

V. KẾT LUẬN

Phẫu thuật nội soi có thể là lựa chọn an toàn và hiệu quả trong việc điều trị ung thư dạ dày ở các giai đoạn sớm và tiến triển, không có tử vong do mổ

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Kitano S, Iso Y, Moriyama M, et al. Laparoscopy-assisted Billroth I gastrectomy. *Surg Laparosc Endosc* (1994);4:146-8.
2. Trịnh Hồng Sơn, Nguyễn Xuân Hùng, Phạm Thế Anh. Kết quả bước đầu cắt dạ dày với nội soi hỗ trợ trong điều trị tổn thương loét và ung thư dạ dày. *Y học thực hành*, (2007), tập 575+576, 8: 14-17
3. Qi-Yue Chen, Chang-Ming Huang, Jian-Xian Lin, Chao-Hui Zheng, Ping Li, Jian-Wei Xie, Jia-Bin Wang and Jun Lu. Laparoscopy-assisted versus open D2 radical gastrectomy for advanced gastric cancer without serosal invasion: a case

control study. *World Journal of Surgical Oncology* (2012), 10:248

4. H. Noshiro, E. Nagai, S. Shimizu, A. Uchiyama, M. Tanaka Laparoscopically assisted distal gastrectomy with standard radical lymph node dissection for gastric cancer. *Surg Endosc* (2005) 19: 1592-1596
5. Jia-Ming Wei # Norio Shiraishi # Shingo Goto # Kazuhiro Yasuda # Masafumi Inomata# Seigo Kitano Laparoscopy-assisted distal gastrectomy with D1+ b compared with D1+a lymph node dissection. *Surg Endosc* (2008) 22:955-960
6. Ming Cui, Jia-Di Xing, Wei Yang, Yi-Yuan Ma, Zhen-Dan Yao, Nan Zhang, Xiang-Qian Su. D2 dissection in laparoscopic and open gastrectomy for gastric cancer. *World J Gastroenterol*, (2012), 18(8): 833-839
7. Shuji Takiguchi et al. Laparoscopy-Assisted Distal Gastrectomy Versus Open Distal Gastrectomy. A Prospective Randomized Single-Blind Study. *World J Surg* (2013) 37:2379-2386

NGHIÊN CỨU ĐỊNH LƯỢNG MỘT SỐ HOẠT CHẤT NHÓM IRIDOID VÀ PHENOLIC TRONG DƯỢC LIỆU KIM NGÂN BẰNG SẮC KÝ LỎNG HIỆU NĂNG CAO

Chữ Văn Mến*, Nguyễn Duy Bắc*, Đào Đức Long*,
Vũ Bình Dương*, Ngô Sĩ Thịnh**, Nguyễn Đức Thiện***

TÓM TẮT

Kim ngân là một dược liệu chống viêm được dùng phổ biến. Hiệu quả điều trị của Kim ngân phụ thuộc nhiều vào nguồn gốc, do đó việc tiêu chuẩn hóa dược liệu này là rất quan trọng đảm bảo hiệu quả điều trị của thuốc. Trong nghiên cứu này chúng tôi tiến hành định lượng 4 hoạt chất sinh học trong kim ngân gồm có coniferin, acid loganic, swerosid và loganin. Phân tích được tiến hành trên cột C18 với chương trình gradient gồm dung môi A (10% methanol có chứa 0,1% acid formic) và dung môi B (90% methanol có chứa 0,1% acid formic): 0 phút, 0%B; 15 phút, 30% B; 30 phút 70%B; 35 phút 100%B. Tốc độ dòng là 1,0 ml/phút, bước sóng phát hiện là 254 nm. Methyl paraben được dùng làm chuẩn nội. Kết quả chỉ ra rằng hàm lượng của coniferin, acid loganic, swerosid và loganin cao nhất trong các mẫu lần lượt là 0,55; 10,9;

4,22; và 7,08 mg/g và và thấp nhất lần lượt là 0,03; 0,30; 0,37; và 0,02 mg/g.

