

Định lượng đồng thời các hoạt chất sinh học trong dược liệu Kim ngân (*Linocere Japonica*) bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao

Chủ Văn Mến*; Nguyễn Văn Long*; Nguyễn Tùng Linh*;
Hoàng Văn Lương*; Kang Jeong Seong**

TÓM TẮT

Kim ngân là một dược liệu có tác dụng chống viêm được dùng phổ biến. Hiệu quả điều trị của dược liệu này phụ thuộc vào nguồn gốc phân bố. Trong nghiên cứu này, xây dựng và thẩm định phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) để định lượng đồng thời coniferin, acid loganic, sweroside, loganin trong các mẫu Kim ngân gồm: cột Optimapak C18; pha động: A (10% methanol có chứa 0,1% acid formic) và B (90% methanol có chứa 0,1 % acid formic); điều kiện rửa rửa: 0 phút (0%B); 15 phút (30%B); 25 phút (30%B); 35 phút (100%B); 45 phút (100%B); 50 phút (0%B). Tốc độ rửa rửa là 1,0 ml/phút, bước sóng phát hiện 254 nm. Methyl paraben được dùng làm chất chuẩn nội. Phân tích 60 dược liệu Kim ngân thu mua ở những nơi khác nhau tại Hàn Quốc và Trung Quốc cho thấy hàm lượng cao nhất của các chất lần lượt là 0,55; 1,09; 4,32 và 7,08 mg/g và thấp nhất 0,03; 0,23; 0,02 và 0,02 mg/g.

* Từ khoá: Kim ngân; Hoạt chất sinh học.

Determination of bioactive compounds in *Lonicerae folium et caulis* by high performance liquid chromatography

SUMMARY

Lonicerae Folium et Caulis is a commonly used anti-inflammatory herbal drug. The therapeutic effectiveness of this drug depends significantly on the geographical origin. In the present study, an HPLC method for simple and effective analysis of four main components like coniferin, loganic acid, sweroside 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 linear gradient of mobile phase A (10% methanol containing 0.1% 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 internal standard. The quantitative results showed that: the highest concentrations of coniferin, loganic acid, sweroside, loganin in the analyzed samples were 0.55; 10.09; 4.32; 7.08 mg/g and lowest concentrations were 0.03; 0.23; 0.02; 0.02 mg/g respectively.

* Key words: *Lonicerae Folium et Caulis*; Bioactive compounds.

* Học viện Quân y

** Trường Đại học Chung Nam, Daejeon, Hàn Quốc

Phản biện khoa học: PGS. TS. Nguyễn Văn Minh

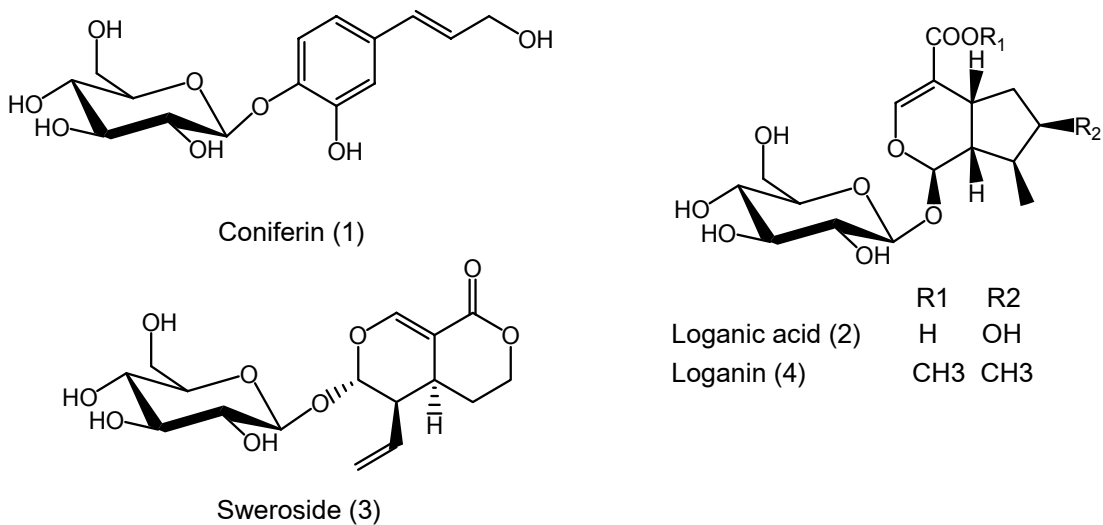
ĐẶT VẤN ĐỀ

Kim ngân (*Linocere 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, mẩn ngứa, dị ứng trong y học cổ truyền [1]

