

QUANTITATIVE DETERMINATION OF ACONITINE IN ACONITE ROOT AND BLACK-PROCESSED ACONITE BY HPLC METHOD

TRAN QUANG TU¹, VU THI HIEP¹, TRUONG MINH NHUT¹, LE THI LAN PHUONG^{1,✉}

¹Faculty of Traditional Medicine, University of Medicine and Pharmacy at Ho Chi Minh City

✉Corresponding author: ltlphuong@ump.edu.vn

Received June 08th, 2024

Accepted July 17th, 2024

Abstract: The procedure for quantifying aconitine in Fuzi and Black-processed aconite using the HPLC method has been successfully developed. The chromatographic conditions include an Agilent 1260 Infinity II HPLC system with a PDA detector; a Phenomenex C18 column (250 × 4.6 mm; 5 μm, USA), a flow rate of 1.0 mL/min, a sample injection volume of 20 μL, and chromatography performed at room temperature (25 ± 5 °C). The aconitine elution process is carried out according to a gradient program with a mobile phase system consisting of acetonitrile and a buffer solution containing 0.2% glacial acetic acid, with the pH adjusted to 6.20 ± 0.05 using triethylamine. The quantification procedure has been validated to meet the requirements for system suitability, specificity, linearity, repeatability, intermediate precision, and accuracy. Quantitative results showed that Black-processed aconite has an aconitine content reduced by 4.5 times compared to Fuzi.

Keywords: Aconite root, Black-processed aconite, aconitine, HPLC

XÂY DỰNG VÀ THẨM ĐỊNH QUY TRÌNH ĐỊNH LƯỢNG ACONITIN TRONG PHỤ TỬ SỐNG VÀ HẮC PHỤ TỬ BẰNG PHƯƠNG PHÁP HPLC

TRẦN QUANG TÚ¹, VŨ THỊ HIỆP¹, TRƯƠNG MINH NHỰT¹, LÊ THỊ LAN PHƯƠNG^{1,✉}

¹Khoa Y học cổ truyền, Đại học Y Dược Thành phố Hồ Chí Minh

✉Tác giả liên hệ: ltlphuong@ump.edu.vn

Nhận bài ngày 08 tháng 06 năm 2024

Chấp nhận đăng ngày 17 tháng 07 năm 2024

Tóm tắt: Quy trình định lượng aconitin trong Phụ tử sống và Hắc phụ tử bằng phương pháp HPLC đã được xây dựng thành công với các điều kiện sắc ký bao gồm: Hệ thống HPLC Agilent 1260 Infinity II với đầu dò PDA, sử dụng cột sắc ký pha đảo Phenomenex C18 (250 × 4,6 mm; 5 μm, USA), tốc độ dòng 1,0 mL/phút, thể tích tiêm mẫu 20 μl, thực hiện sắc ký ở nhiệt độ phòng (25 ± 5 °C). Trong đó quá trình rửa giải aconitin được thực hiện theo chương trình gradient với hệ pha động bao gồm acetonitril và dung dịch đệm chứa acid acetic bằng 0,2 % được điều chỉnh pH đến 6,20 ± 0,05 bằng triethylamin. Quy trình định lượng đã được thẩm định và đảm bảo đạt các yêu cầu về tính tương thích hệ thống, tính đặc hiệu, tính tuyến tính, độ lặp lại, độ chính xác trung gian và độ đúng. Kết quả định lượng cho thấy Hắc phụ tử có hàm lượng aconitin giảm đi 4,5 lần so với Phụ tử sống.

Từ khóa: Phụ tử, Hắc phụ tử, aconitin, HPLC

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Phụ tử là rễ bên của cây Ô đầu (*Aconitum carmichaelii* Debx.) từ lâu đã được sử dụng như một vị thuốc quý trong Y học cổ truyền, có vị cay, đắng, tính đại nhiệt, có độc và quy 12 kinh. Tác dụng chính của Phụ tử trong Y học cổ truyền là hồi dương cứu nghịch, bổ hỏa, trợ dương, trừ phong thấp [1]. Nhiều nghiên cứu trong y học hiện đại cũng đã chứng minh Phụ tử có tác dụng mạnh mẽ đối với chức năng tim mạch và các tiềm năng y học đa dạng khác như chống trầm cảm, chống viêm, chống tiểu đường, giảm đau, chống ung thư và điều hòa miễn dịch [2,3]. Tuy nhiên, Phụ tử thường chỉ được sử dụng bên ngoài hoặc phải chế biến kỹ vì nó có chứa aconitin, một loại alkaloid cực độc. Aconitin đã được quan sát thấy gây độc tính ở gan, tim và hệ thần kinh trên động vật và con người. Việc uống 0,2 mg aconitin có thể dẫn đến ngộ độc và liều gây chết dao động từ 2 mg đến 5 mg [4]. Aconitin tác động lên các mô thần kinh cơ, thúc đẩy rối loạn nhịp tim và cản trở sự dẫn truyền thần kinh cơ [5]. Hơn nữa, aconitin còn thể hiện độc tính trên thận bằng cách can thiệp vào quá trình apoptosis của các tế bào biểu mô ống thận trong các mô hình thí nghiệm ở chuột [6].

Hiện nay ở nước ta, tùy theo mục đích sử dụng, dựa vào kinh nghiệm và cơ sở lý luận Y học cổ truyền mà việc chế biến Phụ tử được thực hiện theo nhiều cách khác nhau để thu được các vị thuốc sau chế biến như: Hắc phụ tử, Bạch phụ tử, Diêm phụ tử, Đạm phụ phiến, Phụ phiến sao... [7, 8]. Trong đó, Hắc phụ tử được xem là dạng bào chế phổ biến nhất, thường được sử dụng trên lâm sàng với tác dụng hồi dương cứu nghịch. Mặc dù việc chế biến giúp giảm bớt chất độc aconitin, tuy nhiên vẫn còn các trường hợp ngộ độc trên lâm sàng gần đây đã được báo cáo [9, 10]. Điều đó cho thấy hàm lượng aconitin còn lại trong vị thuốc này sau chế vẫn tồn tại nguy cơ gây độc cho người sử dụng, đặc biệt khi quy trình chế chưa có sự thống nhất giữa các tài liệu và chưa có quy trình giúp định lượng chính xác hàm lượng aconitin đối với Phụ tử trước và sau chế trong Dược điển Việt Nam V [7, 8]. Nhằm đánh giá mức độ an toàn của vị thuốc này trước khi sử dụng trên lâm sàng, giúp các bác sĩ an tâm hơn khi sử dụng cho bệnh nhân, nghiên cứu này tiến hành xây dựng và thẩm định quy trình định lượng bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) để xác định chính xác hàm lượng aconitin trong Phụ tử sống và Phụ tử chế (Hắc phụ tử).

2. THỰC NGHIỆM

2.1. Đối tượng nghiên cứu

Phụ tử (*Radix Aconiti lateralis*) đạt tiêu chuẩn Dược điển Việt Nam V, được cung cấp bởi Công ty cổ phần

Dược liệu Việt Nam (VIETMEC), số lô sản xuất: 1011122, số đăng ký kiểm nghiệm: 528DL-G-2022, ngày sản xuất: 23/11/2022, hạn sử dụng: 23/11/2024.

