

STUDY ON EXTRACTION, ISOLATION AND PURIFICATION OF β -ECDYSTERON FROM *CYANOTIS ARACHNOIDEA* EXTRACT FOR REFERENCE STANDARD ESTABLISHMENT

VU TRONG KHOA^{1,✉}, NGUYEN THI THU HANG¹, TRAN THI THU TRANG¹
NGUYEN TUAN ANH¹, DOAN CAO SON¹, NGUYEN LAM HONG²

¹National Institute of Drug Quality Control

²Hanoi University of Pharmacy

✉ Corresponding author: vutrongkhoa94@gmail.com

Received January 14th, 2025

Accepted March 10th, 2025

Abstract: In Vietnam and China, *Radix Achyranthis bidentatae* has been widely used as a traditional herbal. With reference to the quality of *Radix Achyranthis bidentatae*, its content of β -ecdysteron quantified by HPLC/DAD is specified to be not less than 0.03 %. For the quality control of *Radix Achyranthis bidentatae*, the establishment of β -ecdysteron as an affordable-price reference standard is prerequisite in Vietnam. In this study, 1.1 g of β -ecdysteron was isolated and purified from 500 g of *Cyanotis arachnoidea* Extract. The structure of β -ecdysteron was confirmed by ¹H, ¹³C-NMR, HR-MS, IR, UV-VIS..., as compared to the corresponding spectra of β -ecdysteron reference standard. The content of β -ecdysteron in our purified samples was determined to be 92.4 % by HPLC-DAD analysis.

Keywords: β -ecdysteron, *Radix Achyranthis bidentatae*, *Cyanotis arachnoidea*, extraction, isolation, purification.

NGHIÊN CỨU XÂY DỰNG QUY TRÌNH CHIẾT XUẤT, PHÂN LẬP VÀ TINH CHẾ β -ECDYSTERON TỪ CAO DƯỢC LIỆU BÍCH TRAI NHỆN (*CYANOTIS ARACHNOIDEA*) LÀM NGUYÊN LIỆU THIẾT LẬP CHẤT CHUẨN

VŨ TRỌNG KHOA^{1,✉}, NGUYỄN THỊ THU HẰNG¹, TRẦN THỊ THU TRANG¹
NGUYỄN TUẤN ANH¹, ĐOÀN CAO SƠN¹, NGUYỄN LÂM HỒNG²

¹Viện Kiểm nghiệm Thuốc Trung Ương

²Trường Đại học Dược Hà Nội

✉ Tác giả liên hệ: vutrongkhoa94@gmail.com

Nhận bài ngày 14 tháng 01 năm 2025

Chấp nhận đăng ngày 10 tháng 3 năm 2025

Tóm tắt: Tại Việt Nam và Trung Quốc, Ngưu tất (*Radix Achyranthis bidentatae*) là một dược liệu được sử dụng rộng rãi. Về yêu cầu chất lượng được quy định, dược liệu Ngưu tất phải chứa không ít hơn 0,03 % β -ecdysteron tính theo dược liệu khô kiệt. Để kiểm soát chất lượng dược liệu này cần có thiết lập được nguồn

chất chuẩn β -ecdysteron sẵn có với giá thành hợp lý tại nước ta. Nghiên cứu này đã chiết xuất, phân lập và tinh chế được 1,1 g β -ecdysteron từ 500 g cao Bích trai nhện (*Cyanotis arachnoidea*). Cấu trúc chất tinh chế được khẳng định qua phổ UV-VIS, IR, MS, NMR bằng cách so sánh với phổ của chất chuẩn. Hàm lượng β -ecdysteron thu được đạt 92,4 % phân tích bằng phương pháp HPLC-DAD.

Từ khóa: β -ecdysteron, Ngưu tất, *Radix Achyranthis bidentatae*, Bích trai nhện, *Cyanotis arachnoidea*, chiết xuất, phân lập, tinh chế.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Ngưu tất (*Radix Achyranthis bidentatae*) là một trong những vị dược liệu thuộc danh mục 100 dược liệu có giá trị y tế và kinh tế cao để tập trung phát triển giai đoạn 2020-2030 theo Quyết định số 3657/QĐ-BYT ban hành ngày 20 tháng 8 năm 2019. Ngưu tất có tác dụng hoạt huyết thông kinh, mạnh gân cốt, bổ can thận, vì vậy dùng chủ trị: đau lưng gối, mỏi gân xương; bế kinh, kinh nguyệt không đều, tăng huyết áp. [1] Nhiều sản phẩm thuốc và thực phẩm chức năng chứa thành phần là dược liệu Ngưu tất: Độc hoạt tang ký sinh, viên phong thấp Topphote, Khương thảo đan, ... Để kiểm soát chất lượng dược liệu Ngưu tất, Dược điển Trung Quốc 2020, dược điển Việt Nam V và Bộ tiêu chuẩn quốc gia về thuốc sửa đổi 1:2024 TCVN I-4:2017 đã sử dụng chất chuẩn β -ecdysteron trong phép thử định tính và định lượng. Tuy nhiên, hiện nay chưa có sẵn chất chuẩn này trong nước, nguồn cung cấp chất chuẩn này là từ nước ngoài với giá thành cao, thời gian vận chuyển dài.

