

Mẫu thử: Cân chính xác khoảng 300 mg cao HT cho vào bình định mức 25 ml. Thêm 23 ml methanol 50%, siêu âm 30 phút, để nguội đến nhiệt độ phòng, bổ sung methanol đến vạch, lắc đều, lọc qua màng lọc 0,45 µm.

Điều kiện HPLC: Máy HPLC Shimadzu LC-2030C 3D Plus, detector UV (Nhật), cột C₁₈ Shim-pack GIST (250×4,6 mm; 5 µm), bước sóng phát hiện 320 nm, nhiệt độ cột 30°C, tốc độ dòng 1 ml/phút, thể tích tiêm mẫu 10 µl. Pha động gồm acetonitril và nước với tỷ lệ 20:80.

Hàm lượng THSG (%) trong cao HT được tính theo công thức:

$$X(\%) = \frac{S_t \times C \times 25}{S_c \times m_t} \times a \times 100$$

S_t, S_c : Diện tích đỉnh THSG của mẫu thử và mẫu chuẩn;

C : Nồng độ dung dịch THSG chuẩn (mg/ml);

m_t : Khối lượng cân của mẫu thử (đã trừ độ ẩm) (mg);

a : Hàm lượng của THSG chuẩn.

2.4. Thẩm định quy trình định lượng THSG trong cao HT

Thẩm định quy trình định lượng THSG trong cao HT theo hướng dẫn của ICH về tính tương thích hệ thống, tính đặc hiệu, tính tuyến tính, độ chính xác và độ đúng [6].

3. Kết quả nghiên cứu và khảo sát

3.1. Khảo sát quy trình xử lý mẫu

3.1.1. Chọn loại dung môi chiết xuất THSG chuẩn bị mẫu thử

Kết quả SKLM khảo sát thành phần dịch chiết cao HT

bằng 4 dung môi khác nhau (nước, methanol 50%, methanol 100%, ethanol tuyệt đối) được trình bày trong Hình 2.

Kết quả SKLM cho thấy, ethanol tuyệt đối không ưu tiên để chiết THSG, methanol 50, 100% và nước đều chiết được THSG. Trong đó, theo cảm quan, methanol 50% chiết được nhiều THSG và kéo theo ít tạp chất hơn. Vì vậy, nhóm nghiên cứu chọn methanol 50% được chọn làm dung môi chiết chất chỉ điểm THSG từ cao HT.



TH: Dung dịch THSG đối chiếu

N : Dịch chiết nước

Et : Dịch chiết ethanol tuyệt đối

50 : Dịch chiết methanol 50%

100: Dịch chiết methanol 100%

Hình 2. SKLM phân tích các dịch chiết cao HT bằng các dung môi chuẩn bị mẫu khác nhau

3.1.2. Khảo sát chọn tỷ lệ cao HT : dung môi chuẩn bị mẫu thử

Bảng 1. Hàm lượng THSG chiết được với 3 tỷ lệ cao HT: methanol 50% khảo sát

Tỷ lệ cao HT: methanol 50% (mg/ml)	Hàm lượng THSG trong cao (% , kl/kl)
300:10	0,425 ±0,002
300:25	0,526 ±0,005
300:50	0,526 ±0,003

Bảng 1 cho thấy, hàm lượng THSG chiết được với tỷ lệ 300:10 thấp hơn nhiều so với 2 tỉ lệ còn lại. Đồng thời 2 tỷ lệ cao HT : methanol (300:25 và 300:50) khảo sát khác nhau không có ý nghĩa thống kê (p > 0,05). Do vậy, dung môi methanol và tỷ lệ cao HT : methanol (300:25) được chọn làm điều kiện chiết xuất THSG trong phương pháp chuẩn bị mẫu thử.

3.2. Thẩm định quy trình định lượng THSG

3.2.1. Tính tương thích hệ thống

Kết quả khảo sát tính tương thích hệ thống được trình bày trong Bảng 2. Các thông số thời gian lưu, diện tích đỉnh có RSD% ≤ 2%. Hệ số bất đối, độ phân giải, số đĩa lý thuyết đạt yêu cầu phân tích. Vậy, phương pháp HPLC định lượng THSG trong cao HT đạt tính tương thích hệ thống.

