

Phát triển phương pháp HPLC-DAD định lượng pentostatin trong quả thể nấm dược liệu *Cordyceps militaris*

Vũ Xuân Tạo^{1*}, Nguyễn Thị Hà Ly², Trần Bảo Trâm¹, Nguyễn Đức Duy^{1,3},
Nguyễn Thảo Nhi⁴, Nguyễn Thị Thanh Mai¹, Đào Ngọc Ánh¹, Trần Văn Tuấn³

¹Trung tâm Sinh học Thực nghiệm, Viện Ứng dụng Công nghệ, Bộ Khoa học và Công nghệ

²Viện Dược liệu, Bộ Y tế

³Khoa Sinh học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội

⁴Trường Trung học Phổ thông Chi Lăng, Lạng Sơn

Ngày nhận bài 20/4/2023; ngày chuyển phản biện 25/4/2023; ngày nhận phản biện 5/5/2023; ngày chấp nhận đăng 9/5/2023

Tóm tắt:

Cordyceps militaris là loài nấm dược liệu quan trọng trong y học cổ truyền. Chúng chứa nhiều hoạt chất có hoạt tính sinh học ứng dụng trong y học như cordycepin, adenosine... Gần đây thông qua phân tích hệ gen, *C. militaris* đã được chứng minh có khả năng sinh tổng hợp pentostatin. Pentostatin là hoạt chất quan trọng trong sản xuất các loại thuốc hóa trị sử dụng trong điều trị ung thư. Tuy nhiên, việc phát triển các phương pháp định lượng pentostatin trong nấm *C. militaris* chưa có nhiều nghiên cứu đề cập. Trong nghiên cứu này, các tác giả xây dựng và thẩm định phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC-DAD) đơn giản với độ chính xác cao để định lượng pentostatin trong quả thể nấm *C. militaris*. Quá trình sắc ký được thực hiện trên cột C_{18} của Hãng Agilent (250x4,6 mm, 5 μ m) với chương trình rửa giải gradient sử dụng hệ dung môi pha động gồm acetonitrile và nước. Tốc độ rửa giải là 0,6 ml/phút, bước sóng phát hiện được lựa chọn là 280 nm. Đường chuẩn xây dựng được đều đạt độ tuyến tính cao với $R^2 > 0,99$. Kết quả thẩm định phương pháp về độ lặp lại, hiệu suất thu hồi, độ chọn lọc đều đạt theo hướng dẫn của Hội nghị quốc tế về hài hòa các thủ tục đăng ký dược phẩm sử dụng cho con người (International Conference on Harmonization).

Từ khóa: *Cordyceps militaris*, HPLC-DAD, pentostatin, quả thể nấm.

Chỉ số phân loại: 4.6

Đặt vấn đề

Nhiều loài nấm thuộc chi *Cordyceps* được sử dụng như một loại dược liệu quý trong y dược học cổ truyền tại các nước châu Á. Trong số những loài nấm thuộc chi *Cordyceps* đã được phát hiện, *C. sinensis* (*Ophiocordyceps sinensis*) và *C. militaris* là 2 loài được quan tâm nghiên cứu và sử dụng nhiều trong y học [1, 2]. *C. sinensis* chủ yếu được khai thác từ tự nhiên với giá rất cao, do sự khai thác quá mức dẫn tới cạn kiệt. Trong khi đó, loài nấm *C. militaris* dễ dàng hình thành quả thể trong môi trường nuôi cấy nhân tạo và sản phẩm thu được cũng có giá trị dược liệu cao, thậm chí hàm lượng hoạt chất cordycepin cao hơn so với loài *C. sinensis* [3]. Hoạt chất cordycepin được chứng minh là có khả năng kháng ung thư, kháng oxy hóa, kháng viêm, tăng cường hoạt động hệ miễn dịch, tăng cường chức năng gan, thận [4-6]. Do vậy, *C. militaris* được đánh giá là có giá trị sử dụng và thương mại hóa cao.

Gần đây thông qua phân tích hệ gen, *C. militaris* đã được chứng minh có khả năng sinh tổng hợp pentostatin [7]. Pentostatin (có tên gọi khác là deoxycoformycin) là một hợp chất chống chuyển hóa, có tác dụng chống ung thư bạch cầu. Nghiên cứu gần đây cho thấy sự kết hợp giữa cordycepin và pentostatin giúp làm tăng tác dụng ức chế sự phát triển của khối u [8]. Như vậy có thể thấy, hoạt chất cordycepin và

pentostatin là những hoạt chất quan trọng để đánh giá chất lượng nấm *C. militaris*. Hiện nay, đã có nhiều nghiên cứu trong nước và trên thế giới về phát triển các phương pháp định tính, định lượng cordycepin trong nấm *C. militaris* [3, 9]. Trên thế giới, việc phát hiện và định lượng pentostatin ở nấm *C. militaris* bước đầu được báo cáo dựa trên phân tích hệ gen kết hợp với phương pháp HPLC [7]. Tuy nhiên tại Việt Nam, việc phát triển phương pháp định lượng pentostatin trong nấm *C. militaris* chưa có nghiên cứu nào đề cập. Vì vậy, nghiên cứu này sẽ phát triển phương pháp HPLC-DAD để phân tích định lượng pentostatin trong mẫu quả thể nấm *C. militaris*.

Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

Vật liệu

Mẫu quả thể chủng nấm *C. militaris* SH03, TN01, HL13 và HN01 được cung cấp bởi Trung tâm Sinh học Thực nghiệm thuộc Viện Ứng dụng Công nghệ, Bộ Khoa học và Công nghệ. Các chủng nấm *C. militaris* đều đã được định danh và công bố năm 2022 [10]. Mẫu quả thể tươi sau khi nuôi cấy 65 ngày được thu và sấy khô bằng máy sấy thăng hoa ở nhiệt độ -40°C tới khi độ ẩm đạt dưới 5%.

Chất chuẩn dùng trong nghiên cứu là pentostatin (hình 1) (CAS: 53910-25-1, số Lot: L2203344, độ tinh khiết 98,0%) [11] được cung cấp bởi Hãng Aladdin (Trung Quốc).

*Tác giả liên hệ: Email: taovx.tsa@gmail.com

Development of HPLC-DAD method for the quantification of pentostatin in the fruiting body of *Cordyceps militaris*

Xuan Tao Vu^{1*}, Thi Ha Ly Nguyen², Bao Tram Tran¹,
Duc Duy Nguyen^{1,3}, Thao Nhi Nguyen⁴, Thi Thanh Mai Nguyen¹,
Ngoc Anh Dao¹, Van Tuan Tran³

¹Center of Experimental Biology, National Center for Technological Progress,
Ministry of Science and Technology

²National Institute of Medicinal Materials, Ministry of Health

³Faculty of Biology, University of Science, Vietnam National University, Hanoi

⁴Chi Lang High School, Lang Son Province

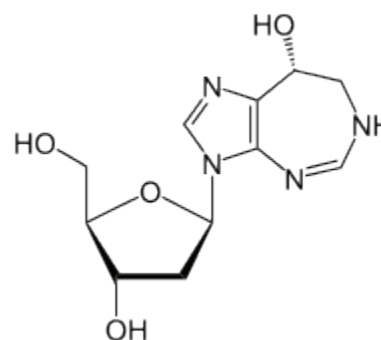
Received 20 April 2023; accepted 9 May 2023

Abstract:

Cordyceps militaris is an important medicinal mushroom in traditional medicine. It contains many bioactive compounds that have applications in medicine, such as cordycepin, adenosine... Recently, through genome analysis, *C. militaris* has been shown to have the ability to synthesise pentostatin. Pentostatin is an important active ingredient in the production of chemotherapy drugs used in cancer treatment. However, there have been few studies on the development of methods for quantifying pentostatin in *C. militaris*. In this study, a simple and sensitive high-performance liquid chromatography with diode-array detection (HPLC-DAD) method for the quantification of pentostatin in *C. militaris* was developed and validated. The chromatographic separations were obtained by an Agilent C₁₈ column (250x4.6 mm i.d., 5 µm particle size) using gradient elution with acetonitrile and water. The flow rate of 0.6 ml/min and detection wavelength of 280 nm were selected. The calibration curve displayed a good linear correlation ($R^2 > 0.99$). The validation results displayed great accuracy, repeatability, linearity, and selectivity according to The International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use (ICH) guideline.

Keywords: *Cordyceps militaris*, fruiting body, HPLC-DAD, pentostatin.

Classification number: 4.6



Hình 1. Công thức cấu tạo hợp chất pentostatin.

Thiết bị dùng trong nghiên cứu là hệ thống HPLC (Shimadzu, Nhật Bản), gồm: bơm LC-20AD, bộ tiêm mẫu tự động SIL-20AHT, detector DAD, lò cột CTO-10AS VP, cột Agilent C18 (250x4,6 mm, 5 µm), kết nối với máy tính có cài đặt phần mềm Labsolution để truy xuất kết quả.

Phương pháp nghiên cứu

Phương pháp tối ưu hóa điều kiện phân tích sắc ký: Khảo sát bước sóng phát hiện: Phổ UV của dung dịch chuẩn pentostatin được đo trên hệ thống HPLC-DAD và dùng để xác định cực đại hấp thụ (λ_{max}). Lựa chọn bước sóng tại vị trí cực đại hấp thụ làm bước sóng phát hiện. Khảo sát chương trình pha động: Tiến hành khảo sát chương trình rửa giải gradient với pha động gồm acetonitril hoặc methanol (kênh B) và nước (kênh A) theo các tỷ lệ khác nhau.

Để tối ưu hóa các điều kiện phân tích sắc ký, sử dụng các dung dịch sau: Dung dịch chuẩn pentostatin có nồng độ 62,5 µg/ml pha trong nước. Dung dịch mẫu thử: Cân chính xác khoảng 0,2 g bột mẫu thử (quả thể nấm được nghiền và qua rây số 180) vào bình tam giác dung tích 50 ml. Thêm 8 ml nước, chiết siêu âm trong 60 phút (công suất 250 w, tần số 50 kHz, nhiệt độ phòng). Để yên 10 phút, lọc dịch chiết vào bình định mức 10 ml, bổ sung đến vạch mức bằng nước, lắc đều, thu được dung dịch mẫu thử.

Khảo sát phương pháp xử lý mẫu:

- Khảo sát dung môi chiết: nước, ethanol và hỗn hợp ethanol/nước ở các tỷ lệ khác nhau.

- Khảo sát phương pháp chiết: Trong phạm vi phòng thí nghiệm, hai phương pháp chiết được lựa chọn để khảo sát là chiết siêu âm và chiết hồi lưu. Chiết siêu âm là quá trình chiết với sự hỗ trợ của sóng siêu âm, thường được sử dụng trong chuẩn bị mẫu phân tích. Chiết hồi lưu là một trong những phương pháp ngâm chiết truyền thống, được thực hiện trong một hệ thống ngưng tụ. Khảo sát thời gian chiết: Thử nghiệm với các khoảng thời gian chiết khác nhau là 30, 60 và 90 phút. Khảo sát tỷ lệ được liệu/thể tích dung môi chiết (g/ml): Thử nghiệm với các tỷ lệ 0,2 g/5 ml, 0,2 g/10 ml và 0,2 g/25 ml. Khảo sát số lần chiết là 1, 2 và 3 lần.

