

ESTABLISHING A REFERENCE STANDARD OF ASTRAGALOSID IV ISOLATED FROM RADIX ASTRAGALUS

NGUYEN LAM HONG^{1,✉}, NGUYEN VAN VINH HA², GIAN THI LAN³

¹Hanoi University of Pharmacy; ²Institute of Drug Quality Control Ho Chi Minh city

³National Institute of Drug Quality Control.

✉Corresponding author: lamhong0404@gmail.com

Received November 12th, 2023

Accepted December 29th, 2023

Abstract: In China and Vietnam, Radix Astragalus has been widely used as a traditional herbal. With reference to the quality of Radix Astragalus in Vietnam Pharmacopoeia V, Chinese Pharmacopoeia (CP 2020), its content of astragaloside IV quantified by HPLC/ELSD is specified to be not less than 0.04 %. For the quality control of Radix Astragalus, the establishment of astragaloside IV as an affordable-price reference standard is prerequisite in Vietnam. In this study, 3,5 g of astragaloside IV was isolated and purified from 2,5 kg of Radix Astragalus. The purified substance whose structure was confirmed astragaloside IV by ¹H, ¹³C-NMR, HR-MS, IR. Astragaloside IV was packaged in a 10 mg standard tube, the content of astragaloside IV in our purified samples was determined to be of 96.0 % by HPLC-ELSD analysis.

Keywords: Astragalosid IV, Radix Astragali membranacei, isolation, purification.

THIẾT LẬP CHẤT CHUẨN ASTRAGALOSID IV PHÂN LẬP TỪ RỄ HOÀNG KỲ (RADIX ASTRAGALUS)

NGUYỄN LÂM HỒNG^{1,✉}, NGUYỄN VĂN VINH HÀ², GIẢN THỊ LAN³

¹Trường đại học Dược Hà Nội; ²Viện Kiểm nghiệm thuốc thành phố Hồ Chí Minh.

³Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương

✉Tác giả liên hệ: lamhong0404@gmail.com

Nhận bài ngày 12 tháng 11 năm 2023

Chấp nhận đăng ngày 29 tháng 12 năm 2023

Tóm tắt: Ở Trung Quốc và Việt nam, Hoàng kỳ là một dược liệu được sử dụng rộng rãi. Trong chuyên luận Hoàng kỳ của Dược điển Việt Nam V và Trung Quốc (CP 2020), hàm lượng astragalosid IV được định lượng bằng HPLC/ELSD không được nhỏ hơn 0,04 %. Để kiểm tra chất lượng Hoàng kỳ rất cần có chất chuẩn được thiết lập ở Việt Nam với giá thành hợp lý. Nghiên cứu này đã phân lập và tinh chế được 3,5 g chất sạch từ 2,5 kg Hoàng kỳ. Chất tinh chế đã được khẳng định là astragalosid IV bằng phổ ¹H, ¹³C-NMR, HR-MS, IR và đóng ống chuẩn 10 mg có hàm lượng 96,0 % được xác định bằng HPLC/ELSD

Từ khóa: Astragalosid IV, Radix Astragali membranacei, Hoàng kỳ, phân lập, tinh chế.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Hoàng kỳ (*Radix Astragali membranacei*) là một vị dược liệu được sử dụng rất phổ biến, với nhiều tác dụng trên tim mạch, thận, gan, có tác dụng chống viêm, kháng khuẩn, chống oxy hóa, hạ đường huyết. Ngày nay, Hoàng Kỳ xuất hiện nhiều trên thị trường dưới dạng các chế phẩm cao, viên hoàn, trà uống... với mục đích chủ yếu là bổ khí dưỡng huyết, dùng khi mệt mỏi.

