Sơ bộ xác định hàm lượng các chất có trong cỏ seo gà

Áp dụng phương pháp HPLC đã xây dựng được để xác định hàm lượng một số hợp chất trong mẫu dược liệu cỏ seo gà thu hái tại Ba Vì, Hà Nội (bảng 6).

Bảng 6: *Kết quả xác định hàm lượng các chất nghiên cứu trong cỏ seo gà*

STT	Hàm lượng (mg/100 g dược liệu)				
	PM3	*PM12*	*PM18*	*PM15*	*PM9*
1	7,42	4,50	19,30	7,56	9,06
2	7,29	4,39	18,33	7,83	8,90
3	7,52	4,39	18,87	7,62	8,96
4	7,37	4,41	18,89	7,50	8,92
5	7,35	4,46	18,88	7,47	8,99
6	7,26	4,44	18,94	7,63	9,02
Trung bình	***7,37***	***4,43***	***18,87***	***7,60***	***8,98***

Kết luận

Phương pháp HPLC xây dựng được cho phép có thể xác định đồng thời hàm lượng của 5 hợp chất có trong cỏ seo gà và sơ bộ xác định được hàm lượng của chúng trong 100 g dược liệu khô là: maltol-3-O-β-D-glucopyranosid (PM3): 7,4 mg, kaempferitrin (PM9): 9,0 mg; 3,4-dihydroxybenzandehyd (PM12): 4,4 mg; kaempferol–3–O–α–L- rhamnopyranosid–7–O–β–D–glucopyranosid (PM15): 7,6 mg và kaempferol –3– O–α–L–rhamnopyranosid – 7 – O - [α – D - apiofuranosyl-(1-2)-β-D-glucopyranosid] (PM18): 18,9 mg.

Tài liệu tham khảo

1. Đỗ Huy Bích và cộng sự (2004), *Cây thuốc và động vật làm thuốc ở Việt Nam, tập 2*, NXB Khoa học và kỹ thuật, 729 – 730.

2. Jiangsu New Medical College (1985), *Dictionary of Traditional Chinese Drug, Vol. 1*, Shanghai Science and Technology Press, Shanghai, 487.

3. Lee H., Lin J. Y. (1988), "Antimutagenic activity of extracts from anticancer drugs in Chinense medicine", *Mutat. Res.*, 204, 229 – 234.

(Ngày nhận bài: 05/06/2014 - Ngày duyệt đăng: 10/07/2014)

Phân tích cấu trúc và xây dựng tiêu chuẩn cơ sở cho phospholipid chiết xuất được làm nguyên liệu tạo dạng thuốc tiêm liposom

Nguyễn Thị Lập[1]*, Lê Đăng Quang[2]

[1] *Trường Đại học Dược Hà Nội*

[2] *Viện Hóa học Công nghiệp Việt Nam*

* *E-mail: lvklap@yahoo.com*

Summary

Natural phospholipids were extracted, purified from fowl eggs and hydrogenated with activated Nickel Raney. Their chemical structures were determined by LC-MS, GC-MS. The principal phospholipid ingredient was palmitoyl oleoyl phosphatidylcholin. Home specifications of the obtained phospholipids were introduced based on USP34-NF 29. Analytical results showed the obtained products fit for use as materials of injectable liposome formulations.

Keywords: *Phospholipid, supercritical carbondioxide extraction, liposome.*

Đặt vấn đề

Hiện nay liposom kích cỡ nano được coi là một trong những hệ vận chuyển dược chất chống ung thư đến đích đầy triển vọng. Tuy nhiên, tại Việt Nam chưa có nhiều nghiên cứu và ứng dụng nhằm tạo ra các dạng thuốc liposom trong điều trị. Một trong những lý do là nguyên liệu phospholipid

(PL) đạt tiêu chuẩn chế tạo liposom nhập ngoại rất cao. Mặt khác, hiện nay trong Dược điển Việt Nam cũng chưa có chuyên luận đánh giá phân tích và tiêu chuẩn hóa nguyên liệu PL nói chung và nguyên liệu PL dùng để tạo dạng thuốc tiêm liposom nói riêng. Kết quả nghiên cứu trước đã áp dụng phương pháp sử dụng CO_2 ở trạng thái siêu tới hạn để tách chiết phospholipid từ nguồn nguyên liệu phổ biến nhất là lòng đỏ trứng cho thấy phospholipid thu được có độ tinh khiết cao[1]. Sản phẩm phospholipid tách chiết được cần phải bền vững, đạt tiêu chuẩn làm nguyên liệu sản xuất dược phẩm, đặc biệt là sản xuất liposom dạng thuốc tiêm. Do đó, mục đích của nghiên cứu này là phân tích cấu trúc, hydrogen hóa và xây dựng tiêu chuẩn cơ sở nguyên liệu PL tách chiết được.