Thẩm định phương pháp phân tích: Sau khi khảo sát quá trình xử lý mẫu và các điều kiện sắc ký, tiến hành thẩm định phương pháp định lượng pentostatin trong mẫu theo hướng dẫn của ICH. Các chỉ tiêu thẩm định bao gồm: tính thích hợp của hệ thống, độ đặc hiệu, giới hạn phát hiện và giới hạn định lượng, đường chuẩn, độ lặp lại trong ngày và khác ngày, hiệu suất thu hồi [12].

Hàm lượng pentostatin (% , tính trên khối lượng mẫu khô kiệt) trong mẫu thử được tính theo công thức sau:

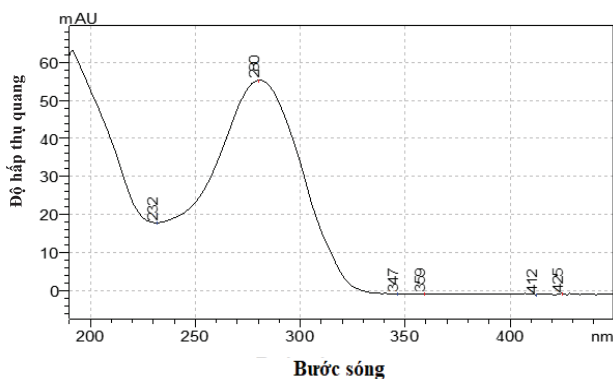
$$X (\%) = \frac{C \times V \times 100}{m \times 10^6 \times (100 - B)} \times 100$$

trong đó: X (%) là hàm lượng của pentostatin có trong mẫu thử; C là nồng độ của pentostatin có trong dung dịch mẫu thử tính từ phương trình đường chuẩn (µg/ml); V là thể tích dung dịch chiết (ml); m là khối lượng mẫu thử (g); B là độ ẩm của mẫu thử (%).

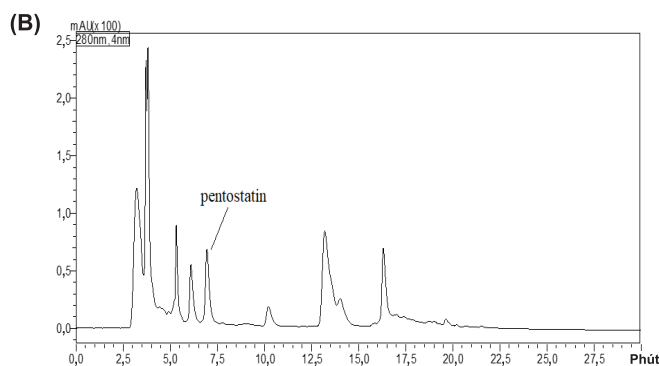
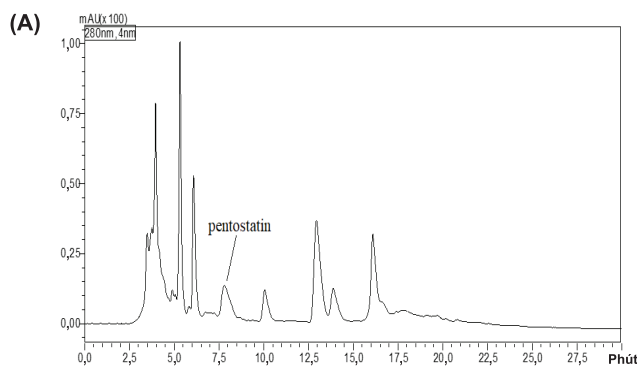
Kết quả và bàn luận

Kết quả tối ưu hóa điều kiện phân tích HPLC-DAD

Nghiên cứu quét phổ UV của dung dịch chuẩn pentostatin cho thấy, pentostatin có cực đại hấp thụ tại 280 nm (hình 2). Kết quả này phù hợp với nghiên cứu của Y. Xia và cs (2017) [7]. Do vậy, bước sóng 280 nm được lựa chọn để định lượng pentostatin trong quả thể nấm *C. militaris*.



Hình 2. Phổ UV của dung dịch chuẩn pentostatin.



Hình 3. Sắc ký đồ HPLC-DAD phân tích mẫu dịch chiết quả thể nấm *C. militaris* với một số điều kiện phân tích khác nhau. (A) Điều kiện 1: methanol-nước (7-93 v/v), v=0,7 ml/phút, chế độ rửa giải đẳng dòng; (B) Điều kiện 2: acetonitril-nước (7-93 v/v), v=0,6 ml/phút, chế độ rửa giải đẳng dòng.

Đề lựa chọn được điều kiện phân tích tối ưu hơn, tiến hành khảo sát hệ dung môi pha động và điều kiện rửa giải dựa trên một số tài liệu tham khảo [2, 13]. Kết quả khảo sát được thể hiện ở bảng 1 và hình 3.