2.2. Dung môi, hóa chất, trang thiết bị nghiên cứu

2.2.1. Thiết bị, dụng cụ:

Hệ thống phân tích chính: Hệ thống sắc ký lỏng hiệu năng cao Agilent 1260 Infinity II với đầu dò PDA. Cột phân tích: Phenomenex C18 (250 × 4,6 mm; 5 μm) – USA và Agilent C18 (250 × 4,6 mm; 5 μm) – USA.

Các trang thiết bị khác: Cân phân tích Mettler Toledo XPR 6-digit, máy đo pH Mettler Toledo S220-K, máy lắc siêu âm, bộ lọc dùng cho sắc ký.

Các dụng cụ thủy tinh: Bình định mức, pipet chính xác, ống đong, erlen, betcher...

2.2.2. Hóa chất, chất chuẩn:

Hóa chất sử dụng trong HPLC: Acetonitril (Merck, loại HPLC), methanol (Merck, loại HPLC), acid hydrochloric (Merck, loại PA), acid acetic băng (Merck, loại PA), triethylamin (Merck, loại PA), amoniac (Merck, loại PA), cloroform (J.T.Baker, loại PA), nước cất dùng cho HPLC.

Chất chuẩn aconitin của Sigma Aldrich: Lô SLCJ6844, hàm lượng 99 % C₃₄H₄₇NO₁₁ (nguyên trạng).

Phụ liệu bào chế Hắc phụ tử: Muối MgCl₂.6H₂O, đường đỏ, dầu hạt cải...

2.3. Phương pháp nghiên cứu

2.3.1. Bào chế Hắc phụ tử

Hắc phụ tử được bào chế theo hướng dẫn của Thông tư 30/2017/TT-BYT ngày 11 tháng 07 năm 2017 của Bộ Y tế về hướng dẫn phương pháp chế biến các vị thuốc cổ truyền [7], theo các bước cụ thể sau: Hòa tan 400 g muối MgCl₂.6H₂O trong 700 ml nước, ngâm 01 kg Phụ tử vào dung dịch này trong 04 ngày đêm, sau đó đun sôi dịch ngâm đến khi Phụ tử chín đều (khoảng 2 giờ). Thái dọc củ thành phiến dày 0,2 – 0,5 cm, ngâm tiếp với 02 lít nước trong 13 giờ, sau đó rửa lại bằng nước (3 lần) đến khi còn vị tê nhẹ, để ráo nước, sấy ở 60 °C đến khi khô se. Tẩm dịch đường đỏ (30 g đường đỏ hòa tan trong 20ml nước sôi), ủ đến khi thấm hết dịch, tiếp tục tẩm 15 g dầu hạt cải, trộn đều, ủ 13 giờ. Sau đó tiến hành đồ khoảng 20 phút, lấy ra, sấy đến khi khô kiệt; để nguội và đóng gói.

2.3.2. Quy trình định lượng aconitin

2.3.2.1. Điều kiện sắc ký

Tham khảo các tài liệu [8, 11, 12] và qua khảo sát các hệ pha động, chương trình chạy khác nhau, nghiên cứu chọn điều kiện sắc ký phù hợp như sau:

- Hệ thống sắc ký: Hệ thống sắc ký lỏng hiệu năng cao Agilent 1260 Infinity II được trang bị đầu dò PDA.

- Cột: Phenomenex C18 (250 × 4,6 mm; 5 µm, Mỹ) hoặc cột tương đương.

- Nhiệt độ: Nhiệt độ phòng (25 ± 5 °C).

- Detector UV: 235 nm.

- Tốc độ dòng: 1,0 mL/phút.

- Thể tích tiêm mẫu: 20 µl.

- Pha động: Quá trình rửa giải aconitin được thực hiện bằng cách sử dụng chương trình gradient pha động bao gồm acetonitril (A) và dung dịch đệm (B) (chứa dung dịch axit axetic băng 0,2 %, được điều chỉnh đến pH 6,20 ± 0,05 bằng triethylamine). Quá trình rửa giải gradient của pha động được trình bày chi tiết trong Bảng 1.

Bảng 1. Chương trình gradient pha động

Thời gian (phút)	Acetonitrile (A) (% v/v)	Dung dịch đệm (B) (% v/v)
0-44	21 → 31	79 → 69
44-65	31 → 35	69 → 65
65-70	35	65

2.3.2.2. Phương pháp xử lý mẫu

Dung môi pha mẫu: Acid hydrochloric – Methanol (0,01 : 100; v/v)

Dung dịch chuẩn: Pha dung dịch chuẩn aconitin với nồng độ 0,02 mg/mL, sử dụng trong xác định tính tương thích hệ thống, tính đặc hiệu, độ lặp và độ chính xác trung gian. Các dung dịch chuẩn aconitin sử dụng trong xây dựng đường chuẩn được pha thành nhiều mức nồng độ (tối thiểu 03 mức) trong khoảng từ 0,0025 – 0,08 mg/mL.

Dung dịch thử: Cân 2 g dược liệu, làm ẩm với 3 mL ammoniac, để yên 60 phút. Sau 60 phút, thêm 30 mL chloroform, cho vài hạt bi thủy tinh, lắc 15 phút, siêu âm 3 lần, mỗi lần 45 phút (duy trì dưới 60 °C). Tiến hành lọc, sau đó làm bay hơi dịch lọc dưới luồng khí N₂ để thu được cặn khô. Hòa cặn thu được ở trên trong 10 ml dung môi pha mẫu. Hút 5 mL dung dịch trên cho vào bình định mức 10 mL, điền vừa đủ đến vạch với dung môi pha mẫu, lắc đều. Lọc qua màng lọc 0,45 µm. Lần lượt tiêm dung dịch mẫu chuẩn và mẫu thử qua cột sau khi hệ thống ổn định.

2.3.2.3. Tính hàm lượng aconitin

Hàm lượng (%) aconitin trong 2 g dược liệu được tính theo công thức sau:

$$X\% = [(St/ Ss) * Cs * 10 * 2 / m] * 100$$

Trong đó:

St: Diện tích pic aconitin trong sắc ký đồ dung dịch thử

Ss: Diện tích pic aconitin trong sắc ký đồ dung dịch chuẩn

Cs: Nồng độ aconitin trong dung dịch chuẩn (mg/mL)

m: Khối lượng mẫu thử (mg)

2.3.3. Thẩm định phương pháp

Thẩm định phương pháp phân tích được thực hiện theo hướng dẫn của ICH [13], bao gồm các chỉ tiêu:

Tính tương thích hệ thống: Thực hiện tiêm lần lượt 06 lần dung dịch chuẩn vào hệ thống sắc ký. Phương pháp đạt tính tương thích hệ thống khi độ lệch chuẩn tương đối (RSD %) của diện tích pic và thời gian lưu của 06 lần thực hiện ≤ 2,0 %; hệ số kéo đuôi (T_p) ≤ 1,5 và số đĩa lý thuyết ≥ 2000.

