

Bằng các phương pháp phổ nghiệm như UV-Vis, IR, NMR, điểm chảy và đo độ tinh khiết trên máy phân tích nhiệt DSC chúng tôi đã xây dựng bộ dữ liệu chuẩn để xác định cấu trúc curcumin.

Định lượng curcumin bằng HPLC trên cột pha đảo RP 18 cho hàm lượng $96,38\% \pm 0,136$ so với chất chuẩn curcumin USP đạt yêu cầu chất lượng của nguyên liệu đối chiếu.

Hợp chất curcumin đang tiếp tục theo dõi để ổn định để thiết lập chất chuẩn chiết từ dược liệu, phục vụ công tác kiểm nghiệm thuốc đông dược các sản phẩm có nguồn gốc dược liệu

Summary

A procedure for isolation of curcumin from the *Rhizoma Curcuma longae* by ultrasonic extraction with ethanol was reported. The curcuminoid residues were separated by column-chromatography (on silica gel) and preparative HPLC with RP-18 column. The pure curcumin was identified by UV, IR, melting point and NMR spectroscopic data. The impurity of the obtained compound was determined by DSC. The content of curcumin was 96.4% by HPLC in comparison with the reference Curcumin of USP. The product is under a further

study of the stability for use as a reference standard for quality control of the products containing curcumin.

Keyword: *Rhizoma Curcuma longae*, curcumin, demethoxycurcumin

Tài liệu tham khảo

1. Võ Văn Chi, *Từ điển cây thuốc Việt Nam*, NXB Y học, Tp. Hồ Chí Minh, (1996).
2. M.T. Huang, R.C. Smart, C.Q. Wong, A.H. Conney, *Cancer Res.*, (1988) 48, 5941
3. B. B. Aggarwal, A. Kumar, A. C. Bharti. *Anticancer Res.* (2003) Jan-Feb; 23(1A), 363 - 98
4. Q. A.Eliseo; D. A. Joaquin. Method for obtaining apolar and polar extracts of curcuma and applications thereof. *United States Patent* 6440468.
5. V. G. Gaikar, D. V. Dandekar: Process for extraction of curcuminoids from curcuma species. *United States Patent* 6224877.
6. Trần Trung Kiên, NghiêM Xuân Sơn, Phùng Lan Hương, Phạm Văn Thiêm, Nghiên cứu tách curcumin từ củ nghệ vàng bằng phương pháp trích ly siêu âm, *Tạp chí hoá học*, (2007) T. 45, 52 - 57
7. L. Peret-Almeida, A.P.F. Cherubino, R.J. Alves, L. Dufosse, M.B.A. Gloria, Separation and determination of physico-chemical characteristics of curcumin, demethoxycurcumin and bisdemethoxycurcumin, *Food Research International* (2005) 38, 1039-1044.

Xác định hoạt chất *ent*-kauran diterpenoid trong cây khổ sâm Bắc Bộ (*Croton tonkinensis* Gagnep., Euphorbiaceae) bằng sắc ký lỏng hiệu năng cao

Phan Minh Giang, Phan Tổng Sơn

Khoa Hoá học, Trường đại học Khoa học Tự nhiên,
Đại học Quốc gia Hà Nội

Đặt vấn đề

Cây khổ sâm Bắc Bộ (*Croton tonkinensis* Gagnep., Euphorbiaceae) được dùng phổ biến trong y học dân gian của Việt Nam. Lá cây khổ sâm Bắc Bộ dùng chữa ung nhọt, lở loét, viêm mũi, đau bụng, tiêu hóa kém, lỵ và viêm loét da dày tá tràng^[1] Một số thành phần *ent*-kauran

diterpenoid chính đã được phát hiện trong lá cây khổ sâm Bắc Bộ^[2-5] Các hoạt tính sinh học liên quan đến nhóm hợp chất này bao gồm kháng ký sinh trùng sốt rét *Plasmodium falciparum*, kháng khuẩn đặc biệt là kháng chủng kháng sinh *Staphylococcus aureus* và kháng nấm, chống viêm và chống ung thư^[6-9]

Chất *ent*-18-acetoxy-7 β -hydroxykaur-16-en-15-on (1) là hoạt chất có hàm lượng lớn nhất trong lá cây khổ sâm Bắc Bộ; chất này có thể được phân lập lượng lớn cho các ứng dụng thực tiễn làm thuốc chống viêm và dự phòng ung thư. Để có thể xác định nhanh hàm lượng chất này trong các nguyên liệu thực vật một phương pháp nhanh, hiệu quả và có độ lặp lại tốt sử dụng sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) với cột tách pha đảo (RP) đã được xây dựng trong nghiên cứu này.