Nguyên vật liệu và phương pháp nghiên cứu

Nguyên vật liệu

Phospholipid lòng đỏ trứng đã được tách chiết và tinh chế[1]. PC-98N, phospholipid lòng đỏ trứng do công ty Kewpie (Nhật Bản) sản xuất. Xúc tác Nickel-Raney sử dụng của Công ty Yakuri Pure Chemicals, Nhật Bản. Các hóa chất khác đạt tiêu chuẩn dùng cho phân tích.

Nơi nghiên cứu

- Phương pháp hydro hóa PL được tiến hành tại Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

- Xác định và phân tích cấu trúc của PL lòng đỏ trứng được tiến hành tại phòng thí nghiệm các hợp chất sinh học, Viện Krict, Hàn Quốc.

- Các phương pháp xây dựng và đánh giá tiêu chuẩn cơ sở của PL được tiến hành tại Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương và Bộ môn Hóa sinh-Trường Đại học Dược Hà Nội.

Phương pháp nghiên cứu

Hydro hóa phospholipid

Phương pháp hydro hóa PL trứng tham khảo quy trình hydro hóa thường dùng tại Viện Hóa học Công nghiệp Việt Nam. Phản ứng hydro hóa PL được thực hiện trong thiết bị phản ứng cao áp Parr inst. (Mỹ) với dung tích bình phản ứng 3,75 lít. Cho 100 g PL, 1500 ml methanol và 3 g xúc tác Niken-Raney đã hoạt hoá vào bình phản ứng, đuổi không khí bằng khí nitơ ở áp suất 10 - 20 bar khoảng 5 - 6 lần. Sau đó, dùng hydro ở áp suất 10 - 20 bar đuổi nitơ ra khỏi môi trường phản ứng 5 - 6 lần. Nâng dần nhiệt độ và áp suất của hệ lên 50 °C và 2 bar và giữ không đổi trong quá trình phản ứng. Sau 3 giờ, điều chỉnh về áp suất thường, hỗn hợp sản phẩm được làm lạnh và tháo ra. Xúc tác được lọc, tách, tái hoạt hóa và được sử dụng lại. Dung dịch sau phản ứng được cô cất loại dung môi.

Phân tích và biện giải cấu trúc của PL lòng đỏ trứng

Phân tích thành phần acid béo

Tiến hành phân tích thành phần acid béo của PL trứng bằng phương pháp sắc ký khí-khối phổ (GC-MS) có thực hiện methyl hóa các acid béo theo "chuyên luận về xác định thành phần acid béo của chất béo" của USP34-NF29.

Phân tích cấu trúc phospholipid

Tiến hành xác định cấu trúc của các thành phần trong mẫu PL bằng phương pháp sắc ký lỏng-khối phổ (LC-MS). Mẫu được phân tách và tinh sạch bằng hệ thống sắc ký lỏng sử dụng hệ dung môi pha động là methanol: nước. Dung dịch ở đầu ra của máy sắc ký được đưa vào máy khối phổ và các phân tử được ion hóa nhờ kỹ thuật ion hóa phun sương điện tử (ESI- Electrospray Ionization). Sau đó, bộ phân tích khối tách các ion có trị số m/z khác nhau thành từng phần riêng biệt. Mẫu được đưa vào máy khối phổ để xác định khối lượng nguyên tử của chất có trong mẫu.

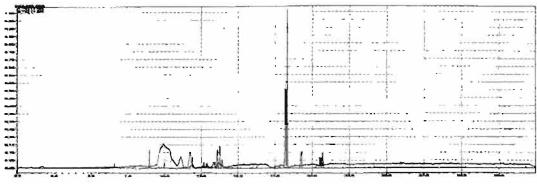
Các phương pháp đánh giá và xây dựng tiêu chuẩn cơ sở của PL lòng đỏ trứng

Các phương pháp xác định các chỉ số hóa lý như: giới hạn kim loại nặng, chỉ số acid, chỉ số peroxyd, nội độc tố vi khuẩn, giới hạn nhiễm khuẩn, hàm lượng nước, chỉ số iod theo USP34-NF29.