Cây Bích trai nhện, tên khoa học là *Cyanotis arachnoidea* C. B. Clarke, họ Thài lài (Commelinaceae) là một cây bản địa ở Trung Quốc được biết đến có hàm lượng β -ecdysteron cao, hàm lượng β -ecdysteron trong rễ có thể lên đến khoảng 4-5 %. Hiện nay trên thị trường đang lưu hành khá phổ biến dạng cao khô được chiết xuất từ rễ của dược liệu này, dạng này tạo thuận lợi cho việc chiết xuất khi bỏ qua được bước chiết tạo cao toàn phần từ dược liệu. Chuẩn β -ecdysteron của dược điển Châu Âu (EP - lô Y0002054), hàm lượng 84,8 %, cũng được công bố chiết theo loài thực vật này.

Xuất phát từ nhu cầu thực tiễn đòi hỏi phải có chất chuẩn β -ecdysteron nhằm bổ sung vào quỹ chất chuẩn quốc gia để phục vụ công tác kiểm tra và quản lý chất lượng dược liệu Ngưu tất và các sản phẩm chứa Ngưu tất cùng các điều kiện thực tế, rất cần thiết tiến hành nghiên cứu “Xây dựng quy trình chiết xuất, phân lập và tinh chế β -ecdysteron từ cao dược liệu Bích trai nhện (*Cyanotis arachnoidea*) làm nguyên liệu thiết lập chất chuẩn”.

2. THỰC NGHIỆM

2.1. Thiết bị, dụng cụ, hóa chất, chất chuẩn

2.1.1. Thiết bị, dụng cụ

- Thiết bị: Máy lắc siêu âm ELMASONIC S100; Máy cô quay chân không Buchi; Máy HPLC/DAD Shimadzu UFLC (Khoa Đông dược, dược liệu - Viện kiểm nghiệm thuốc Trung ương); Máy quang phổ hồng ngoại THERMO (Khoa Vật lý đo lường - Viện kiểm nghiệm thuốc Trung ương); Máy cộng hưởng từ hạt nhân NMR – BRUKER – 600MHZ & 500MHZ (Viện Hoá học - Viện Hàn lâm khoa học và công nghệ Việt Nam); Máy LC/MS Xevo TQD, Waters (Khoa Mỹ phẩm - Viện kiểm nghiệm thuốc Trung ương) ...

- Dụng cụ: Bình định mức, pipet, cột sắc ký, ống đông, bình cầu cô quay...

2.1.2. Hóa chất, chất chuẩn

Methanol, ethanol, n-butanol, ethyl acetat, dicloromethan, acetonitril, acid formic: các dung môi, hóa chất có độ tinh khiết phù hợp dùng cho phân tích hoặc sắc ký HPLC.

β -ecdysteron – chất chuẩn của ông ty Chengdu Biopurify phytochemicals Ltd- Trung Quốc, số lô: BP0262, hàm lượng: 98 %.

2.2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Đối tượng nghiên cứu

- Cao dược liệu Bích trai nhện (*Cyanotis arachnoidea* Extract): cao khô chiết từ rễ cây Bích trai nhện, nhà cung cấp: công ty Xi'an Nate Biological Technology Co., Ltd.

2.2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.2.1. Chiết xuất, phân lập và tinh chế β -ecdysteron

Tiến hành khảo sát dung môi, kỹ thuật chiết ban đầu để đưa ra quy trình chiết xuất cao đặc chứa β -ecdysteron với hàm lượng cao. Tiếp tục tiến hành phân lập β -ecdysteron từ cao đặc qua lần lượt trên các cột silica gel pha thuận

và pha đảo để loại tạp và thu được β -ecdysteron với độ tinh khiết phù hợp. Sau đó, tiến hành kết tinh trong hỗn hợp dung môi methanol - ethyl acetat tỷ lệ 1:1, tạo tinh thể bằng cách bay hơi, hạ nhiệt độ để nâng cao độ tinh khiết của β -ecdysteron thu được [3-5].