Người ta đã nghiên cứu về thành phần hóa học và tác dụng sinh học của cây Kim ngân và phân lập được các hoạt chất sinh học thuộc nhóm acid phenolic, iridoids, saponin và flavonoids có tác dụng chống oxy hóa, chống viêm, chống dị ứng... [2,10]. Tuy nhiên, thành phần hóa học của Kim ngân không ổn định do 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 các

nước Đông Á như: Trung Quốc, một số ít từ Hàn Quốc và Nhật Bản. Vì vậy, đánh giá chất lượng toàn diện nguyên liệu Kim ngân được thu mua ở các nơi khác nhau là cần thiết và cấp bách, góp phần đảm bảo chất lượng thuốc. Trong nghiên cứu này, 60 mẫu Kim ngân thu mua ở những nơi khác nhau (Trung Quốc và Hàn Quốc), được định lượng đồng thời các hoạt chất chính có tác dụng sinh học của Kim ngân như: coniferin, acid loganic, sweroside và loganin (hình 1) bằng phương pháp HPLC.



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

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Hoá chất và thiết bị.

1.1. Hoá chất và nguyên liệu:

- Hoá chất: nội chuẩn: methyl paraben; chuẩn coniferin, acid loganic, sweroside và loganin được chiết xuất, phân tách, tinh chế và xác định cấu trúc; methanol, nước cất, acid formic đạt tiêu chuẩn cho sắc ký lỏng hiệu năng cao.

- Mẫu Kim ngân được thu mua ở những nơi khác nhau tại Trung Quốc (TQ), Hàn Quốc (HQ). Mẫu được lưu trữ tại Khoa Dược, Đại học Quốc gia Chung Nam, Hàn Quốc.

1.2. Thiết bị:

Máy sắc ký lỏng hiệu năng cao Shimadzu detector UV-VIS và detector diode array, được nối với máy tính IBM.

2. Phương pháp nghiên cứu.

2.1. Điều kiện sắc ký:

Cột: cột phân tích pha đảo Optimapak RP18 (250 x 4,6 mm; 5 µm) của công ty RS Tech, Hàn Quốc; bước sóng phát hiện 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%; tốc độ dòng: 1,0 ml/phút; thể tích tiêm 10 µl.

Với chương trình rửa giải như sau:

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

2.2. Chuẩn bị dung dịch chuẩn và thử:

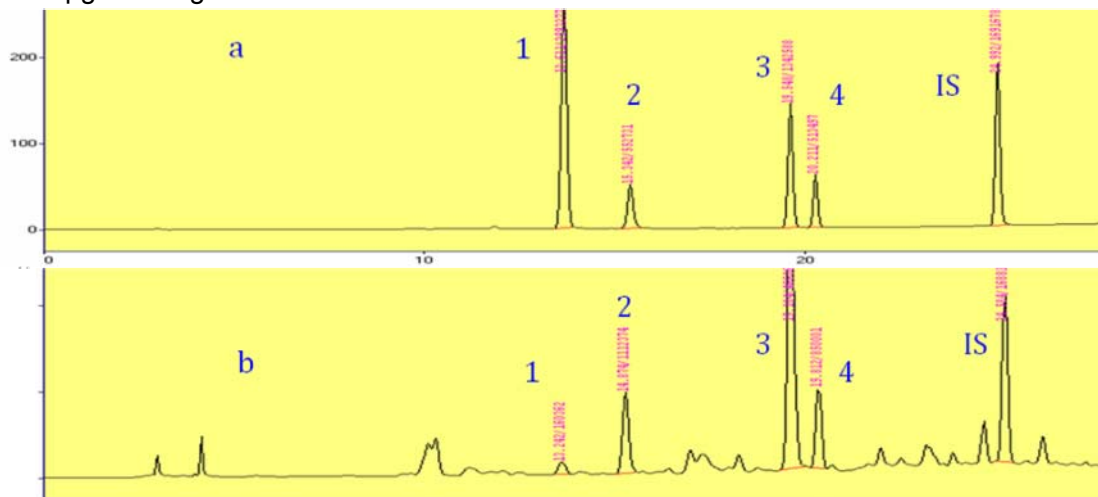
- Nội chuẩn (IS): dung dịch methyl paraben: 1.000 µg/ml trong methanol.