Tính đặc hiệu: Tiêm lần lượt các mẫu trắng (dung môi pha mẫu), dung dịch chuẩn aconitin, dung dịch thử (Phụ tử sống, Hắc phụ tử), dung dịch thử (Hắc phụ tử) thêm chuẩn. Phương pháp đạt tính đặc hiệu khi: Không có sự ảnh hưởng của mẫu trắng lên đáp ứng pic của aconitin, thời gian lưu của pic aconitin trên sắc ký đồ của dung dịch thử tương đương với dung dịch chuẩn, độ lệch thời gian lưu trung bình của thử và chuẩn ≤ 1,0 %, diện tích pic aconitin trong dung dịch thử thêm chuẩn tăng lên so với khi chưa thêm chuẩn, độ tinh khiết của pic aconitin trong mẫu chuẩn và mẫu thử ≥ 990 và phổ UV của aconitin trong mẫu chuẩn và mẫu thử giống nhau.

Tính tuyến tính: Chuẩn bị dãy dung dịch chuẩn có nồng độ từ 12,5 % đến 400 % nồng độ phân tích (0,02 mg/ml). Dung dịch chuẩn gốc (stock): Cân chính xác khoảng 2,105 mg chuẩn aconitin (tương ứng 2,0 mg aconitin) cho vào bình định mức 10 ml, hòa tan và định mức đến vạch bằng dung môi pha mẫu. Nồng độ aconitin dung dịch chuẩn gốc khoảng 0,2 mg/ml. Từ dung dịch chuẩn gốc, pha loãng trong dung môi pha mẫu để được dãy 7 dung dịch chuẩn có nồng độ tương ứng với 12,5 %; 25 %; 50 %; 100 %; 200 %; 300 % và 400 % nồng độ phân tích (0,02 mg/ml) (Bảng 2).

Bảng 2. Bảng pha các nồng độ dung dịch chuẩn xác định tính tuyến tính

Dung dịch tuyến tính	Từ dung dịch	Hút (mL)	Bình định mức (ml)	Nồng độ (mg/ml)
S1	S2	5	10	0,0025
S2	S3	5	10	0,005
S3	stock	1	20	0,01
S4	stock	1	10	0,02
S5	stock	1	5	0,04
S6	stock	3	10	0,06
S7	stock	2	5	0,08

Tiêm lần lượt các dung dịch chuẩn vào hệ thống sắc ký. Dung đường chuẩn biểu thị mối tương quan giữa nồng độ và diện tích pic của aconitin. Yêu cầu: $r \geq 0,999$; phương trình hồi quy tương thích ($F > F_{crit}$) và hệ số b (y-intercept) không có ý nghĩa.

Độ chính xác: Bao gồm độ lặp lại và độ chính xác trung gian. Độ lặp lại được thực hiện trên 06 mẫu thử độc lập. Phương pháp đạt độ lặp lại khi RSD (%) của hàm lượng tìm thấy trên 06 mẫu $\leq 5,0 \%$ [14]. Độ chính xác trung gian có các bước thực hiện như độ lặp lại, trong cùng phòng thí nghiệm nhưng được thực hiện khác cột, khác kiểm nghiệm viên và khác ngày. Phương pháp đạt độ chính xác trung gian khi RSD (%) của hàm lượng tìm thấy trên 12 mẫu $\leq 5,0 \%$ [14].

Độ đúng: Từ dung dịch chuẩn gốc, thêm chính xác lượng tương ứng với khoảng 50 %, 100 %, 200 % (so với nồng độ định lượng) chất đối chiếu aconitin vào mẫu Hắc phụ tử (sau khi đã ủ ammoniac), chiết và tiến hành định lượng theo quy trình, mỗi mức tiến hành lặp lại 03 lần. Phương pháp đạt độ đúng khi tỷ lệ phục hồi trên từng mẫu nằm trong khoảng 85,0 - 115,0 % và RSD (%) của tỷ lệ phục hồi $\leq 5,0 \%$ [14].

Khoảng xác định: Khoảng xác định của phương pháp định lượng là 50 - 200 % so với nồng độ định lượng.

2.4. Xử lý số liệu

Tính toán kết quả và phân tích thống kê bằng phần mềm Microsoft Excel 2016, so sánh kết quả với tiêu chuẩn chấp nhận.

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

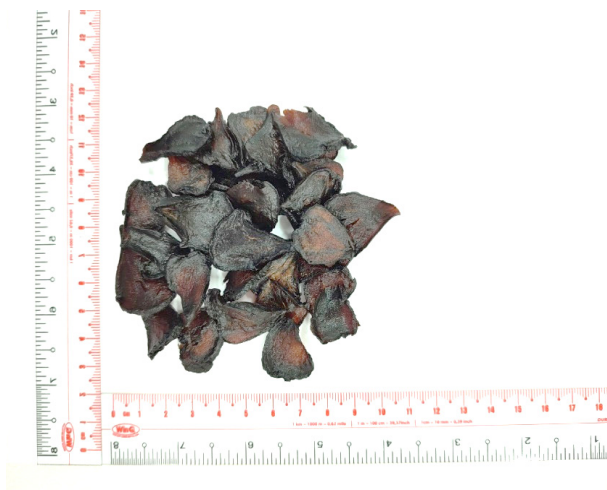
3.1. Bào chế Hắc phụ tử

Phụ tử sống là rễ củ nhánh hình con quay, đã được phơi khô; dài 3,5-5 cm, đường kính 1,5-2,5 cm; mặt ngoài màu nâu đen, có nhiều nếp nhăn dọc, vòng quanh phần trên củ có một số nhánh lõi lên như cái bươu. Thở chất cứng rắn, khó bẻ; vết cắt màu nâu xám, lõi giữa trắng đục (Hình 1a). Độ ẩm trung bình của Phụ tử sống xác định được là $11,32 \pm 0,45 \%$.

Hắc phụ tử được chế theo hướng dẫn của Bộ Y tế là các lát cắt dọc, hình chuông không cân đối, chiều dài thay đổi tùy vào nguyên liệu ban đầu (2-4 cm), rộng 1-3 cm, dày 2-5 mm; vỏ ngoài màu đen, mặt cắt màu nâu đen, bóng láng của dầu; thở chất cứng giòn, dễ bẻ gãy, mặt gãy như sừng; mùi thơm nhẹ, vị ngọt nhẹ và hơi châm chích đầu lưỡi (Hình 1b). Độ ẩm trung bình của Hắc phụ tử xác định được là $11,02 \pm 0,47 \%$.



a. Phụ tử sống



b. Hắc phụ tử

Hình 1. Vị thuốc Phụ tử

3.2. Xây dựng và thẩm định quy trình định lượng aconitin

3.2.1. Tính tương thích của hệ thống sắc ký

Tiến hành tiêm sắc ký dung dịch chuẩn aconitin để kiểm tra tính tương thích của hệ thống sắc ký, ghi lại các sắc ký đồ, xác định các giá trị thời gian lưu và diện tích của pic aconitin. Kết quả được thể hiện ở Bảng 3.