Từ khóa: Kim ngân, định lượng, HPLC

SUMMARY

STUDY ON THE QUANTITATIVE ANALYSIS OF IRIDOID AND PHENOLIC COMPOUNDS IN LONICERAE FOLIUM ET CAULIS BY HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY

Lonicerae Folium et Caulis is a commonly used anti-inflammatory herbal drug. The therapeutic effectiveness of this drug depends significantly on the geographical origin, hence, the standardization using the chemical characteristics would be very important. In the present study, an HPLC method for simple and effective analysis of four main components like coniferin, acid loganic, swerosid and loganin from the *Lonicerae Folium et Caulis* sample was developed and validated. Four main components were base line separated on a Optimapak C18 column with gradient of mobile phase A(10% methanol containing 0.1%

* Học Viện Quân Y

** Viện Y học Cổ truyền Quân đội

*** Cục Y tế, Bộ Công An

Phản biện khoa học: TS. Nguyễn Văn Bạch

formic acid) and B(90% methanol containing 0.1% formic acid) for 0 min 0%B, 15 min 30%B, 25 min 70%B, 30 min 70%B, 35 min 100%B; 45 min 100%B; 50 min 0%B. The flow rate was 1.0 ml/min and detection was carried out at 254 nm. Methylparaben was used as an internal standard. The quantitation results showed that the highest concentrations of coniferin, acid loganic, swerosid, loganin in the analyzed samples were 0.55, 10.9, 4.22, and 7.08 mg/g and lowest concentrations were 0.03, 0.30, 0.37, and 0.02 mg/g, respectively.

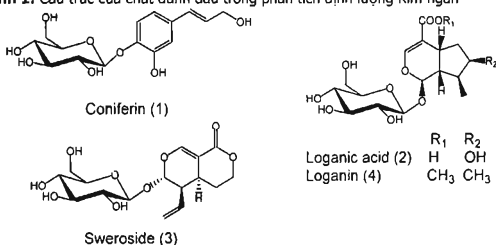
Keywords: Lonicerae Folium, Quantitative analysis, HPLC

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Kim Ngân (*Lonicera japonica*), thuộc họ Cơm cháy (Caprifoliaceae) phân bố chủ yếu ở các nước đông Á như Việt Nam, Trung Quốc, Hàn Quốc và Nhật Bản..., được sử dụng điều trị sưng vú, mụn nhọt, mẫn ngứa, dị ứng trong y học cổ truyền [1]. Các công trình nghiên cứu trước đây đã phân lập được các hoạt chất sinh học thuộc các nhóm phenolic, irldoid, saponin và các

flavonoid với tác dụng chống oxy hóa, chống viêm, chống dị ứng ...[2-10]. Tuy nhiên, thành phần hóa học của kim ngân không ổn định vì sự biến đổi khí hậu, thổ nhưỡng và thời gian thu hái, làm ảnh hưởng đến hàm lượng các hoạt chất và tác dụng dược lý của kim ngân. Ở Việt Nam, kim ngân chủ yếu được nhập khẩu từ Trung Quốc, một số ít từ Hàn Quốc và Nhật Bản. Vì vậy, đánh giá chất lượng toàn diện nguyên liệu kim ngân là cần thiết, góp phần đảm bảo chất lượng thuốc. Trong nghiên cứu này, 60 mẫu kim ngân Trung Quốc và Hàn Quốc đã được định lượng đồng thời các hoạt chất chính mang lại tác dụng sinh học của kim ngân như: coniferin, acid loganic, swerosid và loganin (Hình 1) bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) với detector diode array có khả năng xác định các hợp chất hữu cơ trong hỗn hợp, có tính chọn lọc và chính xác cao, phù hợp cho việc phân tích các hoạt chất trong dược liệu và cao thực vật.