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

- Mẫu thử: cân chính xác khoảng 1g bột 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 µm.

KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU 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, nhiều nền thấp, thể hiện qua sắc ký đồ của mẫu thử Kim ngân (*hình 1b*), Trên các sắc ký đồ, mẫu thử có thời gian lưu trùng với thời gian lưu của pic coniferin, acid loganic, sweroside và loganin trong sắc ký đồ của mẫu chuẩn lần lượt là 12,61, 15,34; 19,55; 20,21 phút (*hình 2*).



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

Tại thời gian lưu pic coniferin, acid loganic, sweroside và loganin trên các sắc ký đồ mẫu thử và mẫu chuẩn, chúng tôi đã so sánh phổ hấp thụ UV thu được của pic. Kết quả cho thấy phổ mẫu thử và mẫu chuẩn

trùng khít lên nhau với hệ số phù hợp lần lượt là 0,9995; 0,9994; 0,9996 và 0,9938. Điều này chứng tỏ: pic thu được trên sắc ký đồ của mẫu thử tinh khiết và các thành phần khác có trong mẫu thử không ảnh hưởng

đến quá trình phân tích bốn chất đối chiếu coniferin, acid loganic, sweroside và loganin ở điều kiện sắc ký đã lựa chọn, qua đó cho phép tiến hành định tính, định lượng.

Để đánh giá tính thích hợp của hệ thống sắc ký, pha một mẫu chuẩn theo chỉ dẫn ở mục 2.2, tiêm 6 lần mẫu chuẩn vào hệ thống HPLC, tiến hành sắc ký với điều kiện đã lựa chọn.

1. Tính thích hợp của hệ thống sắc ký.

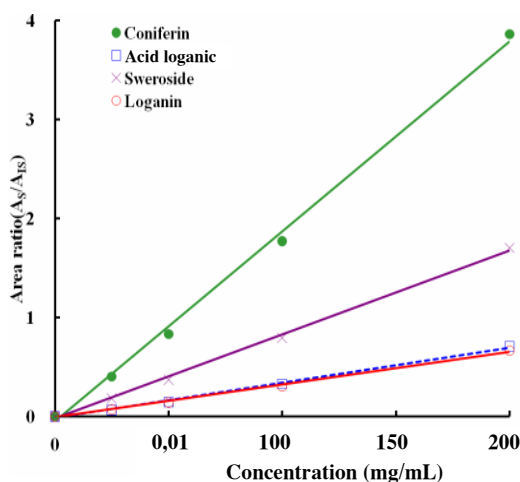
Bảng 1: Kết quả khảo sát tính thích hợp của hệ thống.

HOẠT CHẤT	RSD CỦA THỜI GIAN LƯU	RSD CỦA DIỆN TÍCH PIC	SỐ ĐỊA LÝ THUYẾT TRUNG BÌNH (n)	HỆ SỐ BẤT ĐỐI TRUNG BÌNH (T)
Coniferin	0,37	0,79	11300	1,10
Acid loganic	0,43	0,87	11200	1,05
sweroside	0,51	0,85	11250	1,14
loganin	0,61	0,98	11300	1,06

Các điều kiện sắc ký đã lựa chọn và hệ thống HPLC sử dụng là phù hợp và đảm bảo ổn định của phép phân tích định lượng coniferin, acid loganic, sweroside và loganin.

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

Mỗi mẫu chuẩn pha 4 dung dịch có nồng độ từ 10 - 200 µg/ml. Tiến hành sắc ký như điều kiện đã nêu.



Hình 3: Đường chuẩn của các chất định lượng.