Trong quá trình chiết xuất, phân lập và tinh chế, tiến hành kiểm tra sự có mặt của β -ecdysteron bằng phương pháp sắc ký lớp mỏng pha thuận (sử dụng bản mỏng silica gel 60 F254 với hệ dung môi khai triển là hỗn hợp dicloromethan – methanol tỷ lệ 4:1 (tt/tt)) hoặc pha đảo (sử dụng bản mỏng silica gel 60 RP-18 GF254 với hệ dung môi khai triển là hỗn hợp ethanol - nước tỷ lệ 40:60 (tt/tt)). Kiểm tra vết các chất sau quá trình sắc ký bằng cách quan sát dưới ánh sáng tử ngoại ở bước sóng 254 nm [1, 2]. Cùng với đó để xác định sơ bộ hàm lượng β -ecdysteron sau mỗi bước, nghiên cứu sử dụng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) được trình bày cụ thể trong mục 2.2.2.3.

2.2.2.2. Khảo định cấu trúc β -ecdysteron

So phổ UV, IR, MS, NMR của chất tinh chế và chất chuẩn β -ecdysteron để khẳng định chất sau tinh chế được là β -ecdysteron. Chất nghiên cứu đảm bảo độ tinh khiết dự kiến bằng các phương pháp trên sẽ được xác định cấu trúc và bộ dữ liệu nhận dạng bằng phương pháp quang phổ hồng ngoại, phổ UV-VIS, phổ cộng hưởng từ hạt nhân (NMR) và phổ khối (MS)

- Phổ UV: xác định phổ bằng detector DAD trên HPLC, mẫu được hòa tan trong methanol để được nồng độ khoảng 0,4 mg/ml

- Phổ IR: ghi phổ hồng ngoại của chất tinh chế và chất chuẩn vùng từ 400 đến 4000 cm^{-1}

- Phổ MS: xác định các mảnh phổ thu được khi cho mẫu tinh chế và mẫu thử pha trong methanol qua detector MS/MS của máy HPLC

- Phổ NMR: các mẫu được hòa tan trong MeOD và đo phổ cộng hưởng từ ^1H và ^{13}C

2.2.2.3. Định tính, định lượng β -ecdysteron: bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC)

a. Điều kiện sắc ký: Quá trình sắc ký được thực hiện trên cột pha đảo Phenomenex Gemini RP-18 (250 × 4,6 mm; 5 μm); sử dụng pha động là hỗn hợp hỗn hợp acetonitril – dung dịch acid formic 0,1 % tỷ lệ 16:84 (tt/tt); tốc độ dòng 1,0 ml/phút; thể tích tiêm 10 μl ; bước sóng phát hiện: 250 nm [1, 2].

b. Phương pháp chuẩn bị mẫu:

Dung dịch chuẩn: Cân chính xác khoảng 10 mg β -ecdysteron (chất chuẩn) vào trong bình định mức 25 ml, thêm khoảng 20 ml methanol, lắc siêu âm 15 phút, để nguội và thêm vừa đủ đến vạch bằng methanol, lắc đều.

Dung dịch thử: Cân chính xác khoảng 10 mg mẫu thử vào trong bình định mức 25 ml, thêm khoảng 20 ml methanol, lắc siêu âm 15 phút, để nguội và thêm vừa đủ đến vạch bằng methanol, lắc đều.

Quy trình định tính, định lượng β -ecdysteron bằng phương pháp HPLC với detector DAD được thẩm định qua các chỉ tiêu về độ đặc hiệu, độ thích hợp hệ thống, khoảng tuyến tính, độ đúng, độ chính xác. Quá trình thẩm định tuân theo Hướng dẫn thẩm định phương pháp phân tích của Bộ y tế được trình bày trong Phụ lục 1 - Thông tư 32/2018/TT - BYT.

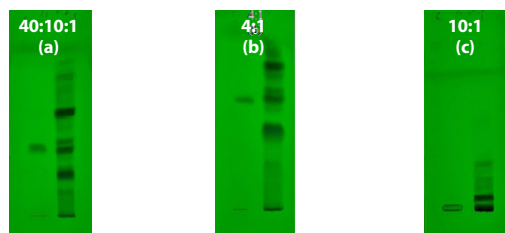
3. KẾT QUẢ

3.1. Xây dựng quy trình chiết xuất, phân lập và tinh chế β -ecdysteron

Qua tham khảo Dược điển Trung Quốc (CP 2020), Dược điển Việt Nam V, các tài liệu tham khảo và dựa vào tính chất của chất nghiên cứu, tiến hành khảo sát một số điều kiện chiết xuất để lựa chọn được quy trình cho hiệu suất chiết β -ecdysteron cao [6-8] .