Thành phần hóa học chính của Hoàng kỳ là các saponin, với hơn 40 thành phần đã được phát hiện, hầu hết đều có vòng triterpenoid A, gồm có Astragaloside I-VIII, Acetyl-astragaloside, Soyasaponin. Trong đó, astragalosid IV là một trong những thành phần với nhiều tác dụng như chống viêm, chống ung thư và đóng vai trò là chất đánh dấu (marker) dùng để kiểm soát chất lượng Hoàng kỳ theo Dược điển Việt Nam V, Dược điển Trung Quốc (CP 2020), Dược điển Châu Âu (EP 11.0) [1, 2, 3]. Các dược điển quy định về chỉ tiêu định tính bằng sắc ký lớp mỏng và định lượng bằng phương pháp HPLC/ELSD (detector tán xạ bay hơi) có xác định hàm lượng các chất đánh dấu (markers) khác nhau, trong đó có astragalosid IV với giới hạn hàm lượng cho phép (ĐDVN V và CP 2020 là 0,04 %) [1, 2]. Bên cạnh đó, astragalosid IV còn dùng để phân biệt Hoàng Kỳ và Hồng Kỳ vì Hoàng kỳ hay bị nhầm lẫn với Hồng Kỳ.

Hiện nay, chưa có chuẩn astragalosid IV được thiết lập tại Việt Nam, nguồn chuẩn astragalosid IV mua từ nước ngoài với giá thành cao, thời gian cung cấp khá lâu. Vì vậy, rất cần thiết lập chuẩn astragalosid IV tại Việt Nam.

2. THỰC NGHIỆM

2.1. Thiết bị, hóa chất, chất chuẩn

2.1.1. Thiết bị, dụng cụ

Các thiết bị, dụng cụ đã được hiệu chuẩn theo quy định của GLP và ISO/IEC 17025 tại Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương: Máy HPLC/ELSD, Hitachi, máy sắc ký lỏng khối phổ Sciex Qtrap 6500+ (Mỹ); máy cận hồng ngoại Nilolet iS50 NIR (Thermo); máy phân tích nhiệt trọng lực Mettler TGA/DSC1, cân kỹ thuật Mettler Toledo ($d = 1$ mg), cân phân tích Mettler Toledo ($d=0,1$ mg); bản mỏng silicagel 60 F₂₅₄; Silica gel 60 (40-63 μ m) (Merck); bộ cất quay chân không Buchi; Cột thủy tinh, pipet chính xác và các dụng cụ thủy tinh cần thiết khác.

* Viện Hóa học: Máy cộng hưởng từ hạt nhân Bruker 500 MHz và 600 MHz.

2.1.2. Hóa chất, dung môi, chất chuẩn

Chất chuẩn astragalosid IV: USPRS, Lô: R088V0, Hàm Lượng 98,0 % (nguyên trạng).

Hóa chất: *n*-hexan, ethyl acetat (EtOAc), dicloromethan (CH₂Cl₂), chloroform (CHCl₃), methanol, aceton, acid formic, ethanol, *n*-butanol, acid phosphoric, acid hydrochloric: đạt tinh khiết phân tích; methanol: đạt tinh khiết sắc ký.

2.2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Đối tượng nghiên cứu

Nguyên liệu sử dụng là dược liệu Hoàng kỳ mua trên thị trường, được định tính và kiểm tra hàm lượng astragalosid IV bằng HPTLC/DAD, hàm lượng astragalosid IV trong nguyên liệu là 0,04 %, tính theo nguyên trạng.

2.2.2. Phương pháp nghiên cứu

* *Chiết xuất*: Dược liệu Hoàng kỳ được xay thành bột thô, sau đó được chiết bằng methanol (TT) được cô dịch lọc trên máy cô quay chân không đến cạn, sau đó thủy phân bằng natri hydroxyd 10 %. Dịch thủy phân được chiết với *n*-butanol (TT). Dịch chiết *n*-butanol được cô trên máy cô quay chân không thu hồi dung môi thu được cao Hoàng kỳ.

* *Phân lập và tinh chế*

Astragalosid IV tiếp tục được phân lập ra khỏi Cao Hoàng kỳ lần lượt trên hai cột pha thuận.

Phân lập: Mẫu thử được hòa tan trong methanol, sau đó được phân tách bằng phương pháp sắc ký cột pha thuận. Khảo sát để lựa chọn dung môi rửa giải. Kiểm tra các phân đoạn bằng phương pháp sắc ký lớp mỏng pha thuận như sau:

Bản mỏng silica gel 60 F₂₅₄ (Merck)

Lựa chọn dung môi triển khai theo các tài liệu tham khảo:

Hệ 1: CHCl₃:MeOH:H₂O (13:7:2) (Lắc lấy lớp dưới) (tt/tt/tt) (Hệ 1) [1, 2]

Hệ 2: EtOAc:MeOH:H₂O (100:13,5:10) (Hệ 2) (tt/tt) [4]

Hệ 3: CHCl₃:EtOAc:MeOH:H₂O (22:40:22:10) (Hệ 3) (Lắc lấy lớp dưới) (tt/tt/tt)

* Kháng định cấu trúc astragalosid IV

Kháng định chất tinh chế được là astragalosid IV bằng các phương pháp đo phổ MS, NMR IR, nhiệt độ nóng chảy....