Bảng 3. Khảo sát tính tương thích của hệ thống sắc ký

STT	Thời gian lưu (phút)	Diện tích pic (mAU.s)	Hệ số đuôi (T_f)	Số đĩa lý thuyết
1	42,938	577,549	1,33	8335
2	42,924	578,470	1,34	8239
3	42,934	575,430	1,34	8371
4	42,932	577,573	1,34	8231
5	43,005	575,153	1,34	8323
6	43,034	572,597	1,35	8309
Trung bình	42,961 ± 0,046	576,129 ± 2,170	1,34 ± 0,000	8301 ± 55,403
RSD (%)	0,08	0,25	0,33	0,75

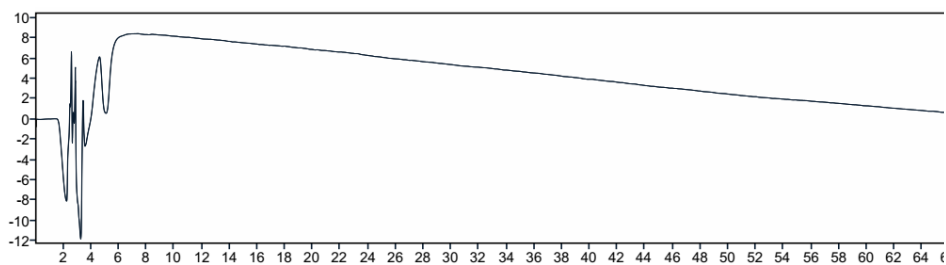
Nhận xét: RSD (%) của thời gian lưu và diện tích pic lần lượt là 0,08 % và 0,25 % (≤ 2 %), hệ số kéo đuôi T_f trung bình là 1,34 ($\leq 1,5$) và số đĩa lý thuyết trung bình là 8301 ± 55,403 (≥ 2000). Do đó hệ thống sắc ký phù hợp cho việc phân tích aconitin.

3.2.2. Tính đặc hiệu

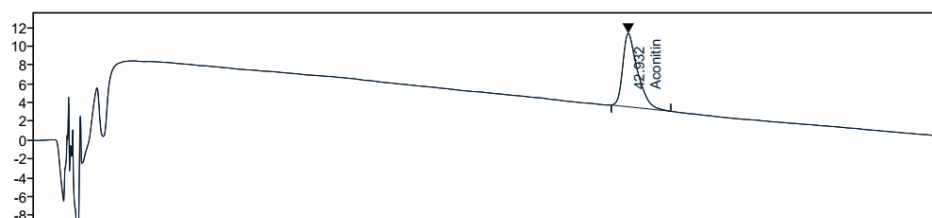
Tiến hành sắc ký lần lượt các mẫu: Dung môi pha mẫu (mẫu trắng), dung dịch chuẩn aconitin, dung dịch thử Phụ tử sống, dung dịch thử Hắc phụ tử, dung dịch thử Hắc phụ tử thêm chuẩn vào hệ thống sắc ký. Kết quả được thể hiện trong Bảng 4 và các Hình 2 - 7.

Bảng 4. Kết quả khảo sát tính đặc hiệu của phương pháp

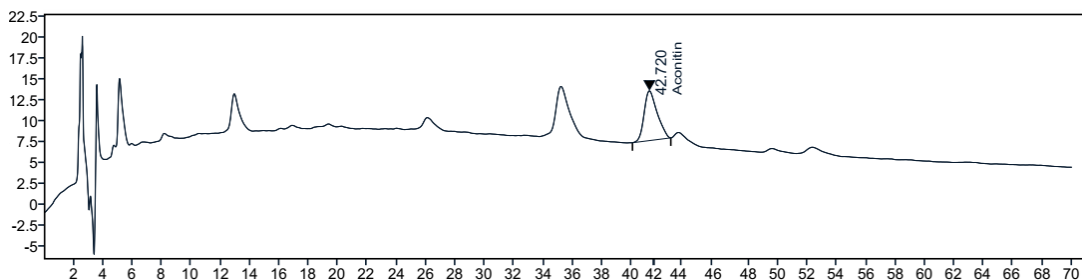
Tên mẫu	Thời gian lưu (phút)	Chênh lệch thời gian lưu trung bình so với chuẩn (%)	Diện tích pic (mAU.s)	Độ tinh khiết pic
Chuẩn	42,931	-	576,129	998,1
Thử (Phụ tử sống)	42,720	0,49	368,495	997,8
Thử (Hắc phụ tử)	42,700	0,54	81,248	998,1
Thử (Hắc phụ tử) thêm chuẩn	43,107	0,41	291,886	-
Mẫu trắng	-	-	-	-



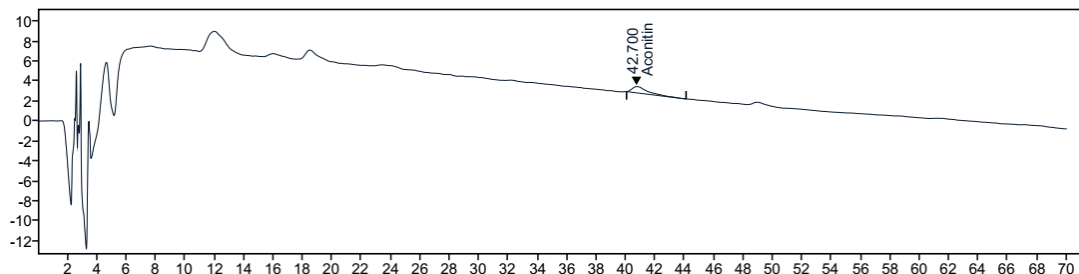
Hình 2. Sắc ký đồ của dung môi pha mẫu (mẫu trắng)



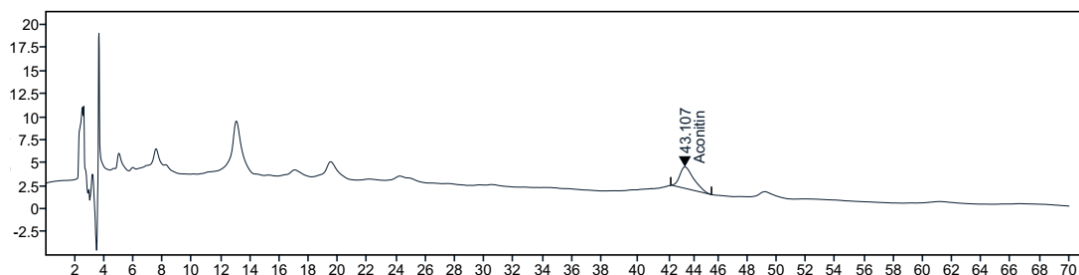
Hình 3. Sắc ký đồ của dung dịch aconitin chuẩn