Hình 1: Cấu trúc của chất đánh dấu trong phân tích định lượng Kim ngân



II. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Hoá chất và thiết bị

- Nội chuẩn: methyl paraben
- Chất chuẩn: coniferin, acid loganic, swerosid, và loganin được chiết xuất, phân tách, tinh chế và xác định cấu trúc.
- Methanol: dùng cho sắc ký lỏng, acid formic (Merck)
- Máy sắc ký lỏng hiệu năng cao: Shimadzu, Detector UV-VIS và Detector diode array được nối với máy tính IBM.

2.2. Mẫu nghiên cứu

Mẫu kim ngân được thu mua ở các nơi khác nhau tại Trung Quốc (T), Hàn Quốc (H) mẫu được lưu tại Đại học Dược, ĐH Quốc gia Chungnam, Hàn Quốc.

2.3. Điều kiện sắc ký

Cột: Cột phân tích pha đảo Optimapak RP18 (250 x 4,6mm; 5µm) của công ty RS tech, Hàn Quốc.

Detector: UV 254 nm

Pha động:

- Dung dịch A: dung dịch methanol 10 % trong dung dịch acid formic 0.1 %.

- Dung dịch B: dung dịch methanol 90% trong dung dịch acid formic 0.1%

- Với chương trình rửa giải như sau:

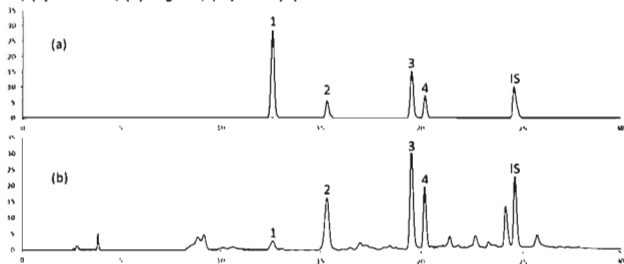
Tốc độ dòng: 1,0 ml/phút; Thể tích tiêm: 10 μ l

Thời gian (phút)	% A	% B
0→15	100 → 70	0 → 30
15→25	70 → 30	30→70
25→30	30	70
30→35	30→0	70→100
35→45	0 → 0	100 →100
45→50	0 → 100	100 →0

III. KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN

Với điều kiện sắc ký và phương pháp xử lý mẫu đã lựa chọn, sắc ký đồ thu được cho các pic tách rõ ràng, nhiễu nền thấp, thể hiện qua sắc ký đồ của mẫu thử được liệu kim ngân (Hình 2b), Trên các sắc ký đồ mẫu thử các pic có thời gian lưu trùng với thời gian lưu của pic coniferin, acid loganic, swerosid, và loganin trong sắc ký đồ của mẫu chuẩn lần lượt là 12,61; 15,34; 19,55; 20,21 (Hình 2a).

Hình 2: Sắc ký đồ và so sánh phổ của mẫu chuẩn (a) và mẫu thử (b); (1):coniferin; (2): acid loganic; (3): swerosid; (4): loganin; (IS): methyl paraben.



Đồng thời, tại thời gian lưu của các pic coniferin, acid loganic, swerosid, và loganin trên các sắc ký đồ thử và chuẩn chúng tôi đã so sánh phổ hấp thụ UV thu được của pic. Kết quả cho thấy phổ thử và chuẩn trùng khít lên nhau với hệ số tương thích lần lượt là 0,9995; 0,9992; 0,9994, và 0,9994. Điều này chứng tỏ pic thu được trên sắc ký đồ của mẫu thử là tinh khiết và các thành phần khác có trong mẫu thử không ảnh hưởng đến quá trình phân tích bốn chất đối

2.4. Chuẩn bị các dung dịch chuẩn và thử

- **Nội chuẩn (IS):** Dung dịch methyl paraben: 1000 μ g/ml trong methanol.

- **Mẫu chuẩn:** Dây các dung dịch chuẩn coniferin, acid loganic, swerosid, và loganin có nồng độ chính xác 5; 10; 25,0; 50,0 và 100,0 μ g/ml trong dung dịch chuẩn nội methyl paraben 200 (μ g/ml) trong methanol.