* *Phương pháp định lượng astragalosid IV bằng HPLC/ELSD*

Tham khảo phương pháp định lượng astragalosid IV trong Hoàng kỳ bằng HPLC/ELSD trong ĐDVN V như sau:

Dung dịch chuẩn: Cân chính xác khoảng 10 mg astragalosid IV (chất chuẩn) vào trong bình định mức 20 ml, thêm khoảng 10 ml methanol, lắc siêu âm 10 phút, để nguội và thêm vừa đủ đến vạch bằng methanol, lắc đều.

Dung dịch thử: Cân chính xác khoảng 10 mg mẫu thử tinh chế được vào trong bình định mức 20 ml, thêm khoảng 20 ml methanol, lắc siêu âm 10 phút, để nguội và thêm vừa đủ đến vạch bằng methanol, lắc đều.

Điều kiện sắc ký: Cột C18 (250 × 4,6 mm; 5 μm), pha động: ACN– nước theo chương trình dung môi: ACN–H₂O (32:68) với tốc độ dòng: 0,8 ml/phút và thể tích tiêm: 20 μl, phát hiện chất bằng detector tán xạ bay hơi.

Tiêm dung dịch chuẩn 5 và 20 μl và tiêm dung dịch thử 20 μl. Tính nồng độ của astragalosid IV trong dung dịch thử sử dụng phương trình đường chuẩn biến đổi logarit của phương pháp ngoại chuẩn của 2 điểm.

* Xác định mất khối lượng do làm khô bằng phương pháp TGA

Xác định tỷ lệ phần trăm các chất dễ bay hơi bằng phân tích nhiệt trọng lượng trên thiết bị đã được hiệu chuẩn thích hợp. Cân một lượng mẫu khoảng 5 mg chất chuẩn, cài đặt tốc độ gia nhiệt là 10 °C/phút giữa nhiệt độ môi trường và 120 °C trong môi trường nitơ với tốc độ dòng

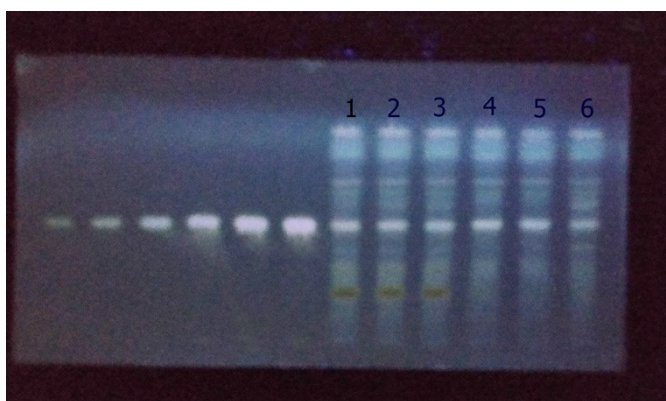
40 ml/phút. Từ biểu đồ nhiệt, xác định sự hao hụt khối lượng tích lũy giữa nhiệt độ môi trường xung quanh và một điểm trên mặt phẳng.

3. KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN

3.1. Chiết xuất, phân lập và tinh chế Astragalosid IV

3.1.1. Chiết xuất

Tham khảo phương pháp xử lý mẫu khi định lượng astragalosid IV trong chuyên luận Hoàng kỳ của ĐDVN V và EP 11.0 [1], [3] (hình 1) cho thấy hàm lượng astragalosid IV và các vết tạp chất xung quanh astragalosid IV không khác nhau đáng kể. Vì vậy, quy trình chiết xuất cao chứa astragalosid IV được thực hiện đơn giản hơn theo quy trình ĐDVN V như sau: 2,5 kg dược liệu được sấy nhẹ ở 60 °C trong 12 giờ, để nguội, xay thành bột thô, trộn đều. Tiến hành chiết 3 lần, mỗi lần 5 lít methanol. Gộp các dịch lọc đem cô quay chân không ở 60 °C đến dạng cao đặc. Thêm 1 lít dung dịch natri hydroxyd 10 %, đun hồi lưu 4 giờ, để nguội. Lắc dung dịch thu được với *n*-butanol bão hòa 3 lần, mỗi lần 500 ml bằng máy khuấy cơ Heidolph với tốc độ 900 vòng/phút trong 60 phút. Gộp các dịch chiết *n*-butanol và cô quay chân không 60 °C thu được cao đặc Hoàng kỳ (50 g).