Nguyên liệu và phương pháp

Nguyên liệu

Mẫu lá cây khổ sâm Bắc Bộ (*Croton tonkinensis* Gagnep., Euphorbiaceae) được thu thập tại Mỹ Đức (Hà Tây cũ). Lá cây được hong khô trong bóng râm, sấy ở 40°C, sau đó được xay thành bột mịn. Mẫu chuẩn *ent*-18-acetoxy-7 β -hydroxykaur-16-en-15-on (1) đã được phân lập từ phần chiết MeOH bột lá khô cây khổ sâm Bắc Bộ theo một qui trình phân tách bao gồm: i) phân bố hai pha lỏng phần chiết MeOH vào các lớp *n*-hexan và CH₂Cl₂; ii) phân tách phần chiết gộp *n*-hexan và CH₂Cl₂ bằng sắc ký cột trên silica gel (cỡ hạt 63-200 mm, Merck, Đức) với gradient *n*-hexan-EtOAc; và iii) tinh chế chất 1 thô nhận được bằng cột Sephadex LH-20 (Pharmacia, Thụy Điển) với MeOH. Chất 1 được nhận dạng và kiểm tra độ tinh khiết (> 98%) bằng các phương pháp TLC, HPLC, MS và NMR^[2]. Dung môi MeOH loại HPLC (Merck) và nước cất hai lần được sử dụng cho phân tích.

Thiết bị sắc ký

Hệ thống sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) Agilent 1100 series HPLC-DAD (Agilent Technology, Hoa Kỳ) bao gồm bơm G1311A, detector G1315A Diode Array Detector (DAD), manual sampler 7725i và loop mẫu 20 μ l. Phân tích được thực hiện trên cột sắc ký Lichrospher RP-18 (cỡ hạt 5 μ m, 4,0 mm \times 250 mm) và cột bảo vệ C18 (cỡ hạt 5 μ m, 4,6 mm \times 7,5 mm) (Agilent Technology). Kiểm soát hệ thống sắc ký và xử lý số liệu được thực hiện với phần mềm Hewlett Packard ChemStation.

Điều kiện phân tích sắc ký

Pha động gradient MeOH-H₂O: từ 20% đến 100% MeOH trong 25 phút, sau đó 100% MeOH trong 10 phút. Tốc độ dòng được duy trì ở 1 ml/phút, nhiệt độ cột ở nhiệt độ phòng. Dung

môi sắc ký và các mẫu phân tích được lọc qua màng lọc 0,45 μ m trước khi được đưa vào cột sắc ký. detector DAD được đặt ở các bước sóng λ 210 nm, 240 nm, 254 nm và 360 nm. Mẫu phân tích được chuẩn bị ở nồng độ 10 mg/ml và mẫu chuẩn *ent*-kauran diterpenoid (1) ở nồng độ 1 mg/ml trong dung môi MeOH.

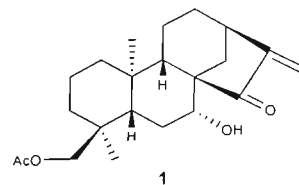
Chuẩn bị mẫu phân tích: điều chế phần chiết methanol