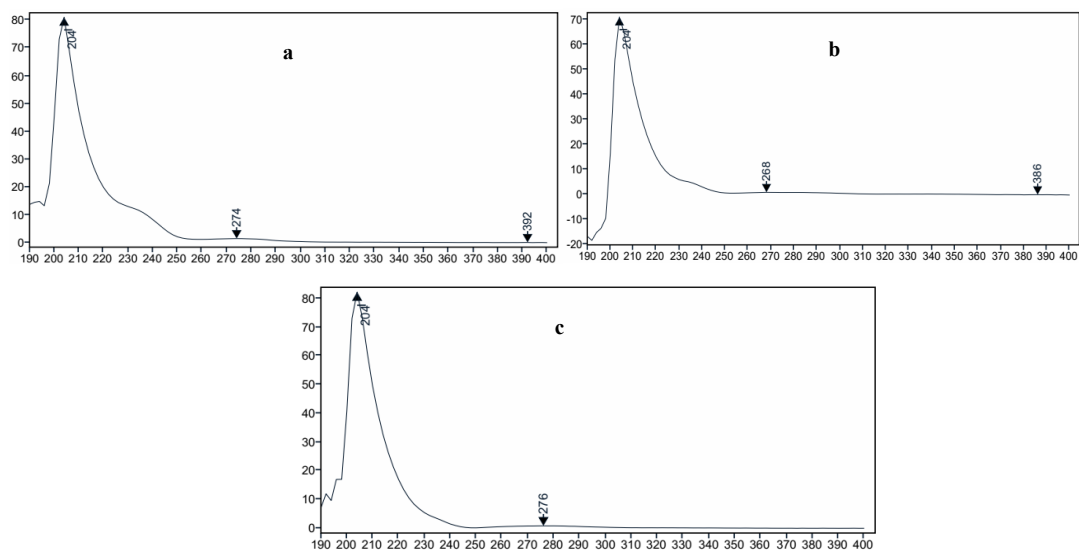
Hình 4. Sắc ký đồ của dung dịch thử (Phụ tử sống)



Hình 5. Sắc ký đồ của dung dịch thử (Hắc phụ tử)



Hình 6. Sắc ký đồ của dung dịch thử (Hắc phụ tử) thêm chuẩn



Hình 7. So sánh phổ UV-Vis pic aconitin của dung dịch chuẩn và thử (a. Phổ UV mẫu chuẩn aconitin, b. Phổ UV mẫu Phụ tử sống, c. Phổ UV mẫu Hắc phụ tử)

Nhận xét: Thời gian lưu của pic aconitin trên sắc ký đồ của dung dịch thử tương đương với dung dịch chuẩn. Độ lệch thời gian lưu trung bình của thử và chuẩn $\leq 1,0$ %. Không có sự ảnh hưởng của mẫu trắng lên đáp ứng pic của aconitin. Diện tích pic aconitin trong dung dịch thử thêm chuẩn tăng lên so với khi chưa thêm chuẩn. Độ tinh khiết của pic aconitin trong mẫu chuẩn và mẫu thử ≥ 990 . Phổ UV của aconitin trong mẫu chuẩn

và mẫu thử giống nhau. Do đó phương pháp đạt yêu cầu về tính đặc hiệu.

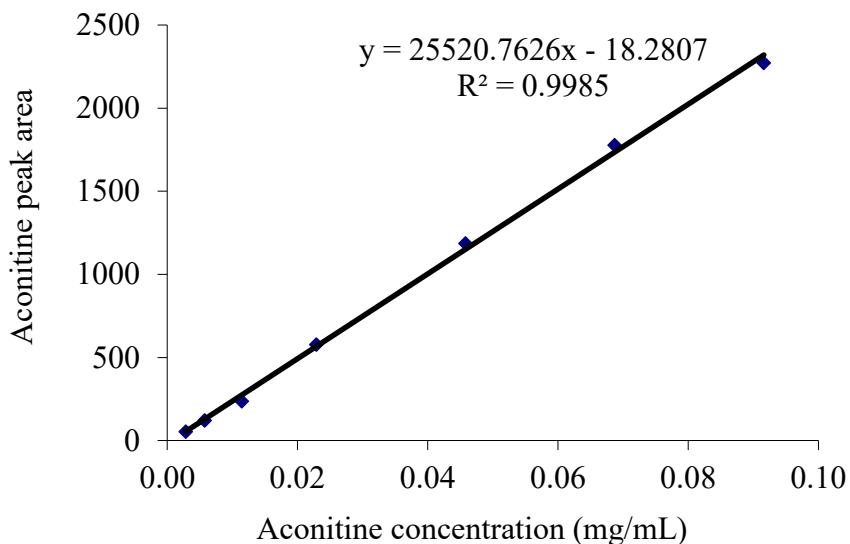
3.2.3. Tính tuyến tính

Khảo sát trên 07 dung dịch chuẩn có nồng độ aconitin từ 0,0025 – 0,08 mg/mL, lần lượt tương ứng với 12,5 %; 25 %; 50 %; 100 %; 200 %; 300 % và 400 % so với nồng độ định lượng. Kết quả được thể hiện trong Bảng 5 và Hình 8.

Bảng 5. Kết quả khảo sát tính tuyến tính của phương pháp

STT	% so với nồng độ định lượng	Nồng độ aconitin (mg/ml)	Diện tích pic (mAU.s)
1	12,5	0,00286	55,346
2	25	0,00573	121,267
3	50	0,01145	237,041
4	100	0,02291	578,603
5	200	0,04582	1187,634
6	300	0,06873	1777,876
7	400	0,09163	2272,282

Phương trình hồi quy: $y = 25520,76x - 18,28$, hệ số tương quan: $r = 0,9992$
 $F = 3283,15 > F_{crit} = 3,06 \times 10^{-8}$
 y - intercept: $p = 0,43 > 0,05$



Hình 8. Đồ thị biểu diễn tương quan tuyến tính giữa nồng độ aconitin và diện tích pic

Nhận xét: Với điều kiện sắc ký đã lựa chọn, trong khoảng nồng độ đã khảo sát, có sự tương quan tuyến tính chặt chẽ giữa nồng độ aconitin và diện tích pic đáp ứng với hệ số tương quan $r = 0,9992$.

3.2.4. Độ chính xác

Độ lặp lại: Tiến hành sắc ký lần lượt các mẫu dung dịch thử (Phụ tử sống) và dung dịch thử (Hắc phụ tử). Mỗi loại chuẩn bị 06 mẫu thử độc lập để tiến hành chạy sắc ký. Kết quả khảo sát độ lặp lại thể hiện ở Bảng 6 và Bảng 7.