- **Mẫu thử:** Cân chính xác khoảng 1 g bột dược liệu kim ngân. Thêm chính xác 9 ml ethanol 70% và 1 ml dung dịch chuẩn nội, cân, lắc siêu âm 30 phút, cân lại, bổ sung khối lượng mất bằng ethanol 70%, ly tâm, gạn lấy lớp trên, lọc qua màng lọc 0,45 μ m.

chiều coniferin, acid loganic, swerosid và loganin ở điều kiện sắc ký đã lựa chọn, qua đó cho phép ta tiến hành định tính, định lượng.

3.1. Tính thích hợp của hệ thống sắc ký

Để đánh giá tính thích hợp của hệ thống sắc ký, chúng tôi pha một mẫu chuẩn theo chỉ dẫn ở mục 2.4, tiêm 6 lần mẫu chuẩn vào hệ thống HPLC, tiến hành sắc ký với điều kiện đã lựa chọn. Kết quả khảo sát tính thích hợp của hệ thống được ghi ở Bảng 1.

Bảng 1: Kết quả khảo sát tính thích hợp của hệ thống

Hoạt chất	RSD của thời gian lưu (%)	RSD của diện tích pic (%)	Số đĩa lý thuyết trung bình (N)	Hệ số bất đồng trung bình (T)
Coniferin	0,37	0,79	11300	1,11
acid loganic	0,43	0,87	11200	1,06
swerosid	0,51	0,85	11250	1,15
loganin	0,61	0,98	11300	1,07

Kết quả trên cho thấy các điều kiện sắc ký đã lựa chọn và hệ thống HPLC sử dụng là phù hợp và đảm bảo sự ổn định của phép phân tích định lượng coniferin, acid loganic, swerosid và loganin.

3.2. Khoảng tuyến tính, giới hạn phát hiện và giới hạn định lượng.

Chuẩn bị một dãy gồm 4 dung dịch mẫu chuẩn có nồng độ từ 1,0 µg/ml đến 100 µg/ml, tiến hành sắc ký như điều kiện đã mô tả. Kết quả được thể hiện ở Bảng 2.

Bảng 2: Kết quả khảo sát khoảng tuyến tính, giới hạn phát hiện, giới hạn định lượng

Chất chuẩn	Nồng độ (µg/ml)	Phương trình hồi qui	r ²	LOD (µg/ml)	LOQ (µg/ml)
coniferin (1)	1 ~ 100	Y = 17,01X + 1,45	0,9995	0,56	1,69
acid loganic (2)	1 ~ 100	Y = 2,58X - 0,66	0,9992	0,33	0,99
swerosid (3)	1 ~ 100	Y = 7,23X + 0,01	0,9994	0,66	1,99
loganin (4)	1 ~ 100	Y = 2,88X - 0,18	0,9994	1,10	3,33

Kết quả khảo sát trên cho thấy với khoảng nồng độ của coniferin, acid loganic, swerosid và loganin từ 10 µg/ml đến 200 µg/ml có sự tương quan tuyến tính giữa nồng độ và diện tích pic tương ứng.

Từ phương trình tuyến tính của coniferin, acid loganic, swerosid và loganin cho phép xác định giới hạn phát hiện của các chất lần lượt 0,56; 0,33; 0,66 và 1,10 µg/ml, giới hạn định

lượng của từng chất tương ứng lần lượt 1,69; 0,99; 1,99; và 3,33 µg/ml.

Kết quả khảo sát hàm lượng coniferin, acid loganic, swerosid và loganin có trong 60 mẫu kim ngân được thể hiện trong bảng 3. Kết quả chỉ ra rằng hàm lượng của coniferin, acid loganic, swerosid và loganin cao nhất trong các mẫu lần lượt là 0,55; 10,9; 4,22; và 7,08 mg/g và thấp nhất lần lượt là 0,03; 0,30; 0,37; và 0,02 mg/g.