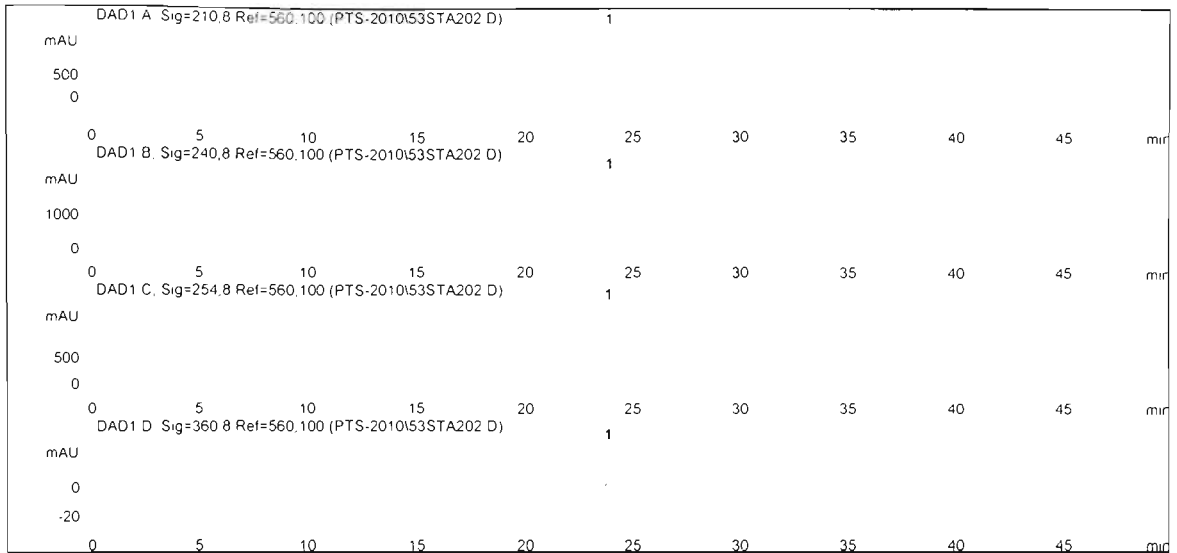
Cân một lượng khoảng 3 g mẫu bột lá khô sâm Bắc Bộ vào bình định mức 50 ml. Thêm 50 ml MeOH (HPLC khan) và chiết bột lá trong 24 giờ ở nhiệt độ phòng. Lọc tách phần dịch lọc và phần bã được chiết tiếp với 50 ml methanol (HPLC khan) trong 24 giờ. Gộp các dịch lọc methanol (lần 1 và lần 2), làm bay hơi dung môi đến mức 3 ml và lọc dịch chiết qua màng lọc HPLC 0,45 μ m (Millipore) cho phân tích HPLC.

Kết quả và bàn luận

Khảo sát tính phù hợp của hệ thống sắc ký

Tính phù hợp được khảo sát để đảm bảo tính lặp lại của thiết bị. Pic của chất 1 trên sắc ký đồ HPLC được xác định bằng cách so sánh thời gian lưu và phổ HPLC-UV với của mẫu chuẩn 1 và co-HPLC với mẫu chuẩn 1. Thử nghiệm được thực hiện bằng cách bơm các dung dịch chất chuẩn 1 (20 μ g/ml) sáu lần trong cùng một ngày (**Bảng 1**: Khảo sát độ lặp lại trong ngày của hệ thống) và hai lần trong cùng một ngày và qui trình phân tích được lặp lại trong 3 ngày liên tiếp (ngày 1, ngày 2 và ngày 3) (**Bảng 2**: Khảo sát độ lặp lại khác ngày của hệ thống) ở λ 210 nm. Kết quả khảo sát độ lặp lại trong ngày cho thấy hệ thống sắc ký có độ lệch chuẩn tương đối (RSD) của thời gian lưu (0,205%) và diện tích pic (1,877%) < 2% đáp ứng yêu cầu phân tích. Kết quả khảo sát độ lặp lại khác ngày cho thấy hệ thống sắc ký có RSD của thời gian lưu (0,052) và diện tích pic (0,809) < 2% đáp ứng yêu cầu phân tích. Sắc ký đồ HPLC tiêu biểu của chất chuẩn 1 được đưa ra ở **Hình 1**.





Hình 1: Sắc ký đồ RP-HPLC của chất 1 (ở thời gian lưu 23,907 phút) (DAD1 A: λ 210 nm, DAD1 B: λ 240 nm, DAD1 C: λ 254 nm, DAD1 D: λ 360 nm)

Bảng 1: Khảo sát độ lặp lại trong ngày của hệ thống

STT	Thời gian lưu (phút)	Diện tích pic
1	23,941	4097,5
2	23,829	4211,4
3	23,948	4005,5
4	23,947	4075,1
5	23,923	4082,8
6	23,964	4138,6
Trung bình	23,925	4101,8
RSD (%)	0,205	1,877