Kết quả và bàn luận

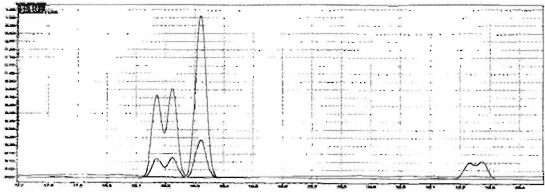
Phân tích và biện giải cấu trúc của PL lòng đỏ trứng

Xác định thành phần acid béo trong PL lòng đỏ trứng bằng phương pháp GC-MS cho thấy trong mẫu có 2 acid béo là acid palmitic và acid oleic (kết quả không trình bày trong bài báo này). Phân tích mẫu PL bằng phương pháp LC-MS thu được phổ khối của PL (hình 1). Pic có cường độ mạnh nhất có thời gian lưu nằm trong khoảng 18,0 phút đến 18,5 phút.



Hình 1: *Hình ảnh LC-MS của PL trứng*

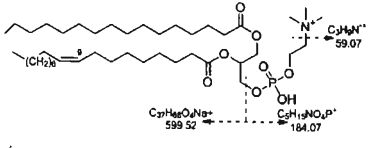
Phân tích hình ảnh trên phổ khối của pic có cường độ mạnh nhất, phát hiện vị trí này có 3 pic với thời gian lưu lần lượt là 18,168 phút, 18,222 phút và 18,327 phút (hình 2).



Hình 2: *Hình ảnh LC-MS ở vị trí pic có cường độ mạnh nhất*

Phân tích phổ khối của các ion ứng với cả 3 pic trên cho thấy khối lượng phân tử của các mảnh ion này là như nhau và ứng với ion có công thức phân tử là $C_{45}H_{77}NO_8Na^+$ (khối lượng phân tử là 782,5525). Tại thời gian lưu 18,327 phút, có 1 pic của ion có khối lượng phân tử là 723,4907. Như vậy, mảnh ion cho pic chính đã bị cắt đi mảnh có khối lượng phân tử là 59,07, có công thức phân tử là $C_3H_9N^+$. Pic có cường độ mạnh nhất là mảnh ion có khối lượng phân tử là 599,4995 và ứng với công thức phân tử là $C_{37}H_{68}O_4Na^+$. Mảnh ion đã bị cắt ra khỏi ion phát hiện trong phổ khối có khối lượng phân tử là 184,07 và tương ứng với gốc cholin ($C_5H_{15}NO_4P^+$). Như vậy, thành phần cho pic có cường độ mạnh nhất trên khối phổ là phosphatidylcholin.

Mặt khác, phối hợp với kết quả phân tích từ GC-MS cho thấy thành phần acid béo trong mẫu PL trứng gồm acid palmitic và acid oleic nên mảnh ion $C_{37}H_{68}O_4Na^+$ có cấu tạo như mô tả ở hình 3. Do đó, xác định được thành phần phosphatidylcholin trong mẫu PL trứng khi chưa hydro hóa là palmitoyl oleoyl phosphatidylcholin, có cấu tạo được trình bày trong hình 3. Kết quả này cũng phù hợp với kết quả nghiên cứu trước đó [3,4].



Hình 3: *Công thức cấu tạo của palmitoyl oleoyl phosphatidylcholin*

Trong công thức của palmitoyl oleoyl phosphatidylcholin, có 1 nối đôi ở vị trí C9 của mạch carbon làm cho PL trứng rất dễ bị oxy hoá. Do đó, nguyên liệu PL được tiếp tục hydro hóa nhằm tăng tính bền cho sản phẩm. Sản phẩm được phân tích đánh giá thông qua chỉ số iod, kết quả chỉ số iod đo được là 4,82 (bảng 3). Chỉ số iod của PL trứng thấp chứng tỏ hiệu suất của quá trình hydro hóa rất cao vì quá trình hydro hóa coi như xảy ra hoàn toàn nếu chỉ số iod không lớn hơn 2[5]. Mặt khác, giá trị peroxyd đo được bằng 0 (bảng 3), khẳng định vai trò của quá trình hydro hóa trong việc tăng tính ổn định của PL.