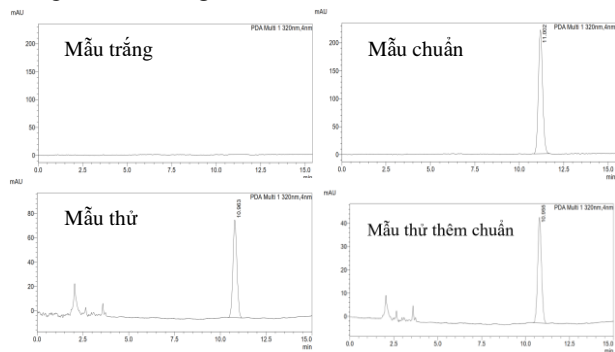
Bảng 2. Tính tương thích hệ thống của phương pháp định lượng THSG trong mẫu thử

STT	t _R (phút)	S (mAU.s)	Hệ số kéo đuôi	N
1	10,581	1232055	1,103	12502
2	10,893	1223478	1,003	12367
3	10,992	1236141	1,017	12255
4	11,012	1224792	0,987	12083
5	11,134	1230681	1,023	12479
6	11,039	1236475	0,986	11794
TB	10,94	1230603,67	1,020	12247
% RSD	1,76	0,45	0,8 ≤ A _s ≤ 1,2	

3.2.2. Tính đặc hiệu

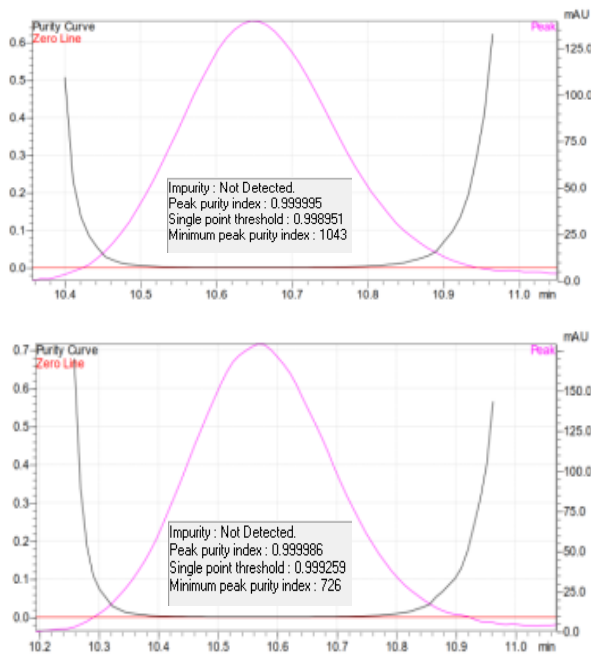
Mẫu trắng: Dung dịch methanol 50%; Mẫu thử: Cân chính xác khoảng 300 mg cao HT, cho vào bình định mức 25 ml. Thêm 23 ml methanol 50%, siêu âm 30 phút, để nguội đến nhiệt độ phòng, bổ sung methanol đến vạch, lắc đều, lọc qua màng lọc 0,22 µm; Mẫu chuẩn: Dung dịch THSG nồng độ khoảng 0,1 mg/ml; Mẫu thử thêm chuẩn: Cân chính xác khoảng 300 mg cao HT, cho vào bình định mức 25 ml. Thêm 0,1 mg THSG và 23 ml methanol 50%, siêu âm 30 phút, để nguội đến nhiệt độ phòng, bổ sung methanol đến vạch, lắc đều, lọc qua màng lọc 0,22 µm.

Hình 3 cho thấy, sắc ký đồ của mẫu trắng không có đỉnh xuất hiện trong khoảng thời gian lưu tương ứng với thời gian lưu của đỉnh THSG trong mẫu chuẩn (khoảng 10,9 phút). Sắc ký đồ của mẫu thử cho thấy có thời gian lưu tương ứng với đỉnh THSG trong mẫu chuẩn. Khi thêm chuẩn vào mẫu thử, chiều cao và diện tích đỉnh THSG trong mẫu thử tăng.



Hình 3. Sắc ký đồ HPLC khảo sát tính đặc hiệu quy trình định lượng THSG trong cao HT (tr của THSG là 10,9 phút)

Độ tinh khiết đỉnh THSG trong mẫu chuẩn và mẫu thử đạt yêu cầu (Hình 4).

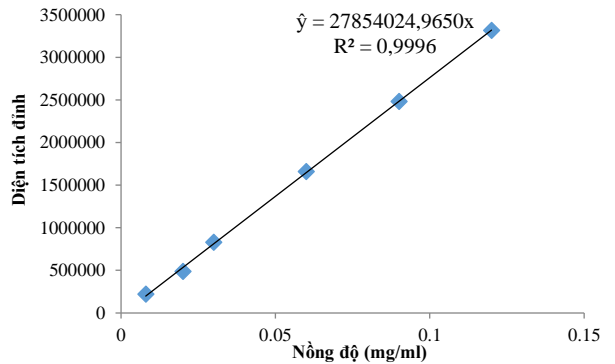


Hình 4. Độ tinh khiết đỉnh (peak purity) THSG trong mẫu chuẩn và mẫu thử

3.2.3. Tính tuyến tính

Bảng 3. Tính tuyến tính của quy trình định lượng THSG

Nồng độ (mg/ml)	Diện tích đỉnh
0,008	220172
0,02	486475
0,03	830221
0,06	1657543
0,09	2482176
0,12	3315549



Hình 5. Tương quan giữa nồng độ và diện tích đỉnh THSG

3.2.4. Độ lặp lại và độ chính xác trung gian

Kết quả khảo sát độ lặp lại và độ chính xác trung gian của quy trình định lượng THSG trong cao HT được trình bày trong Bảng 4.