Bảng 3: Kết quả phân tích định lượng 1, 2, 3 và 4 trong 60 mẫu kim ngân (mg/g)

Mẫu	Nguồn gốc	1	2	3	4	Mẫu	Nguồn gốc	1	2	3	4
1001	HQ	0,16	3,63	4,22	1,89	2015	TQ	0,05	0,93	0,99	0,88
1002	HQ	0,05	1	1,52	1,32	2016	TQ	0,04	0,7	0,79	1,27
1003	HQ	0,2	2,94	2,76	1,36	2017	HQ	0,07	3,27	0,37	1,7
1004	HQ	0,13	2,45	2,22	1,48	2018	TQ	0,07	2,29	0,66	1,71
1005	HQ	0,16	2,97	3,85	1,09	2019	TQ	0,05	1,16	0,74	0,49
1006	HQ	0,17	3,04	1,9	2,76	2020	TQ	0,28	0,30	0,78	5,63
1007	HQ	0,12	3,09	3,46	1,43	2021	TQ	0,5	3,37	0,94	1,25
1008	HQ	0,06	3,55	3,72	0,41	2022	TQ	0,17	3,56	1,79	1,8
1009	HQ	0,05	4,23	3,84	0,67	2023	TQ	0,48	2,61	3,49	1,69
1010	HQ	0,47	4,12	3,17	4,25	2024	TQ	0,08	1,16	1,47	1,23
1011	HQ	0,05	2,98	2,99	0,83	2025	TQ	0,07	1,9	3,27	1,55
1012	HQ	0,14	2,82	2,04	3,18	2026	TQ	0,12	3,86	3,28	3,05
1013	HQ	0,05	1,72	1,66	0,61	2027	TQ	0,07	2,11	0,87	1,73
1014	HQ	0,26	1,63	2,34	0,48	2028	TQ	0,09	10,9	0,49	7,08
1015	HQ	0,04	1,58	0,4	1,19	2029	TQ	0,14	2,03	1,58	4,03
1016	HQ	0,09	2,54	2,45	1,66	2030	TQ	0,15	2,28	1,81	4,11
2001	HQ	0,06	1,04	1,1	0,93	2031	TQ	0,11	1,43	0,57	1,96
2002	HQ	0,05	1,76	2,33	0,64	2032	TQ	0,06	0,69	0,69	0,02
2003	HQ	0,05	1,73	3,77	5,05	2033	TQ	0,43	1,37	1,42	2,47
2004	HQ	0,18	2,92	2,03	3,41	2034	TQ	0,14	1,87	2	3,33
2005	HQ	0,19	3,13	1,68	3,06	2035	TQ	0,13	1,23	2,45	3,21
2006	HQ	0,08	1,46	1,83	0,99	2036	TQ	0,2	2,33	1,51	4,02

2007	HQ	0,14	3,38	1,82	1,61	2037	TQ	0,09	1,25	1,07	0,74
2008	HQ	0,03	0,43	0,64	0,33	2038	TQ	0,14	2,91	2,5	4,68
2009	HQ	0,04	2,25	2,17	1,25	2039	TQ	0,19	3,63	0,38	2,1
2010	HQ	0,05	2,05	1,73	1,5	2040	TQ	0,06	2,67	0,9	2,66
2011	HQ	0,04	2,19	2,1	0,42	2041	TQ	0,03	0,77	0,39	1,05
2012	HQ	0,04	2,76	2,47	0,77	2042	TQ	0,55	3,03	2,21	2,98
2013	TQ	0,05	2,33	0,64	1,06	2043	TQ	0,05	2,48	0,75	1,13
2014	HQ	0,37	3,26	1,87	2,64	2044	TQ	0,55	3,68	3,65	2,91