So với chiết từ dược liệu Nguưu tất, khi chiết từ cao khô Bích trai nhện (*Cyanotis arachnoidea* C.B. Clarke, họ Thài lài Commelinaceae), một cây bản địa ở Trung Quốc có hàm lượng β -ecdysteron cao sẽ bỏ qua được bước chiết đun hồi lưu tạo cao toàn phần. Từ cao khô khảo sát dung môi chiết cho thấy dịch chiết bằng cách chiết lỏng lỏng với butanol và chiết siêu âm với ethanol không có khác biệt về hàm lượng β -ecdysteron. Vì vậy chiết siêu âm với ethanol được lựa chọn.

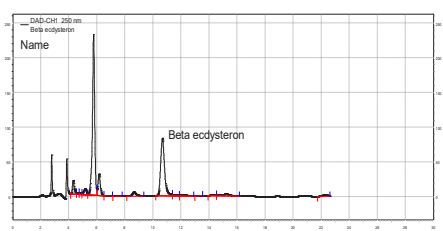
Cao đặc thu được từ dịch chiết ethanol, được tiến hành phân lập thô bằng phương pháp sắc ký cột pha thuận nhồi silica gel 60, để lựa chọn dung môi pha động, tiến hành khảo sát trên bảng với pha động CH_2Cl_2 – MeOH – H_2O (40:10:1) (Hình 1a) và CH_2Cl_2 – MeOH – H_2O (4:1) (Hình 1b). Sắc ký đồ cho thấy vết β -ecdysteron tách được khá nhiều tạp chất và Rf của β -ecdysteron khi chạy bằng pha động Hệ (4:1) cao hơn so với Hệ (40:10:1). Vì vậy thành phần pha động được chọn là hỗn hợp dung môi CH_2Cl_2 – MeOH. Tiếp tục khảo sát tỷ lệ thành phần pha động ở tỷ lệ CH_2Cl_2 – MeOH (4:1) và (10:1) thu được kết quả như hình: Sắc ký đồ cho thấy hệ (4:1) rửa giải được nhanh hơn với hệ (10:1) (Hình 1c).



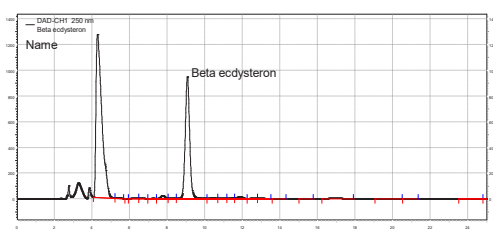
Hình 1. TLC khảo sát dung môi triển khai cột pha thuận tách β -ecdysteron

Dựa trên kết quả khảo sát, quy trình phân lập bước đầu sẽ sử dụng Cột 1 (NP1) nhồi silica gel 60 kích cỡ hạt lớn

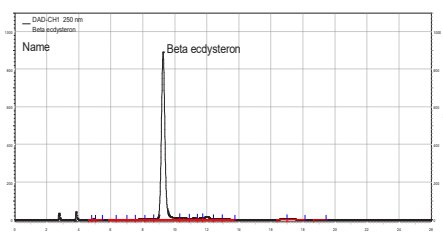
(63-200 mm) và rửa giải bằng hệ (4:1) để phân tách nhanh tiết kiệm dung môi và loại bỏ các tạp chất, chất mang màu. Sau đó tiếp tục đưa lên cột 2 (NP2) nhồi silica gel 60 cỡ hạt nhỏ hơn (40 - 63 mm) và rửa giải bằng hệ (10:1) để rửa giải các chất chậm hơn giúp loại tạp được tốt hơn và thu được các phân đoạn chứa β -ecdysteron sạch hơn. Các phân đoạn chứa β -ecdysteron được chấm đối chiếu với dung dịch chuẩn β -ecdysteron nồng độ 0,5 mg/ml trong methanol trên sắc ký lớp mỏng với hệ dung môi pha động là $\text{CH}_2\text{Cl}_2 - \text{MeOH}$ (4:1), cô quay chân không được 4 g căn B (Hàm lượng β -ecdysteron khoảng 60 %, Hình 2b), cần tiếp tục phân lập trên cột pha đảo.