Hình 1. Sắc kí đồ HPTLC khi xử lí mẫu theo ĐDVN V (1, 2, 3) và theo EP 11.0 (4, 5, 6) so với đường chuẩn astragalosid IV từ 20-600 ppm

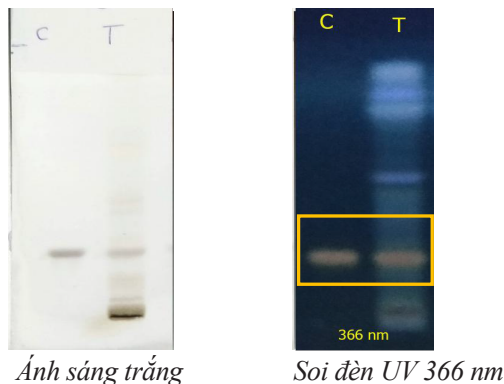
3.1.2. Phân lập và tinh chế astragalosid IV

Lựa chọn điều kiện dung môi tách chất astragalosid IV
Dựa trên các tài liệu tham khảo tiến hành khảo sát trên các hệ pha động:

- + CHCl₃:MeOH:H₂O (13:7:2) (Lắc lấy lớp dưới) (tt/tt/tt) (Hệ 1) [1], [2]
- + EtOAc:MeOH:H₂O (100:13,5:10) [4] (tt/tt/tt) (Hệ 2)
- + CHCl₃:EtOAc:MeOH:H₂O (22:40:22:10) (Hệ 3)

(Lắc lấy lớp dưới) (tt/tt/tt)

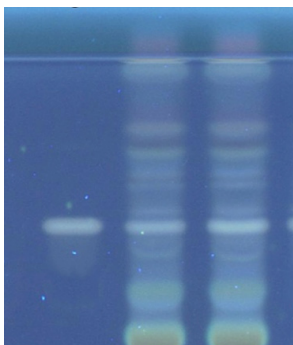
Kết quả sắc kí của các hệ pha động [1, 3, 5] đều cho pic astragalosid IV được tách ra hoàn toàn khỏi các chất khác có trong dịch chiết dược liệu, tuy nhiên hệ 1 là CHCl₃:MeOH:H₂O (13:7:2) và hệ 3: CHCl₃:EtOAc:MeOH:H₂O (22:40:22:10) được lắc lấy lớp dưới rồi tiến hành sắc ký nên khó áp dụng hệ pha động này để chạy cột nhồi silica gel để tách chất astragalosid IV



Hình 2. SKĐ hệ pha động EtOAc:MeOH:H₂O (100:13,5:10) (Hệ 2) tham khảo USP 44 (Phun thuốc thử acid sulfuric 10% trong ethanol)

Hệ pha động 2: EtOAc:MeOH:H₂O (100:13,5:10) tham khảo USP 44 astragalosid IV được tách ra hoàn toàn khỏi các chất khác có trong dịch chiết (hình 2) [4], hệ dung môi đồng nhất dễ sử dụng chạy sắc ký cột tách chất và dung môi ít độc hơn. Vì vậy, hệ dung môi EtOAc:MeOH:H₂O được lựa chọn để phân lập astragalosid IV trong cao methanol [5].

Tiến hành lần lượt tách chất astragalosid IV trên 2 cột sắc ký pha thuận như sau:



Hình 3. SKĐ chất chuẩn astragalosid IV (a), mẫu thử (b,c) và chất tinh chế sau phân lập (d)

- Cột 1: hoà tan cấn trong khoảng 50 ml methanol đưa lên cột thủy tinh đường kính 10 cm, được nhồi 500 g silica gel, cỡ hạt 63 - 230 μm , rửa giải bằng hỗn hợp dung môi EtOAc:MeOH:H₂O (85:15:1). Kiểm tra sự có mặt của astragalosid IV trong các lọ hứng bằng TLC (Mục 2.2.2). Gộp các lọ có astragalosid IV, cất thu hồi dung môi đến cạn thu được **cấn A** (15 g).