Bảng 2: Khảo sát độ lặp lại khác ngày của hệ thống

Ngày	STT	Thời gian lưu (phút)	Diện tích pic
1	1	23,958	4434,70
	2	23,923	4280,20
	Trung bình	23,940	4357,45
2	3	23,974	4323,70
	4	23,942	4268,20
	Trung bình	23,958	4295,95
3	5	23,981	4320,90
	6	23,949	4275,00
	Trung bình	23,965	4297,95
	Trung bình	23,954	4317,12
	RSD (%)	0,052	0,809

Khảo sát độ tuyến tính

Để đánh giá độ tuyến tính giữa nồng độ và diện tích pic bốn dung dịch chuẩn của chất 1 ở

các nồng độ 50 $\mu\text{g/ml}$, 100 $\mu\text{g/ml}$, 200 $\mu\text{g/ml}$ và 500 $\mu\text{g/ml}$. Mỗi nồng độ mẫu chất 1 được bơm hai lần (50 μl) và diện tích pic được lấy giá trị trung bình. Sự phụ thuộc tuyến tính giữa nồng độ và diện tích pic (λ 210 nm) đã được xác định bằng phương trình hồi quy. $y = 70.30449x + 806.63608$, trong đó: y là diện tích pic, x là nồng độ của chất 1 theo $\mu\text{g/ml}$. Giá trị hệ số tương quan $R^2 = 0,99777$ cho thấy sự tuyến tính của nồng độ và diện tích pic trong khoảng nồng độ 50 đến 500 $\mu\text{g/ml}$.

Giới hạn phát hiện (LOD) và Giới hạn định lượng (LOQ)

Các giới hạn phát hiện (LOD) và định lượng (LOQ) được xác định dựa trên dãy các nồng độ pha loãng của dung dịch chuẩn của chất 1 thấp nhất (10 $\mu\text{g/ml}$). Giới hạn phát hiện và giới hạn định lượng được xác định là lượng chất cần thiết để tạo ra một tỷ lệ tín hiệu/nhiều nền (S/N) tương ứng ít nhất là ba lần (S/N = 3) hoặc 10 lần (S/N = 10). Các giá trị LOD và LOQ của chất 1 đã được xác định là 8,79 $\mu\text{g/ml}$ và 29,01 $\mu\text{g/ml}$.

Xác định độ đúng của phương pháp

Thử nghiệm độ hồi phục được thực hiện để đánh giá độ đúng của phương pháp. Lượng chính xác chất chuẩn 1 (100 μg) được thêm vào 1 ml dịch chiết có nồng độ xác định chất 1 (105,57 $\mu\text{g/ml}$) để tạo dung dịch phân tích. Phân tích định lượng HPLC được thực hiện ba lần ở λ 210 nm. Nồng độ chất 1 trong dung dịch

có thêm chuẩn được xác định và % thu hồi chất 1 được tính toán (Bảng 3). Kết quả cho thấy tỷ lệ thu hồi của chất 1 cao đạt 96,86% cho thấy phương pháp có độ đúng và khả năng tìm lại tốt chất 1 trong các mẫu phân tích.

Bảng 3: Khảo sát độ đúng của phương pháp

STT	Nồng độ chất 1 tìm thấy (µg/ml)	Lượng chất 1 tìm lại (µg)	Tỷ lệ thu hồi (%)
1	214,510	98,940	98,940
2	210,640	95,070	95,070
3	212,150	96,580	96,580
Trung bình	212,433	96,863	96,863
RSD (%)	0,009	0,020	0,020

