

NGHIÊN CỨU PHƯƠNG PHÁP CHIẾT VÀ XÁC ĐỊNH HÀM LƯỢNG BRUCIN VÀ STRYCHNIN TỪ HẠT MÃ TIỀN CHẾ BẰNG HPLC

STUDY ON EXTRACTION METHOD AND DETERMINATION OF BRUCINE AND STRYCHNINE FROM *STRYCHNOS NUX-VOMICA* BY HPLC

Giang Thị Kim Liên¹, Trần Ngọc Đông², Nguyễn Thị Hoàng Anh³

¹Đại học Đà Nẵng; gtklien@ac.udn.vn

²Trường Cao đẳng Nguyễn Văn Trỗi

³Viện Hóa học – Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam

Tóm tắt - Mã tiền *Strychnos nux-vomica* được biết là nguồn chính của các alkaloid có độc tính cao như strychnin ($C_{21}H_{22}N_2O_2$) và brucin ($C_{23}H_{26}N_2O_4$), sử dụng trong y học. Nghiên cứu chiết tách, đánh giá hàm lượng của brucin và strychnin, hai alkaloid quan trọng trong Mã tiền chế là cơ sở cho việc sử dụng hiệu quả vị thuốc này. Bài báo này trình bày kết quả nghiên cứu phương pháp chiết brucin và strychnin bằng 3 phương pháp khác nhau. Đánh giá định tính brucin và strychnin trong 3 dịch chiết bằng sắc ký lớp mỏng, hệ dung môi $CH_2Cl_2:MeOH = 5:0,6$, phát hiện các chất bằng cách soi đèn tử ngoại, phun với thuốc thử Dragendoff, thuốc thử vanilin/ H_2SO_4 . Hàm lượng brucin và strychnin được phân tích bằng phương pháp lập đường chuẩn với thiết bị sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC).

Từ khóa - *Strychnos nux-vomica*; brucin; strychnin; alkaloid; sắc ký lỏng hiệu năng cao.

Abstract - *Strychnos nux-vomica* is known to be the main source of highly toxic alkaloids such as strychnine ($C_{21}H_{22}N_2O_2$) and brucine ($C_{23}H_{26}N_2O_4$), which are used in medicine. Study on the extraction, evaluation of the content of brucin and strychnin, two important alkaloids, extracted from *Strychnos nux-vomica* seeds is the basis for effective using of this drug. This article shows the results of extraction of total alkaloid by three different methods, qualitative evaluation of brucins and strychnin in three extractions by thin-layer chromatography method with the solvent of $CH_2Cl_2:MeOH=5:0.6$, detecting substances by ultraviolet light, spraying with Dragendoff reagent and vanillin/ H_2SO_4 reagent, quantitative evaluation by high performance liquid chromatography (HPLC) methods.

Key words - *Strychnos nux-vomica*; brucine; strychnine; alkaloid; HPLC.

1. Đặt vấn đề

Mã tiền *Strychnos nux-vomica* được biết là nguồn chính của các alkaloid có độc tính cao như strychnin ($C_{21}H_{22}N_2O_2$) và brucin ($C_{23}H_{26}N_2O_4$), sử dụng trong y học. Hạt của nó chứa khoảng 1,5% strychnin, còn hoa khô chứa khoảng 1,023% [1, 2]. Trong hạt Mã tiền có 15% manan, 85% galactan, 4-5% chất béo, một heterosid gọi là loganosit hay loganin (1,5%). Hạt Mã tiền chứa khoảng từ 2,6-3% alkaloid tổng, trong đó strychnin (1,25-1,5%) và brucin (1,7%) là hai alkaloid chính. Ngoài ra, các alkaloid phụ gồm có vomicin, igasurine [3], α -colubrine, β -colubrine, N-oxystrychnin, 3-methoxycycajine, isostrychnine, protostrychnine, pseudostrychnine, novacine [4]. Bên cạnh alkaloid, các hợp chất khác như loganin, chlorogenic acid cũng được tìm thấy trong hạt Mã tiền. Hạt Mã tiền không được sử dụng làm thuốc uống trong y học do hàm lượng strychnin cao. Do vậy hạt Mã tiền phải được chế biến để loại bớt thành phần alkaloid strychnin tạo ra Mã tiền chế giảm bớt độc tính và có tác dụng điều trị bệnh. Có nhiều cách để tạo Mã tiền chế ví dụ như: hạt quả cây Mã tiền được ngâm vào nước vo gạo khoảng 36 giờ, đến khi mềm cạo vớt bỏ vỏ ngoài và mầm, sau đó thái mỏng, sấy khô tầm dầu mè một đêm, sao đến màu vàng đậm rồi cho vào lọ đậy kín [5]. Thuốc Phong tê thấp Bà Giàng là một bài thuốc chữa bệnh viêm khớp dạng thấp được lưu truyền rộng rãi và lâu đời trong người dân Thanh Hóa cũng như người dân cả nước. Mã tiền chế là một vị thuốc quan trọng có tính quyết định trong bài thuốc này. Cho đến nay bài thuốc được bào chế dưới dạng viên hoàn, tức là các dược liệu kể cả Mã tiền chế được xay thành bột nhỏ, phối trộn với tá dược để tạo ra viên hoàn. Nhằm hiện đại hóa bài thuốc gia truyền này, việc chuyển dạng bào chế thành viên nang cứng để sử dụng, dễ bảo quản và tiêu chuẩn hóa, từ các cao chiết dược liệu là rất

cần thiết, có ý nghĩa khoa học và thực tiễn. Trong đó nghiên cứu phương pháp chiết, đánh giá hàm lượng của brucin và strychnin trong Mã tiền chế là một nhiệm vụ quan trọng. Bài báo này công bố kết quả nghiên cứu 3 phương pháp chiết Mã tiền chế; đánh giá định tính brucin và strychnin bằng phương pháp sắc ký bản mỏng (TLC), định lượng chúng bằng sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC).