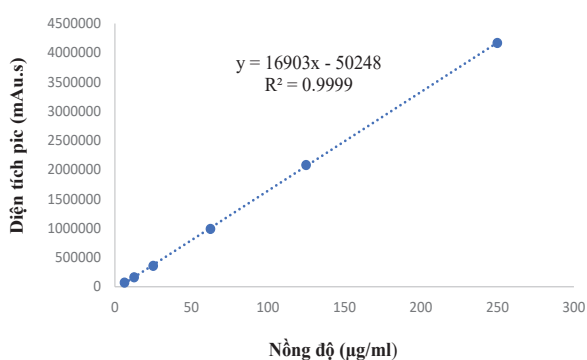
Bảng 1. Thông số pic của pentostatin ứng với các điều kiện phân tích khác nhau.

Thông số	Điều kiện 1	Điều kiện 2
Thời gian lưu (t_R , phút)	7,79	7,25
Độ phân giải R_s (yêu cầu trên 2,5)	2,23	2,69
Hệ số bất đối T_f (yêu cầu trong khoảng 0,8-1,2)	1,86	1,12
Số đĩa lý thuyết N (yêu cầu trên 2000)	2234	68895

Acetonitril và methanol là 2 loại dung môi phổ biến trong sắc ký lỏng, trong đó nhìn chung acetonitril có khả năng rửa giải tốt hơn methanol do có sự khác biệt về độ nhớt, độ phân cực. Tốc độ dòng cũng là yếu tố ảnh hưởng đến sự rửa giải và khả năng phân tách giữa các pic. Trong nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành khảo sát một số tốc độ rửa giải khác nhau trong khoảng 0,5-1,0 ml/phút với 2 loại hệ dung môi rửa giải là acetonitril-nước và methanol-nước. Kết quả khảo sát thu được cho thấy, khi sử dụng pha động là methanol-nước, tín hiệu pic của pentostatin bị loãng rộng và không sắc nhọn, hệ số bất đối là 1,86 (ngoài khoảng quy định) và độ phân giải nhỏ hơn 2,5, chứng tỏ pic của pentostatin chưa đáp ứng các yêu cầu dùng cho phân tích định lượng [12, 14]. Với điều kiện 2, pha động sử dụng là acetonitril-nước, tín hiệu pic của pentostatin cân đối và tách tốt trên nền mẫu thử. Các thông số pic đều đạt so với yêu cầu, vì vậy điều kiện 2 (acetonitril-nước (7-93 v/v), v=0,6 ml/phút, chế độ rửa giải đẳng dòng) được lựa chọn cho nghiên cứu tiếp theo.

Kết quả xây dựng đường chuẩn định lượng pentostatin

Chuẩn bị một dãy các dung dịch pentostatin chuẩn có nồng độ của pentostatin 6,25-250 µg/ml pha trong nước và tiến hành phân tích sắc ký theo các điều kiện đã lựa chọn được. Kết quả khảo sát sự tương quan giữa diện tích pic và nồng độ pentostatin được trình bày ở hình 4. Đường chuẩn thu được có hệ số tương quan $R^2 > 0,999$, đạt yêu cầu theo quy định của AOAC và ICH về đường chuẩn dùng trong phân tích định lượng [12, 15]. Từ kết quả thu được cho thấy khoảng nồng độ lựa chọn có tính tuyến tính tốt, phù hợp để áp dụng định lượng pentostatin.



Hình 4. Đường chuẩn pentostatin.

Kết quả xác định các điều kiện xử lý mẫu

Lựa chọn dung môi chiết: Để lựa chọn được dung môi có hiệu suất chiết cao nhất, nghiên cứu tiến hành khảo sát các dung môi chiết gồm: nước, ethanol và hỗn hợp ethanol/nước ở một số tỷ lệ khác nhau. Các thí nghiệm được khảo sát trong điều kiện cố định như sau: khối lượng mẫu 0,2 g, thể tích dung môi chiết 10 ml, phương pháp chiết là siêu âm, thời gian chiết 30 phút, số lần chiết là 1 lần. Hiệu quả chiết của từng dung môi được đánh giá qua hàm lượng pentostatin trong mẫu. Mỗi thí nghiệm được tiến hành 3 lần độc lập. Kết quả thu được cho thấy, khi sử dụng dung môi chiết là nước thì hàm lượng pentostatin xác định được cao hơn khi sử dụng dung môi hữu cơ (bảng 2). Dựa trên công thức cấu tạo của pentostatin (hình 1) và kết quả các nghiên cứu khác đã công bố, hợp chất này có khả năng tan tốt trong nước (độ tan >100 mg/ml), DMSO (độ tan >13,4 mg/ml) và kém tan trong ethanol [11, 13]. Do vậy, nước được lựa chọn là dung môi để chiết xuất pentostatin ra khỏi nền mẫu quả thể nấm *C. militaris* cho phân tích HPLC-DAD.

Bảng 2. Kết quả khảo sát dung môi chiết (n=3).

Dung môi	Khối lượng (g)	Hàm lượng pentostatin trích ly được (%) [*]
Nước	0,2101	0,224±0,003
Ethanol	0,2009	0,168±0,003
Ethanol/nước (20/80)	0,2012	0,207±0,002
Ethanol/nước (30/70)	0,2003	0,202±0,003
Ethanol/nước (40/60)	0,2034	0,197±0,001
Ethanol/nước (50/50)	0,2012	0,195±0,002
Ethanol/nước (80/20)	0,2005	0,170±0,002

^{*}: các kết quả thu được ứng với từng thí nghiệm khảo sát đều được kiểm tra bằng T-test cho thấy p_{value} < 0,05 chứng tỏ sự sai khác giữa các kết quả thu được có ý nghĩa thống kê.