- Cột 2: hoà tan cấn trong khoảng 20 ml methanol đưa lên cột thủy tinh đường kính 6 cm, được nhồi 200 g silica gel, cỡ hạt 40-63 μm , rửa giải bằng hỗn hợp dung môi EtOAc:MeOH:H₂O (90:10:1). Kiểm tra sự có mặt của astragalosid IV trong các lọ hứng bằng TLC (Mục 2.2.2).

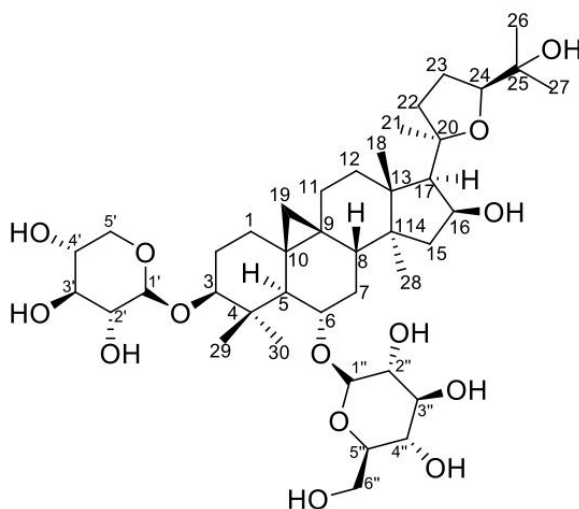
Gộp các lọ có astragalosid IV, cất thu hồi dung môi đến cạn thu được **cấn B** (4,2 g). Cấn B trên SKĐ (hình 3) vẫn còn những vết tạp nên tiến hành rửa cấn B bằng methanol nhiều lần thu được 3,5 g chất tinh khiết astragalosid IV. Hút khô chân không thu được nguyên liệu thiết lập chất chuẩn astragalosid IV.

3.2. Khẳng định cấu trúc và xác định hàm lượng chất chuẩn astragalosid IV

3.2.1. Khẳng định cấu trúc của chất tinh chế được là astragalosid IV

Chất tinh chế được dưới dạng chất rắn màu trắng, HRMS m/z 785.4623 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 807.4425 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, mp 294-296°C, ¹H-NMR (600 MHz, C₅D₅N): δ_{H} (ppm) 0.15 (1H, br. s, H-19a); 0.51 (1H, br. s, H-19b); 0.91, 1.25, 1.26, 1.27, 1.34, 1.52, 1.92 (s, 7CH₃), 3.44 (1H, m, H-3), 3.72 (1H, m, H-6), 3.82 (1H, m, H-24), 4.76 (1H, d, J = 6.6 Hz, H-1' của D-xylose), 4.81 (1H, d, J = 7.2 Hz, H-1'' của D-glucose), 4.91 (1H, d, J = 6.6 Hz, H-16). ¹³C-NMR (150 MHz, C₅D₅N) δ_{C} (ppm) 16.49 (C-30), 19.65 (C-18), 20.88 (C-28), 20.92 (C-9, C-28), 25.97 (C-11), 26.22 (C-23), 26.76 (C-26), 27.84 (C-21), 28.35 (C-27, C-29), 28.67 (C-19), 28.78 (C-10), 29.96 (C-2), 32.01 (C-1), 33.18 (C-12), 34.38 (C-7), 34.69 (C-22), 42.44 (C-4), 44.88 (C-13), 45.52 (C-8), 45.72 (C-15), 46.02 (C-14), 52.23 (C-5), 58.00 (C-17), 62.67 (C-6''), 66.69 (C-5'), 70.87 (C-4'), 71.10 (C-25), 71.47 (C-4''), 73.21 (C-16), 75.22 (C-2', C-2''), 77.79 (C-5''), 78.01 (C-3'), 78.67 (C-3''), 79.12 (C-6), 81.49 (C-24), 87.11 (C-20), 88.39 (C-3), 104.89 (C-1'), 107.30 (C-1').