Bảng 4. Độ lặp lại và độ chính xác trung gian của phương pháp định lượng

STT	Ngày 1		Ngày 2	
	Diện tích đỉnh	Hàm lượng THSG trong cao HT (%)	Diện tích đỉnh	Hàm lượng THSG trong cao HT (%)
1	1232121	0,5231	1237569	0,5254
2	1254465	0,5287	1255713	0,5292
3	1240982	0,5249	1241334	0,5251
4	1218537	0,5213	1219568	0,5217
5	1245690	0,5320	1246721	0,5324
6	1235546	0,5310	1238565	0,5323
TB		0,5268		0,5277
RSD (%)		0,8339		0,8229
Giá trị thống kê 2 ngày		TB = 0,5273%		RSD = 0,79%

Hàm lượng trung bình của THSG trong cao HT là 0,527% và RSD nhỏ hơn 2%. Như vậy, qui trình định lượng THSG trong cao HT đạt yêu cầu về độ lặp lại.

3.2.5. Độ đúng

Độ đúng được tiến hành bằng cách thêm chất chuẩn THSG vào mẫu thử ở 3 mức 80%, 100% và 120% so với nồng độ THSG định lượng (hàm lượng THSG trong cao HT là 0,527% được dựa vào kết quả trung bình độ lặp lại, Bảng 5). Mỗi mẫu được lặp lại 3 lần. Kết quả khảo sát độ đúng được trình bày trong Bảng 5.

Bảng 5. Kết quả khảo sát độ đúng

Mức nồng độ thêm vào	Tỉ lệ hồi phục (%)	Giá trị trung bình
80%	96,92	TB = 96,95% RSD = 1,14%
	95,86	
	98,06	
100%	99,87	TB = 99,15% RSD = 2,99%
	95,88	
	101,68	
120%	100,82	TB = 100,15% RSD = 4,40%
	95,45	
	104,19	

Theo yêu cầu về độ hồi phục và RSD% tương ứng với nồng độ chất phân tích, tỉ lệ phục hồi cho phép phương pháp định lượng THSG trong khoảng 95 - 105%. Vậy, quy trình định lượng đạt yêu cầu về độ đúng.

4. Bàn luận và kết luận

Hoạt chất THSG đã được nghiên cứu có tác dụng hỗ trợ điều trị rụng tóc, làm đen tóc [7], và đã được sử dụng trong tiêu chí định lượng trong dược liệu HT của Dược điển Trung Quốc [5].

Quy trình định lượng THSG trong cao HT được xây dựng và thẩm định. Kết quả thẩm định đạt các yêu cầu về tính tương thích hệ thống, tính tuyến tính, độ đặc hiệu. Độ chính xác trung gian là 0,79% và độ đúng đạt yêu cầu với độ phục hồi trong khoảng 95-105%.

Quy trình có thể ứng dụng trong kiểm nghiệm và sản xuất các sản phẩm liên quan đến Hà thủ ô.

Lời cảm ơn: Nghiên cứu này được tài trợ bởi Đại học Đà Nẵng trong đề tài có mã số: T2021 - ĐHDN - 03, tên đề tài: "Bào chế viên nang Hà thủ ô đỏ - Đậu đen và xây dựng bộ tiêu chuẩn thành phẩm dựa trên hàm lượng stilbenosid".

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Viện Dược liệu, *Cây thuốc và động vật làm thuốc ở Việt Nam*, Tập 1, Nhà xuất bản Khoa học Kỹ thuật, Hà Nội, 2014.
- [2] Shuang Ling and Jin-Wen Xu, "Biological Activities of 2,3,5,4' - Tetrahydroxystilbene-2-O-β-D-Glucoside in Antiaging and Antiaging-Related Disease Treatments", *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2016:4973239, 2016, 14 pages.
- [3] Farahani MS, Bahramsoltani R, Farzaei MH, Abdollahi M, Rahimi R, "Plant-derived natural medicines for the management of depression: an overview of mechanisms of action", *Rev Neurosci*, 26(3), 2015, pp.305-21.
- [4] Liu SH, Ma LJ, "Effects of Chinese Herbal Extracts on Tyrosinase Activity and Melanogenesis", *Natural Products Chemistry & Research*, 3(4), 2015, 5 pages.
- [5] The State Pharmacopoeia Commission of P.R. China, *Pharmacopoeia of The People's Republic of China*, Volume I, China Medical Science Press, Beijing, 2010.
- [6] Ludwig Huber, *Validation and qualification in analytical laboratories*, New York: Informa Healthcare, 2007.
- [7] Liu SH, Ma LJ, "Effects of Chinese Herbal Extracts on Tyrosinase Activity and Melanogenesis", *Natural Products Chemistry & Research*, 2015, 3: 183.