Xây dựng tiêu chuẩn cơ sở của nguyên liệu PL lòng đỏ trứng làm nguyên liệu chế tạo thuốc tiêm dạng liposom

Hiện nay, duy nhất USP 34-NF29 có chuyên luận phân tích về PL trứng dùng cho sản xuất dược phẩm. Tuy nhiên, để ứng dụng PL trứng chiết tách được để làm nguyên liệu sản xuất thuốc tiêm dạng liposom đòi hỏi nguyên liệu PL phải đáp ứng yêu cầu vừa là nguyên liệu dùng cho sản xuất dược phẩm, vừa là nguyên liệu sản xuất thuốc tiêm và nguyên liệu sản xuất dạng thuốc liposom. Do đó, chúng tôi xây dựng yêu cầu đối với các chỉ tiêu này trong tiêu chuẩn cơ sở cao hơn USP34-NF29. Mặt khác, qua tham khảo các chỉ tiêu của một số nguyên liệu PL dùng tạo liposom có sẵn trên thị trường, chúng tôi xây dựng tiêu chuẩn cơ sở cho PL trứng làm nguyên liệu sản xuất liposom dạng thuốc tiêm (bảng 2). Qua các chỉ tiêu công bố của các sản phẩm nguyên liệu PL dùng cho tạo liposom đang có sẵn trên thị trường, hầu hết các nguyên liệu này công bố hàm lượng PL cao trên 90%. Tuy nhiên, chúng tôi chưa tìm thấy tài liệu công bố nào quy định chính xác thành phần phosphatidyl cholin (PC) phải đạt là bao nhiêu. Hàm lượng PC trong nguyên liệu dùng để chế tạo liposom trên thị trường thường cao hơn 90% để các tiểu phân liposom tạo thành sẽ có độ ổn định và khả năng bao gói dược chất cao.

Bảng 2: *Tiêu chuẩn cơ sở của phospholipid trứng*

Chỉ tiêu	*Yêu cầu qui định trong USP34-NF29*	*Yêu cầu của PL chiết xuất được*	*Phương pháp*
Thành phần PL	Không quá 3% LPC	- Không thấp hơn 90% PC - Không quá 3% LPC	Theo chuyên luận nêng về phospholipid trứng của USP34-NF29
Tạp hữu cơ không phải PL	Không quá 7%	Không quá 7%	Theo chuyên luận nêng về phospholipid trứng của USP34-NF29
Kim loại nặng	Không quá 10 ppm	Không quá 10 ppm	Xác định giới hạn kim loại nặng <231>, phương pháp II, USP34-NF29
Chỉ số acid	Không quá 20,0	Không quá 9,0	Phụ lục chỉ số acid <401>, USP34-NF29
Chỉ số peroxyd	Không quá 3,0	Không quá 1,0	Phụ lục chỉ số peroxid <401>, USP34-NF29
Nội độc tố vi khuẩn	Không quá 6 USP Endotoxin Units/g	Không lớn hơn 6 Endoloxin Units/g	Xác dinh nội độc tố <85>, USP34-NF29
Giới hạn nhiễm khuẩn	Tổng số vi sinh vật đếm được không quá 100 cfu/g, không có *Salmonella* và *Escherichia coli*	Tổng số vi sinh vật đếm được không quá 10 cfu/g, không có *Salmonella* và *Escherichia coli*	Xác định giới hạn nhiễm khuẩn <61> và các vi sinh vật <62>, USP34-NF29
Hàm lượng nước	Không quá 6,0%	Không quá 6,0%	Xác định hàm ẩm <921>,phương pháp I, USP34-NF29
Chỉ số iod	Không quy định trong chuyên luận	Không quá 5,0	Xác định chỉ số iod, phương pháp I, USP34-NF29

Tiếp theo, chúng tôi tiến hành phân tích song song trong cùng điều kiện một số chỉ tiêu hóa lý đã nêu trong tiêu chuẩn cơ sở của mẫu nguyên liệu PL thu được của nghiên cứu này so sánh với mẫu nguyên liệu PL (PC-98N) đang có sẵn trên thị trường được dùng cho cả chế tạo liposom. Kết quả được trình bày ở bảng 3.