Bảng 6. Khảo sát độ lặp lại của phương pháp trên mẫu thử Phụ tử sống

Mẫu thử	Lượng cân (mg)	Diện tích pic (mAU.s)	Nồng độ aconitin (mg/ml)	Hàm lượng aconitin (%)	Hàm lượng aconitin tính trên dược liệu khô kiệt (%)
1	2006,43	368,495	0,01465	0,01461	0,01647
2	2005,78	370,814	0,01474	0,01470	0,01658
3	2007,01	359,879	0,01431	0,01426	0,01608
4	2007,80	369,859	0,01471	0,01465	0,01652
5	2007,45	357,814	0,01423	0,01417	0,01598
6	2008,11	360,887	0,01435	0,01429	0,01612
Hàm lượng aconitin trung bình (%)				0,01445 ± 0,00022	0,01629 ± 0,00026
RSD (%)				1,59	1,59

Bảng 7. Khảo sát độ lặp lại của phương pháp trên mẫu thử Hắc phụ tử

Mẫu thử	Lượng cân (mg)	Diện tích pic (mAU.s)	Nồng độ aconitin (mg/ml)	Hàm lượng aconitin (%)	Hàm lượng aconitin tính trên dược liệu khô kiệt (%)
1	2005,70	81,248	0,00323	0,00322	0,00362
2	2003,00	79,601	0,00317	0,00316	0,00355
3	2003,12	80,113	0,00319	0,00318	0,00357
4	2004,58	79,843	0,00317	0,00317	0,00356
5	2003,26	80,516	0,00320	0,00320	0,00359
6	2005,92	82,313	0,00327	0,00326	0,00367
Hàm lượng aconitin trung bình (%)				0,00320 ± 0,00004	0,00359 ± 0,00004
RSD (%)				1,21	1,21

Nhận xét: RSD (%) của hàm lượng aconitin xác định được trong các mẫu Phụ tử sống và Hắc phụ tử lần lượt là 1,59 % và 1,21 % ($\leq 5,0$ %). Phương pháp phân tích đạt độ lặp lại.

Độ chính xác trung gian: Tiến hành sắc ký thêm 06 mẫu độc lập cho mỗi mẫu Phụ tử sống và Hắc phụ tử (các

bước thực hiện tương tự như ở phần độ lặp lại), trong cùng phòng thí nghiệm nhưng được thực hiện khác cột, khác kiểm nghiệm viên và khác ngày. Xác định RSD (%) của hàm lượng tìm thấy trên 12 mẫu thử cho mỗi mẫu dược liệu. Kết quả khảo sát độ chính xác trung gian được thể hiện trong Bảng 8 và Bảng 9.

Bảng 8. Khảo sát độ chính xác trung gian của phương pháp trên mẫu Phụ tử sống

Kiểm nghiệm viên 01 Kết quả định lượng ngày: 23/11/2023 Hệ thống HPLC Agilent 1260 Infinity II Cột: Phenomenex C18 (250 x 4.6mm, 5µm)					Kiểm nghiệm viên 02 Kết quả định lượng ngày: 24/11/2023 Hệ thống HPLC Agilent 1260 Infinity II Cột: Agilent C18 (250 x 4.6 mm, 5µm)				
Mẫu thử	Lượng cân (mg)	Diện tích pic (mAU.s)	Hàm lượng (%)	Hàm lượng tính trên dược liệu khô kiệt (%)	Mẫu thử	Lượng cân (mg)	Diện tích pic (mAU.s)	Hàm lượng (%)	Hàm lượng tính trên dược liệu khô kiệt (%)
1	2006,43	368,495	0,01461	0,01647	7	2008,25	365,954	0,01451	0,01636
2	2005,78	370,814	0,01470	0,01658	8	2004,97	371,012	0,01473	0,01661
3	2007,01	359,879	0,01426	0,01608	9	2006,85	360,458	0,01430	0,01613
4	2007,80	369,859	0,01465	0,01652	10	2008,02	368,599	0,01461	0,01648
5	2007,45	357,814	0,01417	0,01598	11	2006,28	367,418	0,01458	0,01644
6	2008,11	360,887	0,01429	0,01612	12	2009,01	359,798	0,01426	0,01608
Hàm lượng trung bình tính trên lượng cân: 0,01445 ± 0,00022 (%); n = 6, RSD = 1,59 %.					Hàm lượng trung bình tính trên lượng cân: 0,01450 ± 0,00019 (%); n = 6, RSD = 1,28 %.				
Hàm lượng trung bình tính trên dược liệu khô kiệt: 0,01629 ± 0,00026 (%); n = 6, RSD = 1,59 %.					Hàm lượng trung bình tính trên dược liệu khô kiệt: 0,01635 ± 0,00021 (%); n = 6, RSD = 1,28 %.				
Kết quả trung bình 02 kiểm nghiệm viên (n = 12): Hàm lượng trung bình tính trên lượng cân: 0,01447 ± 0,00021 (%), RSD = 1,44 % Hàm lượng trung bình tính trên dược liệu khô kiệt: 0,01632 ± 0,00023 (%), RSD = 1,39 %									

Bảng 9. Khảo sát độ chính xác trung gian của phương pháp trên mẫu Hắc phụ tử

Kiểm nghiệm viên 01 Kết quả định lượng ngày: 23/11/2023 Hệ thống HPLC Agilent 1260 Infinity II Cột: Phenomenex C18 (250 x 4.6mm, 5µm)					Kiểm nghiệm viên 02 Kết quả định lượng ngày: 24/11/2023 Hệ thống HPLC Agilent 1260 Infinity II Cột: Agilent C18 (250 x 4.6 mm, 5µm)				
Mẫu thử	Lượng cân (mg)	Diện tích pic (mAU.s)	Hàm lượng (%)	Hàm lượng tính trên dược liệu khô kiệt (%)	Mẫu thử	Lượng cân (mg)	Diện tích pic (mAU.s)	Hàm lượng (%)	Hàm lượng tính trên dược liệu khô kiệt (%)
1	2005,70	81,248	0,00322	0,00362	7	2004,89	82,287	0,00327	0,00367
2	2003,00	79,601	0,00316	0,00355	8	2003,15	80,101	0,00318	0,00358
3	2003,12	80,113	0,00318	0,00357	9	2003,62	79,913	0,00318	0,00357
4	2004,58	79,843	0,00317	0,00356	10	2004,87	80,012	0,00318	0,00357
5	2003,26	80,516	0,00320	0,00359	11	2003,68	79,651	0,00316	0,00356
6	2005,92	82,313	0,00326	0,00367	12	2006,04	81,332	0,00323	0,00363
Hàm lượng trung bình tính trên lượng cân: 0,00320 ± 0,00004 (%); n = 6, RSD = 1,21 %.					Hàm lượng trung bình tính trên lượng cân: 0,00320 ± 0,00004 (%); n = 6, RSD = 1,25 %.				
Hàm lượng trung bình tính trên dược liệu khô kiệt: 0,00359 ± 0,00004 (%); n = 6, RSD = 1,21 %.					Hàm lượng trung bình tính trên dược liệu khô kiệt: 0,00360 ± 0,00004 (%); n = 6, RSD = 1,25 %.				
Kết quả trung bình 02 kiểm nghiệm viên (n = 12): Hàm lượng trung bình tính trên lượng cân: 0,00320 ± 0,00004 (%), RSD = 1,23 %. Hàm lượng trung bình tính trên dược liệu khô kiệt: 0,00360 ± 0,00004 (%), RSD = 1,17 %									

Nhận xét: Với điều kiện sắc ký đã chọn, phương pháp đạt yêu cầu về độ chính xác trung gian (RSD của 12 mẫu thử với 02 kiểm nghiệm viên trên mẫu Phụ tử sống và Hắc phụ tử lần lượt là 1,44 % và 1,25 %, đều nhỏ hơn 5 %).