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

Chất chuẩn	Nồng độ (µg/ml)	Phương trình hồi qui	r^2	LOD (µg/ml)	LOQ (µg/ml)
Coniferin (1)	5 - 200	$Y = 0.18180X - 0.02239$	0,99	0,557	1,687

Acid loganic (2)	5 . 200	$Y = 0.02735X - 0.00282$	1,00	0,327	0,990
Sweroside (3)	5 . 200	$Y = 0.09848X . 0.00084$	0,99	0,657	1,990
Loganin (4)	5 . 200	$Y = 0.06499X - 0.01462$	0,99	1,098	3,327

Với khoảng nồng độ của coniferin, acid loganic, sweroside và loganin từ 10 - 200 µg/ml, có sự tương quan tuyến tính giữa nồng độ và diện tích pic tương ứng.

Từ phương trình tuyến tính của các chất coniferin, acid loganic, sweroside và loganin cho phép xác định giới hạn phát hiện lần lượt là 0,557; 0,327; 0,657 và 1,098 µg/ml. Giới hạn định tương ứng với từng chất lần lượt 1,687; 0,990; 1,990; và 3,327 µg/ml.

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	0,3	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

(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)	(9)	(10)	(11)	(12)
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

Hàm lượng của coniferin, acid loganic, sweroside và loganin cao nhất trong các mẫu lần lượt là 0,55; 1,09; 4,32 và 7,08 mg/g và thấp nhất lần lượt là 0,03; 0,23; 0,02 và 0,02 mg/g.

KẾT LUẬN

Đã ứng dụng và thẩm định phương pháp HPLC để định lượng đồng thời coniferin, acid loganic, sweroside, loganin trong mẫu Kim ngân gồm: cột Optimapak C18; pha động: A (10% methanol có chứa 0,1% acid formic) và B (90% methanol có chứa 0,1% acid formic; điều kiện rửa rã: 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 sử dụng để phân tích 60 dược liệu Kim ngân thu mua ở những nơi khác nhau tại Hàn Quốc và Trung Quốc cho thấy hàm lượng cao nhất của các chất lần lượt là 0,55; 1,09; 4,32 và 7,08 mg/g và thấp nhất 0,03; 0,23; 0,02 và 0,02 mg/g.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Đỗ Tất Lợi. Những cây thuốc và vị thuốc Việt Nam. Nhà xuất bản Y học. 2004.
2. 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.* 2010, 120 (1), pp.134-139.
3. Kumar, N, Bhandari, P, Singh, B. and Kaul V. K. Saponins and volatile constituents from *Lonicera japonica* India. *Nat. Prod. Commun.* 2007, 2 (6), pp.633-636.
4. 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.* 2008, 10 (9), pp.851-856.

5. Song, W, Li, S, Wang, S, Wu, Y, Zi, J, Gan, 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.* 2008, 71 (5), pp.922-925.

6. Kumar, N., Singh, B., Gupta, A. P and Kaul, V. K. Lonijaposides, novel cerebrosides from *Lonicera japonica*. *Tetrahedron*, 2006, 62 (18), pp.4317-4322.

7. Won, J. B. and Ma, C. J. Neuroprotective activities of some medicinal plants against glutamate-induced neurotoxicity in primary cultures of rat cortical cells. *Nat. Prod. Sci.* 2009, 15 (3), 125-129.

8. 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.* 2009, 3 (1), pp.59-64.

9. Jeong, J. J, Ha, Y. M, Jin, Yong C, Lee, E. J., Kim, J. S, Kim, H. J, Seo, H. G, Lee, J. H, Kang, S. S., Kim, Y. S and Chang, K. C. Rutin from *Lonicera japonica* inhibits myocardial ischemia/reperfusion- induced apoptosis in vivo and protects H9c2 cells against hydrogen peroxide-mediated injury via ERK1/2 and PI3K/Akt signals in vitro. *Food Chem Toxicol.* 2009, 47 (7), pp.1569-1576.

10. Yoo, H. J, Kang, H. J, Song, Y. S, Park, E. H and Lim, C. J. Anti-angiogenic, antinociceptive and anti-inflammatory activities of *Lonicera japonica* extract. *J Pharm Pharmacol.* 2008, 60 (6), pp.779-786.

(Nghiên cứu này được tài trợ bởi Trung tâm Tiêu chuẩn hoá Dược liệu Quốc gia - Cục quản lý thuốc và Thực phẩm Hàn Quốc).