Lựa chọn phương pháp chiết mẫu và thời gian chiết: Với mục tiêu lựa chọn được phương pháp chiết và thời gian chiết cho hiệu suất tối ưu, phù hợp có thể áp dụng rộng rãi, nghiên cứu tiến hành khảo sát các phương pháp và thời gian chiết. Các thí nghiệm được khảo sát trong điều kiện cố định như sau: khối lượng mẫu 0,2 g, thể tích dung môi chiết 10

ml, số lần chiết là 1 lần. Tiến hành phân tích các dung dịch thử bằng HPLC-DAD theo điều kiện đã khảo sát, xác định hàm lượng của pentostatin (bảng 3).

Bảng 3. Kết quả khảo sát phương pháp chiết mẫu và thời gian chiết (n=3).

Điều kiện chiết	Khối lượng (g)	Hàm lượng pentostatin (%)
Siêu âm 30 phút	0,2012	0,223±0,001
Siêu âm 60 phút	0,2009	0,258±0,002
Siêu âm 90 phút	0,2004	0,260±0,002
Hồi lưu 30 phút	0,2004	0,203±0,003
Hồi lưu 60 phút	0,2082	0,219±0,002
Hồi lưu 90 phút	0,2091	0,232±0,003

^{*}: các kết quả thu được ứng với từng thí nghiệm khảo sát đều được kiểm tra bằng T-test cho thấy p_{value} < 0,05 chứng tỏ sự sai khác giữa các kết quả thu được có ý nghĩa thống kê.

Kết quả nghiên cứu cho thấy, hàm lượng của pentostatin xác định được trong dịch chiết thu được bằng phương pháp chiết siêu âm lớn hơn rõ rệt so với phương pháp chiết hồi lưu. So với phương pháp chiết hồi lưu, chiết siêu âm có nhược điểm là tính chọn lọc kém, dịch chiết thu được lẫn nhiều tạp chất hơn [16]. Tuy nhiên, phương pháp chiết siêu âm vẫn thường được áp dụng bởi một số ưu điểm như thao tác thí nghiệm đơn giản, thiết bị chiết xuất thường quy và được trang bị ở hầu hết các phòng thí nghiệm. Kết quả khảo sát thời gian chiết cho thấy, khi thời gian chiết siêu âm là 60-90 phút thì hàm lượng pentostatin thu được là lớn nhất. Vì vậy, phương pháp chiết siêu âm với thời gian chiết 60 phút được lựa chọn để xử lý mẫu quả thể nấm *C. militaris*.

Lựa chọn tỷ lệ khối lượng dược liệu/thể tích dung môi chiết (mg/ml) và số lần chiết: Trong nghiên cứu này, các thí nghiệm được khảo sát trong điều kiện cố định như sau: khối lượng mẫu 0,2 g, phương pháp chiết là siêu âm, thời gian chiết 30 phút. Kết quả nghiên cứu khảo sát tỷ lệ khối lượng dược liệu/thể tích dung môi chiết và số lần chiết tới hàm lượng pentostatin thu được được thể hiện ở bảng 4.

Bảng 4. Kết quả khảo sát tỷ lệ khối lượng dược liệu/thể tích dung môi chiết (mg/ml) và số lần chiết.

Điều kiện chiết	Khối lượng (g)	Hàm lượng pentostatin trích ly được (%)	Tổng hàm lượng pentostatin trích ly được (%)
0,2 g/5 ml x lần 1	0,2003	0,231±0,002	
0,2 g/5 ml x lần 2	0,2003	0,030±0,003	Sau 2 lần chiết: 0,261%
0,2 g/5 ml x lần 3	0,2003	0,015±0,003	Sau 3 lần chiết: 0,276%
0,2 g/10 ml x lần 1	0,2034	0,253±0,001	
0,2 g/10 ml x lần 2	0,2034	0,021±0,002	Sau 2 lần chiết: 0,274%
0,2 g/10 ml x lần 3	0,2034	0,003±0,001 [*]	Sau 3 lần chiết: 0,277%
0,2 g/25 ml x lần 1	0,2112	0,258±0,003	
0,2 g/25 ml x lần 2	0,2112	0,014±0,002	Sau 2 lần chiết: 0,272%

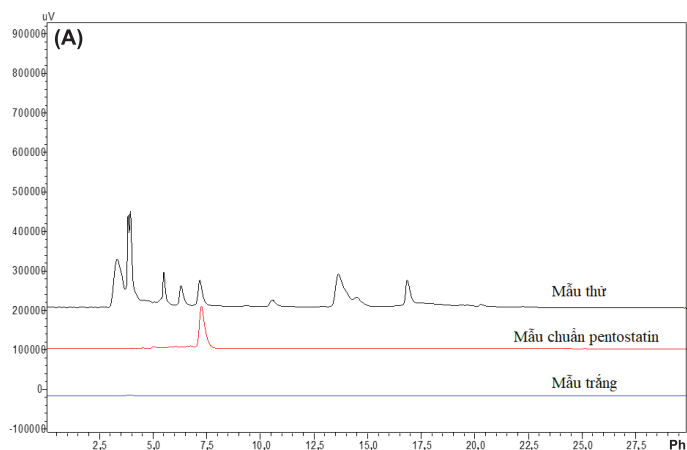
^{*}: dịch chiết được cô cạn và làm đặc lên 10 lần trước khi phân tích HPLC-DAD.