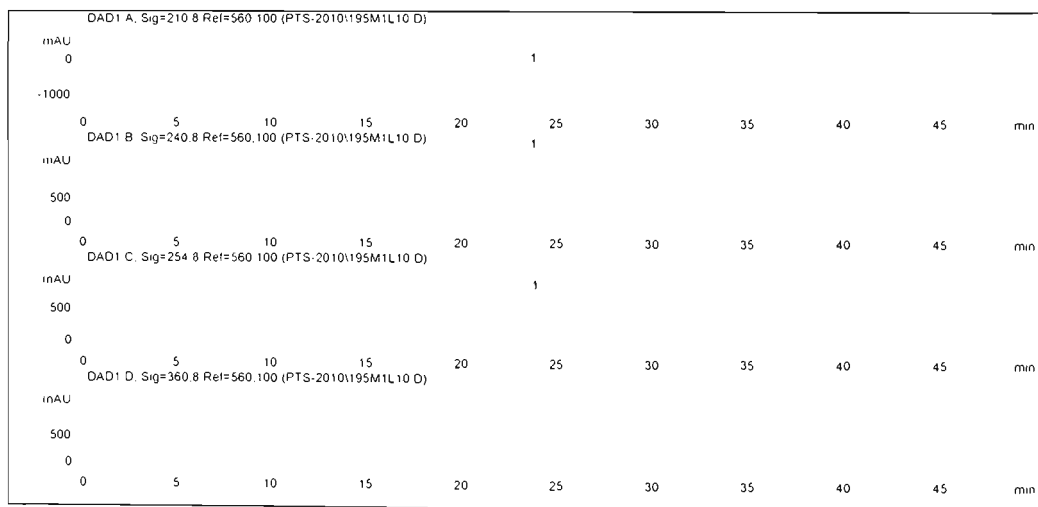
Xác định độ lặp lại của phương pháp

Sử dụng phương pháp HPLC nêu trên để phân tích định lượng chất 1 trong ba mẫu phần chiết MeOH lá cây khổ sâm Bắc Bộ. Phân tích định lượng HPLC được thực hiện ba lần cho mỗi mẫu phân tích ở λ 210 nm. Nồng độ chất 1 trong dung dịch đã được xác định (Bảng 4) và độ lặp lại của phương pháp được đánh giá qua giá trị RSD. Các kết quả cho thấy các giá trị RSD ở mỗi lần phân tích < 2%. Giá trị nồng độ trung bình

của 3 lần phân tích là 113,05 µg/ml với RSD là 1,746 < 2% cho thấy phương pháp định lượng có độ lặp lại tốt giữa các lần phân tích. Sắc ký đồ HPLC tiêu biểu của phần chiết MeOH lá cây khổ sâm Bắc Bộ được đưa ra ở Hình 2.

Bảng 4: Khảo sát độ lặp lại của phương pháp

Mẫu (g)	STT	Thời gian lưu (phút)	Nồng độ (µg/ml)
1 (3,0824 g)	1	23,854	117,800
	2	23,845	113,480
	3	23,862	115,440
	Trung bình	23,854	115,573
	RSD	0,036	1,872
2 (3,0142 g)	1	23,871	109,870
	2	23,846	114,310
	3	23,864	112,640
	Trung bình	23,860	112,273
	RSD	0,054	1,997
3 (3,0115 g)	1	23,906	112,420
	2	23,869	111,940
	3	23,885	109,570
	Trung bình	23,887	111,310
	RSD	0,077	1,371



Hình 2: Sắc ký đồ RP-HPLC một mẫu phần chiết lá MeOH (chất 1 ở 23,854 phút)
(DAD1 A: λ 210 nm, DAD1 B: λ 240 nm, DAD1 C: λ 254 nm, DAD1 D: λ 360 nm)

Kết luận

Một phương pháp RP-HPLC nhanh và chính xác đã được xây dựng để định lượng hoạt chất chính ent-18-acetoxy-7β-hydroxykaur-16-en-15-on (1) trong lá cây khổ sâm Bắc Bộ. Độ tuyến tính, độ đúng và độ lặp lại của phương pháp

cho thấy tính khả dụng của phương pháp trong phân tích chất 1 trong các nguyên liệu thực vật.

Summary

A time-saving and precise RP-HPLC method was developed for the quantitative determination of the main biologically active ent-18-acetoxy-

7 -hydroxykaur-16-en-15-on (1) in the leaves of *Croton tonkinensis* Gagnep. The method was validated for the linearity, accuracy, and precision, proved applicable to the analysis of the compound (1) in plant materials.

Keywords: *Croton tonkinensis*; ent-Kaurane; HPLC; Analysis.

Tài liệu tham khảo

1. Võ Văn Chi, Từ điển cây thuốc Việt Nam, NXB Y học, Thành phố Hồ Chí Minh (1997).

2. Phan Tong Son, Phan Minh Giang, Walter C. Taylor, An ent-kaurane-type diterpenoid from *Croton tonkinensis* Gagnep., *Aust. J. Chem.* (2000), 53, 1003-1005.