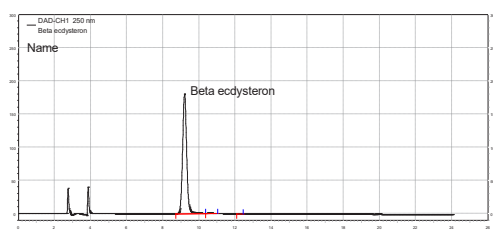
Cao đặc (a)



Căn B - Sau khi qua cột silica gel pha thuận (a)



Căn C - Sau khi qua cột silica gel pha đảo (c)

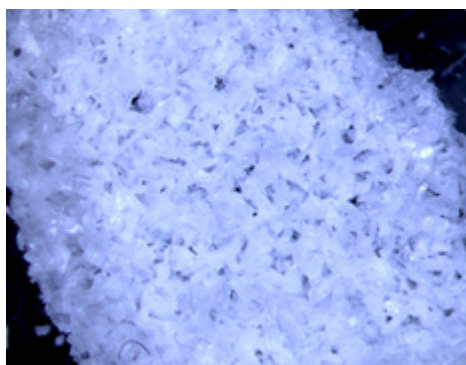


Căn D - 92,4 % β -ecdysteron (d)

Hình 2. Sắc ký đồ HPLC xác định β -ecdysteron trong các căn sau từng giai đoạn phân lập

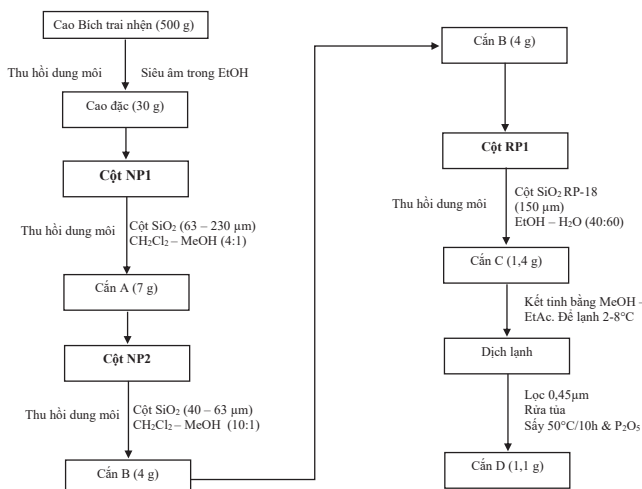
Lấy 4 g căn B tiếp tục tiến hành phân lập tinh bằng phương pháp sắc ký cột pha đảo với nhồi silica gel pha đảo RP-18 (150 mm) (Cột 3 – RP1), rửa giải bằng hệ dung môi là ethanol – nước (40:60) (đã khảo sát qua các tỷ lệ 40:60, 50:50, 20:80). Gộp các phân đoạn chứa β -ecdysteron thu được 1,4 g căn C (Hình 2c-độ tinh khiết

β -ecdysteron khoảng 80 %). Căn C được kết tinh trong hệ dung môi methanol – ethyl acetat thu được 1,1 g căn D với hàm lượng β -ecdysteron khoảng 92,4 % theo nguyên trạng. Hàm lượng β -ecdysteron trong các mẫu được xác định bằng HPLC/DAD theo chương trình sắc ký của mục 2.



Hình 3. Tinh thể kết tinh β -ecdysteron

Tổng hợp lại quá trình chiết xuất, phân lập và tinh chế β -ecdysteron từ cao dược liệu Bích trai nhện được tóm tắt qua sơ đồ sau:



Hình 4. Sơ đồ tóm tắt quy trình chiết xuất, phân lập và tinh chế β -ecdysteron từ cao dược liệu Bích trai nhện

3.2. Khẳng định cấu trúc β -ecdysteron

Hợp chất thu được dưới dạng bột màu trắng, tan trong methanol, ethanol được tiến hành đo phổ hồng ngoại, kiểm tra phổ khối, phổ UV-VIS và phổ NMR so sánh với chất chuẩn để khẳng định cấu trúc.

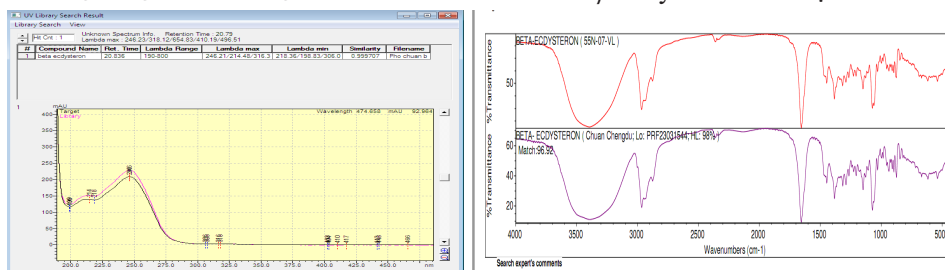
Phổ hồng ngoại của hợp chất sau tinh chế tương ứng với phổ hồng ngoại của chất chuẩn β -ecdysteron với hệ số tương đồng lên tới 96,92 %. Trong phần định lượng nguyên liệu β -ecdysteron sau tinh chế, sắc ký đồ của mẫu thử cho pic chính có thời gian lưu (20,788 phút) và phổ UV tương ứng với thời gian lưu (20,836 phút) và phổ UV của pic chính trên sắc ký đồ mẫu chuẩn, hệ số tương đồng phổ là 0,9998 và độ tinh khiết pic 1,000000.