IV. KẾT LUẬN

Kim Ngân là một dược liệu chống viêm được dùng phổ biến. Hiệu quả điều trị của dược liệu này phụ thuộc vào nguồn gốc phân bố, do đó việc tiêu chuẩn hoá dược liệu dựa trên các hoạt chất sinh học là rất quan trọng. Trong nghiên cứu này, phương pháp HPLC đơn giản và hiệu quả đã được xây dựng và thẩm định để định lượng đồng thời coniferin, acid loganic, swerosid, loganin trong các mẫu Kim Ngân gồm có: cột Optimapak C18; pha động: A(100% methanol có chứa 0,1% formic acid) và B (90% methanol có chứa 0,1 % formic acid); điều kiện rửa rài: 0 phút (0%B); 15 phút(30%B); 25 phút (30%B); 35 phút(100%B); 45 phút (100%B); 50 phút (0%B). Phương pháp được sử dụng để phân tích 60 dược liệu kim ngân Hàn Quốc và Trung Quốc cho thấy hàm lượng cao nhất của các chất lần lượt là 0,55; 10,9; 4,22; và 7,08 mg/g và thấp nhất lần lượt là 0,03; 0,30; 0,37; và 0,02 mg/g.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Đỗ Tất Lợi, "Những Cây Thuốc và Vị Thuốc Việt Nam", Nhà Xuất Bản Y Học, 2004.

- Lee, E. J., Kim, J. S. Kim, H. P., Lee, J. H. and Kang, S. S. Phenolic constituents from the flower buds of *Lonicera japonica* and their 5-lipoxygenase inhibitory activities. *Food Chem.* 120(1), 134~9 (2010).
- Kumar, N., Bhandari, P., Singh, B. and Kaul, V. K. Saponins and volatile constituents from *Lonicera japonica* India. *Nat. Prod. Commun.* 2(6), 633~6 (2007).
- Yu, D. Q., Chen, R. Y., Huang, L. J., Xie, F. Z., Ming, D. S., Zhou, K., Li, H. Y. and Tong, K. M. The structure and absolute configuration of Shuangkangsu: a novel natural cyclic peroxide from *Lonicera japonica* (Thunb.). *J. Asian Nat. Prod. Res.* 10(9), 851~6 (2008).
- Song, W., Li, S., Wang, S., Wu, Y., Zi, J., Gang, M., Zhang, Y., Liu, M., Lin, S., Yang, Y. and Shi, J. Pyridinium Alkaloid-Coupled Secoiridoids from the Flower Buds of *Lonicera japonica*. *J. Nat. Prod.* 71(5), 922~5 (2008).
- Kumar, N., Singh, B., Gupta, A. P. and Kaul, V. K.: Lonijaposides, novel cerebroside: from *Lonicera japonica*. *Tetrahedron* 62(18), 4317~22 (2006).
- Pradhan, D., Panda, P. K., Tripathy, G., Nayak, J. R. and Pattanaik, A. Anticancer activity of biflavonoids from *Lonicera japonica* and *Benincasa hispida* on human cancer cell lines. *Int. J. Pharmacol. Biol. Sci.* 3(1), 59~64 (2009).

NGHIÊN CỨU SỰ THAY ĐỔI NỒNG ĐỘ IL-1 β HUYẾT THANH Ở BỆNH NHÂN ĐÁI THÁO ĐƯỜNG TYP 2

Nguyễn Việt Trung*, Nguyễn Trọng Tài**

TÓM TẮT

Có nhiều cơ chế tham gia vào sự đề kháng insulin làm tăng glucose máu trong bệnh lý đái tháo đường (ĐTĐ) typ 2. Nghiên cứu gần đây cho thấy IL-1 β có vai trò quan trọng trong bệnh sinh bệnh lý này. Nghiên

cứu này tiến hành trên 60 bệnh nhân ĐTĐ typ 2 và 30 người khỏe mạnh. Kết quả nghiên cứu cho thấy: nồng độ IL-1 β huyết thanh bệnh nhân ĐTĐ typ 2 tăng cao rõ rệt so với người khỏe mạnh. Có mối tương quan thuận giữa nồng độ IL-1 β huyết thanh với nồng độ glucose máu lúc đói và tỷ lệ HbA1c ở bệnh nhân ĐTĐ typ 2 ($p < 0,001$).

Từ khóa: IL-1 β , đái tháo đường typ 2, HbA1c

* Bệnh viện 103, Học viện Quân y

** Trường đại học y Vinh

Phân biện khoa học: PGS.TS Nguyễn Linh Toàn