3. Phan Minh Giang, Jin H. Z., Phan Tong Son, Lee J. H., Hong Y. S., Lee J. J., ent-Kaurane diterpenoids from *Croton tonkinensis* inhibit LPS-induced NF- κ B activation and NO production, *J. Nat. Prod.* (2003), 66, 1217-1220.

4. Phan Minh Giang, Phan Tong Son, Lee J. J., Otsuka H., Four ent-kaurane-type diterpenoids from *Croton tonkinensis* Gagnep., *Chem. Pharm. Bull.* (2004), 52, 879-882.

5. Phan Minh Giang, Phan Tong Son, Hamada Y., Otsuka H., Cytotoxic diterpenoids from Vietnamese medicinal plant *Croton tonkinensis* Gagnep., *Chem. Pharm. Bull.* (2005), 53, 296-300.

6. Phan Tổng Sơn, Văn Ngọc Hương, Phan Minh Giang, Walter C. Taylor, Đóng góp vào việc nghiên cứu hoạt chất sinh học từ cây khổ sâm cho lá (*Croton tonkinensis* Gagnep., Euphorbiaceae), *Tạp chí Hoá học* (1999), 37, 1-2

7. Phan Minh Giang, Phan Tong Son, Walter C. Taylor, A new diterpenoid with antimalarial activity from *Croton tonkinensis* Gagnep. of Vietnam, The Tenth Asian Symposium on Medicinal Plants, Spices and Other Natural Products (ASOMPS X), Dhaka, Bangladesh, 18-23/11/2000, 162.

8. Phan Tổng Sơn, Lê Huyền Trâm, Phan Minh Giang, Đóng góp vào việc nghiên cứu thành phần hoá học và hoạt tính sinh học cây khổ sâm cho lá (*Croton tonkinensis* Gagnep., Euphorbiaceae), *Tạp chí Hoá học* (2002), 40, 53-57.

9. Phan Minh Giang, Phan Tong Son, Matsunami K., Otsuka H., Anti-staphylococcal activity of ent-kaurane-type diterpenoids from *Croton tonkinensis*, *J. Nat. Med.* (2006), 60, 93-95.

Nghiên cứu tác động của 3-monochloropropan-1,2-diol (3-MCPD) trên quá trình đông máu

Ngô Kiến Đức, Nguyễn Văn Thanh, Trần Mạnh Hùng

Khoa Dược, ĐHY Dược TP Hồ Chí Minh

Đặt vấn đề

3-MCPD được hình thành do kết quả của quá trình phản ứng giữa chất béo (triglycerid) với một nguồn có chứa chlor (Cl) trong thực phẩm (ví dụ: muối ăn, hay acid chlorhydric) hoặc phản ứng với một thành phần nào đó trong thực phẩm dưới sự xúc tác của nhiệt độ (chiên, nướng ...) [1]. Tùy loại thực phẩm cũng như thời gian, nhiệt độ chế biến mà lượng 3-MCPD được tạo ra là nhiều hay ít. Về lý thuyết thì tất cả những chất nào hội tụ đủ 3 điều kiện: "có chứa thành phần chlorin + chất béo + nhiệt" đều có thể sản sinh ra 3-MCPD. Ngoài ra, quá trình thủy phân protein thực vật bằng acid hydrochloric (HCl) trong sản xuất nước tương còn là nguồn phổ biến tạo ra độc tố 3-MCPD [5]

Các nghiên cứu trên động vật cho thấy, 3-MCPD là chất có tiềm năng gây ung thư trên nhiều cơ quan khác nhau ở chuột cống chủng F344 [6,7]. Nghiên cứu *in vitro* cũng cho thấy 3-MCPD cho kết quả dương tính trên thử nghiệm gây đột biến gen [4,6,8]. Mặc dù đã có rất nhiều nghiên cứu về độc tính của 3-MCPD, tuy nhiên các dữ liệu về độc tính của 3-MCPD trên máu vẫn chưa được đầy đủ. Trong nghiên cứu này, chúng tôi đặt mục tiêu khảo sát độc tính của 3-MCPD trên chuột nhắt sau khi cho uống 3-MCPD trong 6 tháng liên tục với các chỉ tiêu đánh giá là số lượng tiểu cầu và các thông số của quá trình đông máu gồm thời gian chảy máu và thời gian đông máu.