Trên phổ khối lượng MS của nguyên liệu sau tinh chế xuất hiện pic ion phân tử giả $[M-H]^-$ tại $m/z \approx 479,2$. Kết quả này phù hợp với số khối của ion $C_{27}H_{43}O_7$, qua đó cho phép xác định công thức phân tử của chất tinh chế là $C_{27}H_{44}O_7$, tương ứng với khối lượng phân tử của β -ecdysteron ($M = 480,6$ g/mol).

Ngoài ra, kết quả so sánh phổ 1H -NMR và ^{13}C -NMR cũng cho thấy sự tương đồng về cấu trúc giữa mẫu sau tinh

chế và mẫu β -ecdysteron chuẩn. Phổ của hai mẫu chuẩn và thử trùng khít nhau và có các thông số đặc trưng sau: 1H -NMR (MeOD, δ H, ppm): 1,82 (m, H-1 α), 1,45 (m, H-1 β), 3,86 (m, H-2), 3,97 (d, 1,8Hz, H-3), 1,72 (m, 2H-4), 2,41 (m, H-5), 5,83 (d, 2,4Hz H-7), 3,17 (t, 9,0Hz, H-9), 1,82 (m, H-11 α), 1,72 (m, H-11 β), 2,15 (dt, 13,2Hz, 4,8Hz, H-12 α), 1,90 (dt, 12,6Hz, 3,0Hz, H-12 β), 1,98 (m, H-15 α), 1,63 (dd, 21,0Hz, 12,0Hz, H-15 β), 1,72 (m, H-16 α), 1,98 (m, H-16 β), 2,41 (m, H-17), 0,91 (s, 3H-18), 0,99 (s, 3H-19), 1,22 (s, 3H-21), 3,34 (t, 9,6Hz, H-22), 1,68 (m, H-23 α), 1,30 (m, H-23 β), 1,82 (m, H-24 α), 1,45 (m, H-24 β), 1,21 (s, 3H-26), 1,22 (s, 3H-27). ^{13}C -NMR (MeOD, δ C, ppm): 18,1 (C-18), 21,1 (C-21), 21,5 (C-11), 21,5 (C-16), 24,4 (C-19), 27,3 (C-23), 29,0 (C-26), 29,7 (C-27), 31,8 (C-15), 32,5 (C-12), 32,8 (C-4), 35,1 (C-9), 37,4 (C-1), 39,3 (C-10), 42,4 (C-24), 48,6 (C-13), 50,5 (C-17), 51,8 (C-5), 68,5 (C-3), 68,7 (C-2), 71,3 (C-25), 77,9 (C-20), 78,4 (C-22), 85,2 (C-14), 122,1 (C-7), 168,0 (C-8), 206,5 (C-6).

Tất cả các kết quả phân tích trên đều giúp chỉ ra sự tương đồng giữa chất nghiên cứu và β -ecdysteron chuẩn. Như vậy có thể khẳng định rằng hợp chất sau tinh chế chính là β -ecdysteron như mục tiêu của nghiên cứu này.



Hình 5. Hình ảnh so sánh phổ UV và IR của mẫu β -ecdysteron tinh chế được và mẫu chuẩn

3.3 Xây dựng và thẩm định phương pháp định tính, định lượng β -ecdysteron bằng phương pháp HPLC với detector DAD.

Tiến hành định lượng β -ecdysteron trong nguyên liệu thiết lập chuẩn bằng phương pháp HPLC-DAD theo điều kiện đã nêu trong Mục 2.2.2.3. Kết quả thẩm định phương pháp thu được như sau

3.3.1. Độ đặc hiệu

Chuẩn bị mẫu trắng, mẫu chuẩn và mẫu thử và tiến hành triển khai sắc ký. Mẫu dung môi không có pic tại thời gian lưu tương ứng với thời gian lưu của pic β -ecdysteron trên sắc ký đồ dung dịch chuẩn nên không ảnh hưởng tới phép thử. Thời gian lưu của pic β -ecdysteron trên sắc ký đồ của dung dịch mẫu thử (20,788 phút) và dung dịch mẫu chuẩn (20,836 phút) là tương đồng. Phổ UV của pic β -ecdysteron trên sắc ký đồ của mẫu thử và chuẩn giống nhau. Kết quả chồng phổ cho hệ số similarity là 0,9997.