3.2.5. Độ đúng

Chuẩn bị mẫu chuẩn gốc: Cân 4,936 mg chất chuẩn aconitin pha trong bình định mức 25 ml được dung dịch

chuẩn gốc với nồng độ aconitin là 0,19547 mg/mL.

Từ dung dịch chuẩn gốc, thêm chính xác một lượng chuẩn aconitin lần lượt là 10 µg, 20 µg, 40 µg (tương ứng với các mức nồng độ 50 %, 100 %, 200 % so với nồng độ định lượng) vào mẫu Hắc phụ tử (sau khi đã ủ ammoniac), chiết và tiến hành định lượng theo quy trình ở mục 2.3.3. Mỗi mức tiến hành 3 lần. Kết quả được ghi nhận trong Bảng 10.

Bảng 10. Kết quả khảo sát độ đúng của phương pháp

Mức (%)	Lượng cân Hắc phụ tử (mg)	Hút (mL)	Nồng độ thêm vào (mg/ml)	Diện tích pic sau khi trừ diện tích pic Hắc phụ tử (mAU.s)	Nồng độ tìm thấy (mg/ml)	Tỷ lệ phục hồi (%)
50	2001,10	1	0,0094	211,280	0,0084	85,96
	2002,22	1	0,0094	216,402	0,0086	88,04
	2001,58	1	0,0094	212,147	0,0084	86,31
100	2004,02	2	0,0188	435,890	0,0173	88,67
	2003,15	2	0,0188	446,408	0,0178	90,81
	2002,78	2	0,0188	438,315	0,0174	89,17
200	2001,60	4	0,0375	883,452	0,0351	89,86
	2001,58	4	0,0375	875,395	0,0348	89,04
	2002,35	4	0,0375	889,928	0,0354	90,52
Tỷ lệ phục hồi trung bình (%): 88,71 ± 1,70 (%), RSD = 1,91						

Nhận xét: Tỷ lệ thu hồi aconitin trên từng mẫu đều nằm trong giới hạn 85 – 115 % với tỷ lệ phục hồi trung bình là 88,71 ± 1,70 (%) và RSD = 1,91% (≤ 5,0 %). Do đó phương pháp đạt yêu cầu về độ đúng.

3.2.6. Khoảng xác định

Từ kết quả xác định độ đúng và tính tuyến tính, suy ra khoảng xác định của phương pháp định lượng aconitin là 50 – 200 % so với nồng độ định lượng, tức là từ 10 – 40 µg/mL.

3.3. So sánh hàm lượng aconitin trong Phụ tử trước và sau chế

Với 01 kg Phụ tử sống thực hiện chế Hắc phụ tử theo quy trình hướng dẫn của Thông tư 30/2017/TT-BYT, thu được trung bình 738,67 ± 25,32 g Hắc phụ tử (hiệu suất chế

là 73,87 ± 2,53 %). Hàm lượng aconitin trung bình trong Phụ tử sống tính trên dược liệu khô kiệt sau khi đã trừ hàm ẩm 11,32 % là 0,01632 ± 0,00023 (%); như vậy trong 1 kg Phụ tử sống ban đầu có chứa 14,47 g aconitin. Sau khi chế biến thành Hắc phụ tử, hàm lượng aconitin trung bình trong Hắc phụ tử tính trên dược liệu khô kiệt sau khi đã trừ hàm ẩm 11,02 % là 0,00360 ± 0,00004 (%); như vậy trong 738,67 g Hắc phụ tử thu được có chứa 2,37 g aconitin. Vậy tổng lượng aconitin có trong 1 kg Phụ tử sống ban đầu, sau khi chế biến thành Hắc phụ tử theo hướng dẫn của Bộ y tế đã giảm đi 6,1 lần. Hàm lượng aconitin trong Hắc phụ tử giảm đi 4,5 lần so với Phụ tử sống.

Giá trị tham chiếu ước lượng mối tương quan giữa hàm lượng aconitin và lượng dược liệu tương ứng được trình bày trong Bảng 11.

Bảng 11. Ước tính lượng aconitin có trong lượng dược liệu tương ứng

m _{aconitin} (mg)	m _{Dược liệu} (g)		m _{Dược liệu khô kiệt} (g)	
	Phụ tử sống	Hắc phụ tử	Phụ tử sống	Hắc phụ tử
0,005	0,035	0,156	0,031	0,139
0,01	0,069	0,313	0,061	0,278
0,05	0,346	1,563	0,307	1,391
0,1	0,691	3,127	0,614	2,782
0,2	1,382	6,253	1,228	5,564
0,5	3,456	15,633	3,069	13,911
1	6,912	31,267	6,138	27,821
2	13,824	62,533	12,276	55,642
5	34,560	156,334	30,691	139,106

4. BÀN LUẬN

Sau khi chế biến theo hướng dẫn của Bộ Y tế, Hắc phụ tử thu được có hàm lượng aconitin giảm đi 4,5 lần so với Phụ tử sống. Dựa trên y văn, liều bắt đầu gây độc của aconitin là 0,2 mg, gây rối loạn tim mạch nặng ở liều 2 mg và liều gây tử vong người trưởng thành là khoảng 5 mg [4]. Như vậy theo kết quả ước tính, với khoảng 1,2 g Phụ tử sống đã có thể chứa lượng aconitin bắt đầu gây độc cho cơ thể, lượng này tương đương trong khoảng 5,6 g Hắc phụ tử. Với lượng nhiều hơn 12,3 g Phụ tử sống có khả năng gây độc nặng trên tim mạch dẫn đến tử vong ở người trưởng thành, kết quả tương tự với lượng nhiều hơn 55,6 g Hắc phụ tử. Trên thực tế lâm sàng, Phụ tử sống hầu như chỉ được sử dụng ở dạng dùng ngoài để tránh xảy ra ngộ độc, như ngâm rượu để xoa bóp, giảm đau nhức. Hắc phụ tử được sử dụng dưới dạng thuốc sắc trong các bài thuốc hồi dương, chữa triệu chứng nguy cấp, thoát dương, mạch gần như bằng không... với liều từ 4 – 12 g [8, 15]. Khoảng liều khuyến cáo này theo lý thuyết có chứa lượng aconitin dưới ngưỡng gây độc nặng và tử vong, tuy nhiên vẫn có khả năng chứa lượng aconitin trên mức bắt đầu có triệu chứng ngộ độc ($\geq 0,2$ mg aconitin). Do đó khi sử dụng Hắc phụ tử trên lâm sàng cần thận trọng, sắc thuốc rất kỹ và lâu, đồng thời tuân thủ đúng liều lượng và thời gian sử dụng theo hướng dẫn của bác sĩ. Vì đã có nghiên cứu cho thấy việc sử dụng nhiều lần Phụ tử chế có khả năng làm tăng sinh khả dụng của aconitin và tăng nguy cơ ngộ độc [16]. Bên cạnh đó, quá trình sắc thuốc, dưới tác dụng của nhiệt độ và các phản ứng thủy phân, sẽ tiếp tục làm giảm bớt độc tính của aconitin, giúp an toàn hơn khi sử dụng vị thuốc này trên lâm sàng [17].