Dựa vào các dữ liệu phổ HR-ESI-MS, 1D-NMR và so sánh số liệu phổ với tài liệu tham khảo xác định được chất là astragalosid IV [6, 7], công thức cấu tạo được chỉ ra ở hình 4.

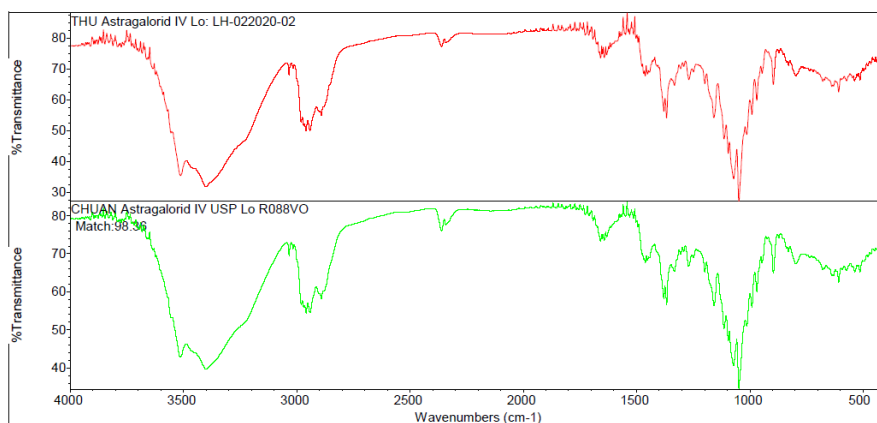


Hình 4. Công thức cấu tạo của astragalosid IV

Phổ hồng ngoại (IR).

Phổ IR (KBr), ν_{\max} (cm^{-1}) của chất tinh chế được có các đỉnh đặc trưng tương đương các đỉnh đặc trưng

của chất chuẩn astragalosid IV với hệ số tương đồng là 98,36 % trên 90 % (hình 5).



Hình 5. Chồng phổ IR của chất tinh chế và chất chuẩn astragalosid IV

Từ kết quả giải phổ MS, NMR kết hợp chồng phổ IR của chất tinh chế và chất chuẩn khẳng định chất tinh chế được chính là astragalosid IV.

3.2.2. Xác định giá trị ấn định của chất chuẩn astragalosid IV

* Đóng lọ

3,5 g nguyên liệu chất chuẩn astragalosid IV được đóng lọ thủy tinh màu nâu 2 ml, khối lượng chất chuẩn trong mỗi lọ 12 mg, trong điều kiện đóng được theo dõi

bằng nhiệt ẩm kế: độ ẩm là 5 %, nhiệt độ 25,5 °C và nạp khí nitơ độ tinh khiết: 99,999 %.

* Xác định hàm lượng chất chuẩn astragalosid IV bằng phương pháp HPLC/ELSD

Tiến hành xác định hàm lượng chất tinh chế bằng phương pháp HPLC/ELSD như mô tả trong Mục 2.2.2, ghi sắc ký đồ, thời gian lưu và diện tích pic astragalosid IV trên sắc ký đồ dung dịch chuẩn và dung dịch thử. Căn cứ vào nồng độ dung dịch chuẩn, tính kết quả hàm lượng astragalosid IV trong mẫu thử (ống chuẩn).