Bảng 1: Kết quả khảo sát khoảng tuyến tính

STT	Nồng độ ($\mu\text{g/ml}$)	Diện tích (mAu.s)
1	208,66	3128821
2	312,98	4578476
3	417,31	6066802
4	521,64	7930017
5	625,97	9623793
$Y = 15663,63X - 271012$ Hệ số tương quan: 0,999 Hệ số tương quan (correl): 1,000 (%) hệ số chẵn: 0,05 %		

3.3.4. Độ đúng

Chuẩn bị mẫu thử thêm chuẩn β -ecdysteron ở các nồng độ 80 – 120 % so với nồng độ định lượng và triển khai sắc

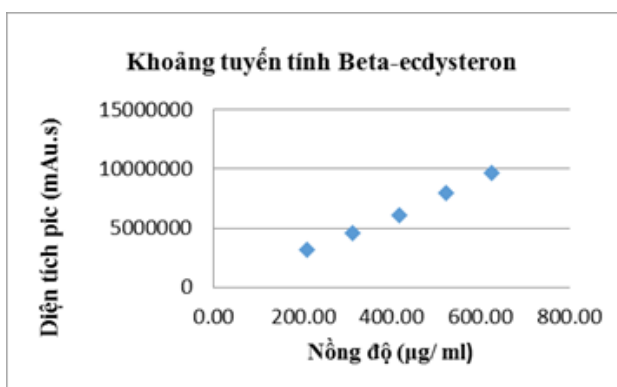
Độ tinh khiết pic (Peak purity) của pic β -ecdysteron trên sắc ký đồ của dung dịch mẫu thử đạt 1,000000.

3.3.2. Độ thích hợp hệ thống

Tiêm vào hệ thống sắc ký 6 lần dung dịch chuẩn β -ecdysteron 0,4 mg/ml được chuẩn bị trong phần độ đặc hiệu. Ghi lại các SKĐ, xác định các thông số thời gian lưu, diện tích pic của pic β -ecdysteron. Độ lệch chuẩn tương đối (RSD %) của thời gian lưu là 0,04 % và diện tích pic là 0,74 %, đều nhỏ hơn 2,0 %. Số đĩa lý thuyết tính theo pic chuẩn β -ecdysteron đạt 13310, lớn hơn 3000.

3.3.3. Khoảng tuyến tính

Tiến hành chuẩn bị dãy dung dịch chuẩn β -ecdysteron có nồng độ từ 0,2 – 0,6 mg/ml và triển khai sắc ký. Kết quả cho thấy có sự tương quan tuyến tính chặt chẽ giữa diện tích pic β -ecdysteron và nồng độ khảo sát với hệ số tương quan $r = 0,999$.



ký. Độ thu hồi của các mẫu tự tạo gần sát mức 100 % với % RSD nhỏ

Bảng 2: Kết quả độ đúng

Mẫu tự tạo	Khối lượng cân thử (mg)	Khối lượng cân chuẩn (mg)	Diện tích pic (mAu.s)	Lượng thực tế (mg)	Lượng thêm vào (mg)	% Thu hồi	% TB	% RSD
80.1	5,52	3,02	4662237	8,090	2,985	98,74	99,06	0,38
80.2	5,36	3,02	4589594	7,964	3,007	99,47		
80.3	5,58	3,02	4697976	8,152	2,992	98,96		
100.1	5,16	5,04	5628210	9,767	4,995	99,12	98,83	0,53
100.2	5,08	5,04	5559429	9,647	4,949	98,22		
100.3	5,39	5,04	5751339	9,980	4,996	99,14		
120.1	5,81	7,05	7153500	12,414	7,040	99,80	100,05	0,33
120.2	5,98	7,05	7249773	12,581	7,050	99,94		
120.3	6,12	7,05	7344124	12,744	7,084	100,42		

3.3.5. Độ chính xác

- Độ lặp lại: Chuẩn bị 6 mẫu thử ở nồng độ chính xác khoảng 0,4 mg/ml và tiến hành sắc ký theo điều kiện đã nêu.

- Độ chính xác trung gian: Tiến hành tương tự như phần độ lặp lại nhưng khác ngày, khác kiểm nghiệm viên, kết quả được thể hiện ở Bảng 3.