Kết quả nghiên cứu cho thấy, tỷ lệ 0,2 g/10 ml chiết 1 lần cho kết quả hàm lượng pentostatin xác định được là tối ưu (0,253%), tăng khoảng 9,5% so với tỷ lệ 0,2 g/5 ml (0,231%). Khi khảo sát số lần chiết ứng với tỷ lệ 0,2 g/10 ml, sau 2 lần chiết, kết quả hàm lượng pentostatin xác định được là 0,274%, khác biệt không đáng kể so với kết quả thu được sau 3 lần chiết. Kết quả thu được khá tương đồng so với quy trình phân tích đồng thời cordycepin và pentostatin sử dụng tỷ lệ khối lượng mẫu/thể tích dung môi chiết là 0,5 g/50 ml [13]. Tuy nhiên, khi chiết 2 lần, kết quả phân tích pentostatin thu được cao hơn khi chiết 1 lần. Từ đó, nghiên cứu lựa chọn tỷ lệ khối lượng dược liệu/thể tích dung môi chiết là 0,2 g/10 ml và số lần chiết là 2 lần.

Từ các kết quả thu được, nghiên cứu đề xuất quy trình xử lý mẫu quả thể nấm *C. militaris* như sau: cân chính xác 0,2 g bột mẫu thử (qua rây số 180 và đã xác định độ ẩm) vào bình tam giác dung tích 50 ml. Thêm 10 ml nước, tiến hành chiết siêu âm trong 60 phút (công suất 250 w, tần số 50 kHz, nhiệt độ phòng), sau đó để yên 10 phút, lọc qua giấy lọc vào bình định mức 25 ml. Thêm tiếp 10 ml nước vào phần bã dược liệu, siêu âm trong 60 phút, sau đó để yên 10 phút và lọc tiếp dịch chiết vào bình định mức 25 ml, bổ sung đến vạch mức bằng nước, lắc đều, thu được dung dịch mẫu thử. Dung dịch mẫu thử được lọc qua màng lọc 0,22 µm trước khi tiêm vào hệ thống phân tích HPLC-DAD.

Kết quả thẩm định phương pháp phân tích

Độ đặc hiệu của phương pháp: Tiến hành phân tích dung dịch chuẩn, dung dịch mẫu thử (dịch chiết từ quả thể nấm theo quy trình xử lý mẫu đã lựa chọn), dung dịch mẫu trắng (nước cất hai lần đã deion) với các điều kiện sắc ký đã tối ưu hóa được. Kết quả nghiên cứu cho thấy, tín hiệu pic của pentostatin cân đối, sắc nhọn và tách tốt trên nền mẫu thử. Bên cạnh đó, hệ số chồng phủ (Match ratio) của pentostatin mẫu thử so với mẫu chuẩn đều lớn hơn 0,999 (hình 5), đạt yêu cầu theo quy định của AOAC và ICH [12, 15]. Điều này chứng tỏ phương pháp xây dựng đáp ứng yêu cầu về độ đặc hiệu để định lượng pentostatin trong mẫu quả thể nấm *C. militaris*.

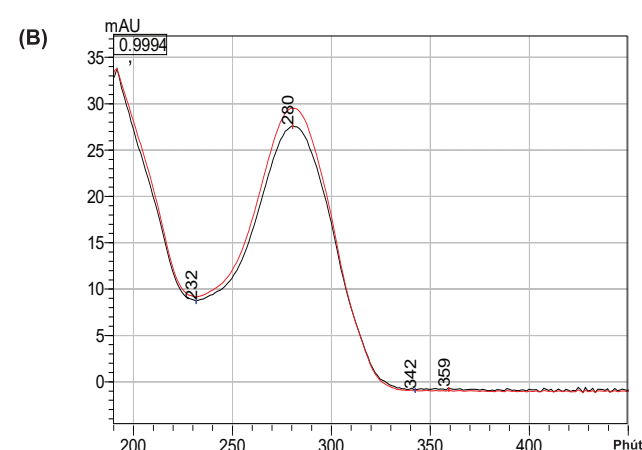


Tính thích hợp của hệ thống: Để đánh giá tính thích hợp của hệ thống, nghiên cứu tiến hành chạy sắc ký 6 lần dung dịch chuẩn pentostatin có nồng độ 62,5 µg/ml với điều kiện đã khảo sát và ghi lại thời gian lưu và diện tích pic tương ứng. Kết quả cho thấy, các giá trị độ lệch chuẩn tương đối của diện tích pic và thời gian lưu của pentostatin đều nhỏ hơn 2% (bảng 5), đạt yêu cầu so với quy định của AOAC và ICH [12, 15]. Như vậy, các điều kiện sắc ký đã lựa chọn và hệ thống HPLC sử dụng là phù hợp và đảm bảo độ ổn định của phép phân tích định lượng pentostatin.

Bảng 5. Kết quả đánh giá tính thích hợp của hệ thống.

Thứ tự	Thời gian lưu (t _R , phút)	Diện tích pic (S, mAu.s)
1	7,295	987858
2	7,264	992476
3	7,206	977008
4	7,226	981756
5	7,346	1002169
6	7,186	985889
Trung bình	7,254	987859,3
Độ lệch chuẩn (SD)	0,060	8774,560
Độ lệch chuẩn lặp lại (RSD)	0,826	0,888

Độ lặp lại trong ngày và độ lặp lại khác ngày: Đánh giá độ lặp lại trong ngày (ngày 1) được xác định dựa trên kết quả xác định hàm lượng pentostatin của 6 lần chiết và phân tích mẫu thử độc lập (ký hiệu mẫu M1-M6). Độ lặp lại khác ngày (ngày 2) được xác định dựa trên kết quả phân tích hàm lượng pentostatin của 6 lần lặp lại cùng mẫu thử đã phân tích trong ngày 1 (ký hiệu M7-M12). Tiến hành xử lý mẫu và phân tích bằng phương pháp HPLC theo các điều kiện đã tối ưu hóa. Kết quả phân tích ở bảng 6 cho thấy, các giá trị độ lệch chuẩn lặp lại tương đối (% RSD) trong ngày và khác ngày của pentostatin đều đạt yêu cầu theo quy định của AOAC (RSD% < 3,7% ứng với mức hàm lượng 0,1% và RSD% < 2,7% ứng với mức hàm lượng 1%) [15]. Như vậy, phương pháp phân tích có độ lặp lại đạt yêu cầu đối với pentostatin.