Bảng 3: *Phân tích so sánh PL trứng chiết xuất được và PL có sẵn trên thị trường (PC-98N)*

Tiêu chí	*Yêu cầu*	*Kết quả phân tích*	
		PL trứng chiết xuất được	*PC-98N*
Phosphatidyl cholin	Không thấp hơn 90%	92,57%	99,0%
LPC	Không quá 3%	0%	0,1%
Tạp hữu cơ không phải PL	Không quá 7%	1,30 %	0,3 %
Kim loại nặng	Không quá 10 ppm	Đạt	Đạt
Chỉ số acid	Không quá 9	8,40	0,09
Chỉ số peroxyd	Không quá 1	0 meq/kg	0 meq/kg
Nội độc tố vi khuẩn	không lớn hơn 6 Endotoxin Units/g	Đạt	Đạt
Giới hạn nhiễm khuẩn	Tổng số vi sinh vật đếm được không quá 10 cfu/g, không có *Salmonella* và *Escherichia coli*.	Đạt	Đạt
Hàm lượng nước	Không quá 6,0%	5,85 %	2,5 %
Chỉ số iod	Không quá 5,0	4,82	61

Hai nguyên liệu PL trứng đều có độ tinh khiết cao với tỉ lệ PC lớn hơn 90% (PC-98N có tỉ lệ PC lớn hơn). PL trứng của đề tài đạt các chỉ tiêu của tiêu chuẩn cơ sở đã xây dựng. LPC là sản phẩm khi PC bị thủy phân sẽ loại bỏ một gốc acyl. Đây là thành phần không mong muốn trong PL do LPC có độc tính và làm giảm sự ổn định của liposom tạo thành. Trong thành phần của PL trứng, USP34-NF29 yêu cầu không lớn hơn 3% LPC, mẫu PL trứng trong nghiên cứu này không tìm thấy có LPC. Kết quả bảng 3 cho thấy PC-98N không đạt chỉ tiêu về chỉ số iod của tiêu chuẩn cơ sở do dạng nguyên liệu này chưa được hydro hóa. Mẫu PL trứng của đề tài (đã hydro hóa) có chỉ số iod thấp hơn hẳn so với mẫu PC-98N (chưa hydro hóa) cho thấy vai trò của quá trình hydro hóa. Mẫu PL chưa hydro hóa có mức độ không bão hòa cao. Kết quả này phù hợp với nghiên cứu của Luz E. Palacios và cộng sự [2].

Việc so sánh PL của đề tài với PC-98N dựa trên các tiêu chí của tiêu chuẩn cơ sở cho thấy chất lượng của PL trong đề tài thu được hoàn toàn có thể ứng dụng làm nguyên liệu sản xuất liposom dạng tiêm. Theo sự hiểu biết của tác giả, đây là công trình nghiên cứu đầu tiên tại Việt Nam đã tiêu chuẩn hóa phospholipid phù hợp làm nguyên liệu sản xuất liposom dạng thuốc tiêm.

Kết luận

Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã đưa ra được quy trình hydro hóa PL, phân tích được cấu trúc của PL trứng khi chưa hydro hóa chứa chủ yếu là palmitoyl oleoyl phosphatidylcholin. Nghiên cứu cũng đã xây dựng tiêu chuẩn cơ sở cho PL đáp ứng làm nguyên liệu sản xuất thuốc tiêm dạng liposom.

Tài liệu tham khảo

1. Nguyễn Thị Lập và CS (2010), "Nghiên cứu chiết xuất phospholipid từ lòng đỏ trứng bằng phương pháp sử dụng CO2 ở trạng thái siêu tới hạn làm nguyên liệu chế tạo liposom", *Tạp chí Dược học*, 487, tr. 35-37.

2. Palacios E. Luz and Wang Tong (2005), "Egg-yolk lecithin fractionation and characterization", *Journal of the american oil chemists' society*, 82,8, pp. 571-578

3. Mine Y and Kovacs-Nolan J. (2004), "Biologically active hen egg components in human health and disease", *J Poultry. Sci.*, 41, pp. 1 - 29.

4. Rhodes D.N. and Lea C.H., (1957) Phospholipids. 4. On the composition of hen egg phospholipids", *Biochem. J.*, 65, pp. 526-33

5. Yoon Ho Tae and Kim Ho In (2002), "Phosphatidylcholine isolation from egg yolk phospholipids by high-performance liquid chromatography", *Journal of Chromatography A*, 949, pp. 209-216.

(*Ngày nhận bài: 16/05/2014 - Ngày duyệt đăng: 10/07/2014*)