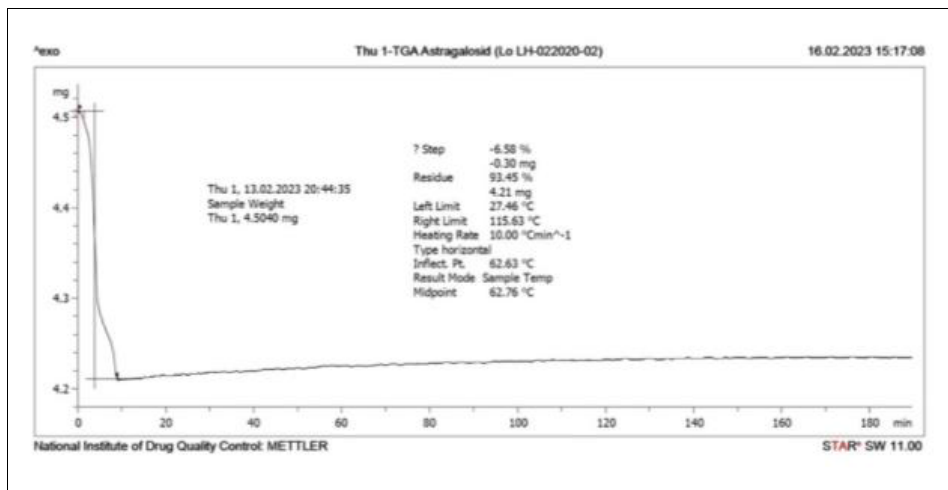
Kết quả thu được của KNV1 thực hiện trên 10 ống chuẩn lấy ngẫu nhiên để đánh giá độ đồng nhất của lô chất chuẩn và KNV2 được thực hiện 6 lần để đánh giá độ chính xác trung gian của phương pháp, so sánh sự sai khác về phương sai bằng test F (bảng 4) $F_m = 1,859 < F_{tc} = 4,772$, hai phương sai khác nhau không có ý nghĩa thống kê và giá trị trung bình bằng test t (bảng 4) $T_m = 0,573 < T_{tc} = 2,145$, kết quả trung bình của các lần phân tích giữa 2 KNV khác nhau không có ý nghĩa thống kê.

Kết quả trung bình của 16 ống chuẩn cho giá trị ấn

định của chất chuẩn astragalosid IV được đóng ống có hàm lượng là 96,00 %, tính theo nguyên trạng với độ không đảm bảo đo mở rộng ($U = 1,18 \%$) của giá trị công bố trên COA, hệ số phủ $k = 2$ ở độ tin cậy 95 %.

* Xác định mất khối lượng do làm khô bằng phương pháp TGA

Tiến hành cân khoảng 5 mg chất chuẩn trong cốc đo và tiến hành đo trên thiết bị TGA theo chương trình cài đặt (mục 2.2.2), kết quả mất khối lượng do làm khô là 6,48 % trình bày ở hình 6.



Hình 6. Kết quả mất khối lượng do làm khô bằng TGA của mẫu chất chuẩn astragalosid IV

4. KẾT LUẬN

Nghiên cứu đã xây dựng được quy trình chiết xuất, phân lập và tinh chế astragalosid IV bằng phương pháp chiết lỏng - lỏng và sắc ký cột pha thuận. Quy trình khá đơn giản, dễ tiến hành, sử dụng các dung môi hóa chất

thông dụng. Sau quá trình tinh chế thu được 3,50 g hợp chất tinh khiết và được khẳng định cấu trúc là astragalosid IV. Sản phẩm được đóng ống chuẩn lượng 10 mg/ống, xác định hàm lượng ghi trên nhãn tính trên nguyên trạng bằng HPLC/ELSD là 96,00 %.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Hội đồng Dược điển Việt nam, (2019), Hoàng Kỳ (Rễ) (*Radix Astragali membranacei*), *Dược điển Việt Nam V*, Nhà xuất bản Y học, Hà Nội, trang 1369-1370.
- Chinese Pharmacopoeia Commission - Ministry of Health (2020), *Pharmacopoeia of the People's Republic of China*, People's Medical Publishing House.
- European Directorate for the Quality of Medicine & HealthCare of the Council of Europe (EDQM), (2021), *European pharmacopoeia 11.0*, Council of Europe, France, pp. 1325-1326.
- The United States Pharmacopoeial Convention (2021), *The United States Pharmacopoeia 43 and the National Formulary 38*, The USA.
- Nguyễn Mai Hương, Ngô Minh Thúy, Nguyễn Lâm Hồng, (2024), Định lượng astragalosid IV trong dược liệu Hoàng kỳ bằng HPTLC, *Tạp chí nghiên cứu dược và thông tin thuốc*, Vol 19 (2024).
- He Z.-Q., Findlay J.A., (1991), Constituents of *Astragalus membranaceus*, *J Nat Prod.*, 54(3), pp 810-815.
- Mamedova R., Agzamova M., Isaev M., (2001), Triterpene glycosides of *Astragalus* and their genins. LXIII. Chemical transformation of cycloartanes. iv. Partial synthesis of trojanoside A, *Chem. Nat. Compd.*, 37(6), pp. 529-53.