Bảng 3. Kết quả độ chính xác

Độ lặp lại Lượng cân chuẩn: 10,38 mg Diện tích pic: 5872911 mAu.S		Độ chính xác trung gian Lượng cân chuẩn: 10,26 mg Diện tích pic: 5712053 mAu.S	
Stt	Hàm lượng (%)	Stt	Hàm lượng (%)
1	93,76	1	92,27
2	91,50	2	91,54
3	92,24	3	92,96
4	92,64	4	92,10
5	92,30	5	92,73
6	92,46	6	92,45
Trung bình (%) n = 6		92,48	Trung bình (%) n = 6
RSD (%) n = 6		0,80	0,54
Kết quả định lượng trung bình (n = 12): 92,41 % với RSD=0,54 %			

Đối với kết quả thực hiện bởi 2 kiểm nghiệm viên, độ lệch chuẩn tương đối RSD (%) hàm lượng (%) của mỗi KNV (n = 6) là 0,80 % và 0,54 % (< 2,0 %), của cả 2 KNV (n = 12) là 0,54 % (< 2,0 %).

Qua thẩm định phương pháp định tính, định lượng β -ecdysteron cho thấy phương pháp có độ đặc hiệu tốt, khoảng tuyến tính xây dựng có sự tương quan tuyến tính chặt chẽ diện tích pic và nồng độ β -ecdysteron; phương pháp xây dựng có độ chính xác cao; độ đúng của phương pháp xây dựng có tỷ lệ thu hồi đạt yêu cầu. Như vậy phương pháp có thể áp dụng để định tính, định lượng β -ecdysteron trong nguyên liệu β -ecdysteron dùng để thiết lập chuẩn. Áp dụng quy trình đã xác định được kết quả chất tinh chế có hàm lượng β -ecdysteron là 92,4 %, tính theo nguyên trạng.

4. KẾT LUẬN VÀ BÀN LUẬN

Nghiên cứu này đã xây dựng được quy trình chiết xuất, phân lập và tinh chế β -ecdysteron, từ 500 g cao dược liệu Bích trai nhện đã thu được 1,1 g β -ecdysteron làm nguyên liệu thiết lập chất chuẩn. Nguyên liệu thiết lập chất chuẩn β -ecdysteron đã được khẳng định cấu trúc gồm: bộ dữ liệu phổ NMR, HR-MS, IR, UV-VIS và xác định hàm lượng nguyên trạng của nguyên liệu thiết lập chất chuẩn β -ecdysteron là khoảng 92,4 % bằng cách so sánh với chất chuẩn gốc β -ecdysteron.

Hiệu suất của quy trình đạt 2,2 mg β -ecdysteron / 1 g cao dược liệu. Với hiệu suất này hoàn toàn có thể áp dụng quy trình chiết xuất, phân lập và tinh chế này ở quy mô phòng thí nghiệm để chủ động nguồn nguyên liệu β -ecdysteron cho quá trình thiết lập chất chuẩn β -ecdysteron. Chất chuẩn sau khi thiết lập có thể được sử dụng kiểm tra chất lượng dược liệu Ngưu tất trên thị trường, đáp ứng nhu cầu về chất chuẩn này đảm bảo không phụ thuộc vào nguồn chuẩn của nước ngoài với giá thành cao.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Bộ Y tế (2019), Ngưu tất (*Radix Achyranthis bidentatae*), *Dược điển Việt Nam V*, Nhà xuất bản Y học, tr. 1275-1276
- Chinese Pharmacopoeia Commission (2020), *Radix Achyranthis bidentatae*, *Pharmacopoeia of The People's Republic of China*, Volume Ia, tr. 7-8.
- Trần Tử An (2002), *Phương pháp chiết ứng dụng trong kiểm nghiệm thuốc và độc chất*, Tài liệu sau đại học, Trường Đại học Dược Hà Nội.
- Sarker S.D., Latif Z. and Gray A.I. (2006), *Natural products isolation*, Humana Press Inc Totowa, New Jersey, second edition
- Tsuda Y. (2004), *Isolation of natural products*, H.E.J. Research Institute of Chemistry, University of Karachi, Karachi 75270, Pakistan.
- Le Duc Dat, Ninh Thi Ngoc, Vu Anh Tu, et al. (2012), Ecdysteroids from *Achyranthes bidentata*, *Vietnam Journal of Chemistry*, vol. 50(5A), 254-258.
- Chuxiong baicaoling pharmaceutical development Co.ltd (2012), Cyanotis root extract rich in beta-ecdysone and preparation method thereof, Patent CN102872167B