Hình 5. Sắc ký đồ đánh giá tính chọn lọc của phương pháp. (A) Sắc ký đồ HPLC-DAD; (B) So sánh phổ UV của pentostatin trong mẫu thử và mẫu chuẩn.

Bảng 6. Kết quả đánh giá độ lặp lại của phương pháp.

Mẫu	m (mg)	Hàm lượng pentostatin (%)
M1	0,2012	0,271
M2	0,2003	0,275
M3	0,2005	0,274
M4	0,2091	0,268
M5	0,2019	0,273
M6	0,2009	0,277
M7	0,2001	0,278
M8	0,2090	0,273
M9	0,2009	0,267
M10	0,2003	0,272
M11	0,2045	0,273
M12	0,2090	0,282
Trung bình (n=6)		0,273
Trung bình (n=12)		0,274
RSD (n=6)		1,143
RSD (n=12)		1,516

Giới hạn phát hiện (LOD) và giới hạn định lượng (LOQ): Phân tích mẫu thử đã được xác định nồng độ pentostatin, sau đó pha loãng dần đến khi trên sắc k đồ của dung dịch thử, tại thời gian lưu của pentostatin, xác định được tỷ lệ S/N=3-4 và S/N=10. Từ đó, nghiên cứu xác định được LOD và LOQ của pentostatin lần lượt là 1,5 và 5,0 µg/ml.

Độ đúng: Độ đúng được đánh giá thông qua hiệu suất thu hồi và được xác định bằng phương pháp thêm chất chuẩn pentostatin vào mẫu quả thể nấm *C. militaris* với 3 mức thêm chuẩn (50, 100 và 150% so với lượng chất pentostatin xác định được trong mẫu thực). Sau đó, tiến hành xử lý mẫu theo quy trình đã trình bày ở trên. Phân tích mẫu quả thể nấm *C. militaris* không thêm chuẩn, từ đó xác định lượng pentostatin tìm lại được và kết quả trình bày trong bảng 7.

Bảng 7. Kết quả đánh giá độ đúng của phương pháp.

Mẫu	Nồng độ thêm chuẩn theo lý thuyết (mg/ml)	Nồng độ thêm chuẩn tìm lại được (mg/ml)	Hiệu suất thu hồi (%)
Thêm chuẩn mức 50% (1)	11,00	10,35	94,09
Thêm chuẩn mức 50% (2)	11,00	10,38	94,32
Thêm chuẩn mức 50% (3)	11,00	10,51	95,56
Thêm chuẩn mức 100% (1)	22,00	23,27	105,78
Thêm chuẩn mức 100% (2)	22,00	22,27	101,21
Thêm chuẩn mức 100% (3)	22,00	22,37	101,66
Thêm chuẩn mức 150% (1)	34,00	35,48	104,34
Thêm chuẩn mức 150% (2)	34,00	34,84	102,47
Thêm chuẩn mức 150% (3)	34,00	35,25	103,68

Hiệu suất thu hồi của pentostatin ứng với 3 mức thêm chuẩn khác nhau (50, 100 và 150% so với hàm lượng thực tế của pentostatin có trong mẫu thử) xác định được trong khoảng 94,09-105,78%. Theo hướng dẫn của AOAC trên nền mẫu thực phẩm, với mức hàm lượng trên 0,1% thì độ thu hồi cần đạt 95-105% [15]. Theo quy định về độ thu hồi của Hội đồng châu Âu, với mức hàm lượng trên 0,1% thì hiệu suất thu hồi cần đạt 80-110% [14]. Từ các kết quả thu được, chứng tỏ phương pháp xây dựng có độ đúng cao và có thể áp dụng để phân tích định lượng pentostatin trong mẫu nấm đông trùng.

Định lượng pentostatin trong một số mẫu quả thể nấm *C. militaris*

Sử dụng phương pháp đã xây dựng, nghiên cứu này đã tiến hành xác định hàm lượng pentostatin trong một số mẫu quả thể của các chủng nấm *C. militaris* khác nhau bao gồm *C. militaris* SH03, TN01, HL13 và HN01. Các chủng nấm trên đều đã được định danh tới loài và xác định hàm lượng cordycepin trong quả thể [10]. Tuy nhiên, chưa được xác định hàm lượng pentostatin trong quả thể. Kết quả xác định hàm lượng pentostatin trong các mẫu quả thể nghiên cứu được thể hiện trong bảng 8. Các mẫu quả thể nghiên cứu đều cho hàm lượng pentostatin trong quả thể đạt 0,224-0,315%, tương đương với các chủng trên thế giới đã công bố [7]. Tuy nhiên, đây là nghiên cứu đầu tiên xác định hàm lượng pentostatin trong quả thể nấm *C. militaris* nuôi trồng tại Việt Nam.

Bảng 8. Kết quả phân tích pentostatin trong một số mẫu quả thể nấm *C. militaris* (n=3).