Nghiên cứu đã xây dựng thành công quy trình định lượng aconitin trong Phụ tử sống và Hắc phụ tử chế theo hướng dẫn của Bộ Y tế. Từ đó cho thấy hàm lượng chất độc aconitin trong Hắc phụ tử đã giảm đáng kể so với Phụ tử sống. Tuy nhiên việc aconitin vẫn còn hiện diện trong vị thuốc Hắc phụ tử cho thấy vẫn cần phải hết sức

thận trọng khi sử dụng vị thuốc này trên lâm sàng. Mặc dù trong Dược điển Việt Nam V có quy định về việc thử giới hạn aconitin cho Phụ tử chế bằng phương pháp sắc ký lớp mỏng, thế nhưng phương pháp này vẫn tồn tại nhiều nhược điểm (môi trường sắc ký, tay nghề thực hiện, đọc kết quả bằng mắt thường...) và hiện không còn được sử dụng để kiểm tra độc tính của Phụ tử chế trong dược điển của một số quốc gia trên thế giới [11, 12]. Việc định lượng aconitin bằng phương pháp hiện đại như sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) sẽ cung cấp bằng chứng khoa học đáng tin cậy để đánh giá độ an toàn của vị thuốc này, giúp các bác sĩ có những căn cứ chính xác để điều chỉnh liều lượng và an tâm hơn khi sử dụng chúng trên lâm sàng.

5. KẾT LUẬN

Qua quá trình khảo sát đánh giá thực nghiệm, nghiên cứu đã xây dựng được quy trình định lượng aconitin trong Phụ tử sống và Hắc phụ tử bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao. Phương pháp xây dựng đạt các yêu cầu về tính tương thích hệ thống, tính đặc hiệu, độ chính xác, độ đúng và có sự tương quan tuyến tính chặt chẽ giữa diện tích pic đáp ứng và nồng độ aconitin, đồng thời phù hợp với các điều kiện, trang thiết bị, hóa chất thuốc thử tại các phòng thí nghiệm hiện nay. Phương pháp được áp dụng để định lượng aconitin trong Phụ tử sống và Hắc phụ tử, góp phần vào việc đảm bảo chất lượng và độ an toàn của dược liệu, làm cơ sở để bổ sung thêm tiêu chí đánh giá chất lượng của Phụ tử trong Dược điển Việt Nam, đồng thời hy vọng có thể áp dụng phương pháp này để xác định hàm lượng aconitin trong các dạng bào chế khác của Phụ tử.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu này nhận nguồn tài trợ kinh phí từ Đại học Y Dược Thành phố Hồ Chí Minh, là một phần kết quả của đề tài nghiên cứu khoa học cấp cơ sở của tác giả. Nghiên cứu được thực hiện tại Bộ môn Bảo chế Đông dược và Đơn vị Y Dược học cổ truyền – Khoa Y học cổ truyền – Đại học Y Dược Thành phố Hồ Chí Minh.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Nguyễn Phương Dung (2021), *Chế biến dược liệu*, Nhà xuất bản Y học, tr. 60-61.
2. G. He, X. Wang, W. Liu, Y. Li, Y. Shao, W. Liu, X. Liang, X. Bao (2023), Chemical constituents, pharmacological effects, toxicology, processing and compatibility of Fuzi (lateral root of *Aconitum carmichaelii* Debx): A review, *J Ethnopharmacol*, 307, e116160.
3. M. Wang, W. J. Hu, X. Zhou, K. Yu, Y. Wang, B. Y. Yang, H. X. Kuang (2023), Ethnopharmacological use, pharmacology, toxicology, phytochemistry, and progress in Chinese crude drug processing of the lateral root of *Aconitum carmichaelii* Debeaux. (Fuzi): A review, *J Ethnopharmacol*, 301, e115838.
4. Y. Gao, H. Fan, A. Nie, K. Yang, H. Xing, Z. Gao, L. Yang, Z. Wang, L. Zhang (2022), Aconitine: A review of its pharmacokinetics, pharmacology, toxicology and detoxification, *J Ethnopharmacol*, 293, e115270.
5. T. Y. Chan (2009), Aconite poisoning, *Clin Toxicol (Phila)*, 47(4), pp.279-285.

6. X. L. Xu, L. J. Yang, J. G. Jiang (2016), Renal toxic ingredients and their toxicology from traditional Chinese medicine, *Expert Opin Drug Metab Toxicol*, 12(2), pp.149-159.
7. Bộ Y tế (2017), *Hướng dẫn phương pháp chế biến các vị thuốc cổ truyền*. Thông tư số 30/2017/TT-BYT, Hà Nội, tr.86-87.
8. Bộ Y tế (2017), *Dược điển Việt Nam V*. Ban hành kèm theo Quyết định số 5358/QĐ-BYT, Hà Nội, tr.1291-1292.
9. P. Y. Chou, C. C. Wang, C. J. Tai, T. L. Yang, Y. J. Tang (2018), Bradycardia and Hypotension from Improper Use of Aconite Root: A Case Report and Brief Review, *Complement Med Res*, 25(5), pp.338-343.
10. Nguyễn Văn Đán, Phan Châu Quyền, Nguyễn Thị Thành, Lê Thị Lan Hương (2023), Báo cáo ca lâm sàng: Ngộ độc Phụ tử, *Tạp chí Y học cộng đồng*, 64(8), tr.226-231.
11. Hong Kong Chinese Materia Medica Standards Volume 2 (2008), *Appendix XIV: Detection of Aconitine, Hypaconitine and Mesaconitine*, Department of Health Hong Kong Special Administrative Region, The People's Republic of China.
12. Ministry of Health of the People's Republic of China (2020), *The Pharmacopoeia of the People's Republic of China, Part I: The Pharmacopoeia Commission of PRC*, Beijing: China Medical Science Press.
13. ICH Harmonised Tripartite Guideline (2022), *Validation of Analytical Procedures Q2(R2) International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use*, Geneva, Switzerland.
14. AOAC Official Methods of Analysis (19th Ed.) (2016), *Appendix F: Guidelines for Standard Method Performance Requirements*, AOAC INTERNATIONAL, Gaithersburg.
15. Đỗ Tất Lợi (2004), *Những cây thuốc và vị thuốc Việt Nam*, Nhà xuất bản Y học, tr.876-882.
16. L. Tang, Y. Gong, C. Lv, L. Ye, L. Liu, Z. Liu (2012), Pharmacokinetics of aconitine as the targeted marker of Fuzi (*Aconitum carmichaeli*) following single and multiple oral administrations of Fuzi extracts in rat by UPLC/MS/MS, *J Ethnopharmacol*, 141(2), pp.736-741.
17. P. Tong P, C. Wu, X. Wang, H. Hu, H. Jin, C. Li, Y. Zhu, L. Shan, L. Xiao (2013), Development and assessment of a complete-detoxication strategy for Fuzi (lateral root of *Aconitum carmichaeli*) and its application in rheumatoid arthritis therapy, *J Ethnopharmacol*, 146(2), pp.562-571.