Mẫu quả thể chủng nấm	Hàm lượng pentostatin (%)
<i>C. militaris</i> SH03	0,271±0,003
<i>C. militaris</i> TN01	0,224±0,002
<i>C. militaris</i> HL13	0,253±0,004
<i>C. militaris</i> HN01	0,315±0,002

Kết luận

Nghiên cứu đã phát triển được phương pháp HPLC-DAD định lượng pentostatin trong quả thể nấm *C. militaris*. Một số điều kiện xử lý mẫu đã được lựa chọn gồm: dung môi chiết là nước, phương pháp chiết siêu âm trong khoảng thời gian 60 phút, chiết lặp lại 2 lần cho kết quả phân tích hàm lượng pentostatin trong mẫu thử là ổn định và đạt giá trị cao nhất (0,27%). Phương pháp xây dựng đã được thẩm định theo hướng dẫn của ICH và AOAC về tính thích hợp của hệ thống, độ đặc hiệu, độ lặp lại, giới hạn phát hiện, giới hạn định lượng và độ đúng. Giới hạn phát hiện, giới hạn định lượng của pentostatin lần lượt là 1,5 và 5,0 µg/ml. Hiệu suất thu hồi của pentostatin xác định được trong khoảng 94,09-105,78%.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu này được thực hiện với sự hỗ trợ về kinh phí từ đề tài của Bộ Khoa học và Công nghệ: Ứng dụng kỹ thuật di truyền trong chọn giống nấm *Cordyceps militaris* mang đơn gen giới tính có năng suất và chất lượng cao phục vụ phát triển một số sản phẩm thực phẩm bảo vệ sức khỏe. Nhóm tác giả xin trân trọng cảm ơn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] S.K. Das, M. Masuda, A. Sakurai, M. Sakakibara (2010), "Medicinal uses of the mushroom *Cordyceps militaris*: Current state and prospects", *Fitoterapia*, **81(8)**, pp.961-968.
- [2] Chinese Pharmacopoeia Commission (2015), *Pharmacopoeia of The People's Republic of China*, China Medical Science Press, 293pp.
- [3] L. Huang, Q. Li, Y. Chen, et al. (2009), "Determination and analysis of cordycepin and adenosine in the products of *Cordyceps* spp", *African Journal of Microbiology Research*, **3(12)**, pp.957-961.
- [4] Nguyễn Thị Liên Thương, Nguyễn Văn Hiệp, Trịnh Diệp Phương Danh (2016), "Nấm đông trùng hạ thảo *Cordyceps militaris*: Đặc điểm sinh học, giá trị dược liệu và các yếu tố ảnh hưởng đến quá trình nuôi trồng nấm", *Tạp chí Khoa học, Trường Đại học Cần Thơ*, **44**, tr.9-22.
- [5] U.B. Shrestha, K.S. Bawa (2014), "Economic contribution of Chinese caterpillar fungus to the livelihoods of mountain communities in Nepal", *Biological conservation*, **177**, pp.194-202.
- [6] J.Y. Wu, H.P. Leung, W.Q. Wang, C. Xu (2014), "Mycelial fermentation characteristics and anti-fatigue activities of a Chinese caterpillar fungus, *Ophiocordyceps sinensis* strain Cs-HK1 (Ascomycetes)", *International Journal of Medicinal Mushrooms*, **16(2)**, pp.105-114.
- [7] Y. Xia, F. Luo, Y. Shang (2017), "Fungal cordycepin biosynthesis is coupled with the production of the safeguard molecule pentostatin", *Cell Chemical Biology*, **24(12)**, pp.1479-1489.
- [8] A. Sarvaria, Z. Topp, A. Saven (2016), "Current therapy and new directions in the treatment of hairy cell leukemia a review", *JAMA Oncology*, **2(1)**, pp.123-129.
- [9] Phan Lê Hiền, Hà Minh Hiền (2019), "Nghiên cứu xây dựng quy trình định lượng cordycepin trong đông trùng hạ thảo *Cordyceps militaris* bằng phương pháp HPLC", *Tạp chí Dược học*, **59(3)**, tr.20-23.
- [10] Vũ Xuân Tạo, Trần Bảo Trâm, Nguyễn Thị Mên và cs (2022), "Nghiên cứu xác định gen giới tính MAT, năng suất và hàm lượng cordycepin của một số chủng nấm dược liệu *Cordyceps militaris* đang được nuôi trồng tại Việt Nam", *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Việt Nam*, **64(7)**, tr.60-64.
- [11] C.H. Yoo, M.A. Sadat, W. Kim, et al. (2022), "Comprehensive transcriptomic analysis of *Cordyceps militaris* cultivated on germinated soybeans", *Mycobiology*, **50(1)**, pp.1-11.
- [12] Guideline of ICH Harmonised Tripartite (2005), *Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology*, International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use.
- [13] X. Zhao, G. Zhang, C. Li, J. Ling (2019), "Cordycepin and pentostatin biosynthesis gene identified through transcriptome and proteomics analysis of *Cordyceps kyushuensis* Kob", *Microbiological Research*, **218**, pp.12-21.
- [14] Trần Cao Sơn, Phạm Xuân Đà, Lê Thị Hồng Hào, Nguyễn Thành Trung (2010), *Thẩm định phương pháp trong phân tích hóa học và vi sinh vật*, Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật, 103tr.
- [15] AOAC International (2007), *How to Meet ISO 17025 Requirements for Method Verification, USA*, <https://www.aoac.org/wp-content/uploads/2019/09/ALACC-method-verification.pdf>, accessed March 23, 2023.
- [16] Nguyễn Văn Hân (2017), *Kỹ thuật chiết xuất dược liệu*, Nhà xuất bản Y học, 133tr.