2. Thực nghiệm

2.1. Nguyên liệu, hóa chất, thiết bị

- Bột Mã tiền chế do Doanh nghiệp tư nhân Sản xuất Thuốc y học cổ truyền Bà Giàng cung cấp.

- Ethanol thực phẩm, nước cất, HCl, H_2SO_4 , NH_4OH , Na_2SO_4 tinh khiết, thuốc thử Dragendoff, thuốc thử Vanilin/ H_2SO_4 .

- Hệ thống thiết bị HPLC Alliance series 2695, detector PDA 2996 của hãng Waters-Mỹ.

- Cân phân tích Adam AAA 160L.

2.2. Chiết mẫu hạt Mã tiền chế

Việc chiết mẫu được thực hiện theo 3 phương pháp khác nhau [6, 7].

a. Chiết với Ethanol 96°:

- Nước (1): Ngâm chiết 2 kg bột Mã tiền chế với 10 lít ethanol 96° trong 3 tiếng ở nhiệt độ phòng, lọc thu được 6 lít dịch chiết.

- Nước (2): Tiếp tục ngâm bã Mã tiền chế với 6 lít ethanol 96° trong 3 tiếng ở nhiệt độ phòng, lọc thu được 4 lít dịch chiết.

- Nước (3): Bã Mã tiền chế được tiếp tục ngâm chiết với 6 lít ethanol 96° trong 3 tiếng ở nhiệt độ phòng, lọc thu được 4 lít dịch chiết.

Gộp dịch chiết của các lần chiết (1) + (2) + (3) quay cất dưới áp suất giảm để thu cặn chiết, ký hiệu **MTE**.

b. Chiết với ethanol 70°: Bằng cách tương tự như trên, ngâm chiết 2 kg bột Mã tiền chế 3 lần với ethanol 70° (10; 6 và 6 lít), mỗi lần 3 tiếng ở nhiệt độ phòng. Gộp dịch chiết của 3 lần chiết, lọc, quay cất dưới áp suất giảm để thu cặn chiết, ký hiệu **MTEN**.

c. Tách alkaloid tổng: Ngâm chiết 2 kg bột Mã tiền chế với 13 lít dung dịch HCl 0,5M, lọc thu dịch chiết. Chiết với n-hexan để loại các chất kém phân cực, kiểm hóa pha nước thu được bằng dung dịch NH₄OH 25% đến pH = 12, chiết 5 lần với CH₂Cl₂ (mỗi lần 2 lít). Gộp dịch chiết CH₂Cl₂, làm khan bằng Na₂SO₄ và cất loại dung môi dưới áp suất giảm thu cặn chiết, ký hiệu **MTH**.

2.3. Đánh giá định tính và định lượng alkaloid strychnin và brucin

a. Đánh giá định tính bằng phương pháp TLC

Các cặn chiết **MTE**, **MTEN** và **MTH** được đánh giá định tính bằng sắc ký lớp mỏng, hệ dung môi CH₂Cl₂:MeOH = 5:0,6, phát hiện các chất bằng cách soi đèn tử ngoại, phun với thuốc thử Dragendoff, thuốc thử vanilin/H₂SO₄

b. Định lượng bằng phương pháp HPLC

- Xây dựng đường chuẩn

Brucin và strychnin chuẩn (Merck) được cân chính xác 25 mg cho vào bình định mức (25 ml) sau đó thêm MeOH cho đến vạch ta được dung dịch gốc. Pha loãng dung dịch gốc thành các dung dịch có nồng độ 0,01; 0,1; 0,2; 0,3 và 0,5 mg/ml, sau đó chạy lần lượt các dung dịch có nồng độ trên qua hệ thống HPLC với cột phân tích: Sunfire -C18 RP (4.6 x 250 mm), 5μm.

- Thông số của HPLC

Pha động: Kênh A: H₂O + 0,1% acid formic; Kênh B: Acetonitrile. Tốc độ dòng 1 ml/phút, chạy gradient kênh A từ 80% về 0% trong 30 phút. Detector PDA: bước sóng 264 nm (brucin); 253,4 nm (strychnin).

Các nồng độ brucin và strychnin chuẩn đã được đo lặp lại 3 lần, kết quả thu được có sự ổn định rất cao về giá trị tích phân (diện tích pic), và thời gian lưu (RT). Điều này chứng tỏ rằng các giá trị thông số của phương pháp đã lựa chọn cho hệ thống HPLC là phù hợp cho việc phân tích định lượng brucin và strychnin.

3. Kết quả và thảo luận

3.1. Hiệu suất chiết mẫu bằng ba phương pháp

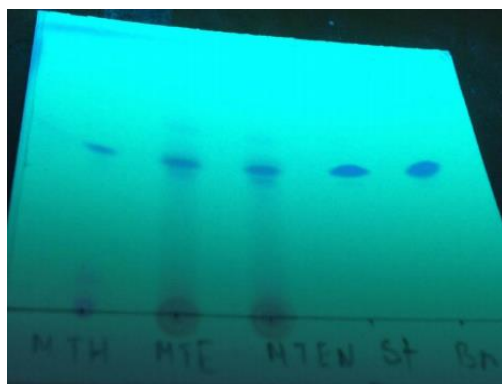
Bảng 1. Hiệu suất chiết mẫu

STT	Phương pháp	Bột Mã tiền chế (kg)	Cặn chiết (g)	Hiệu suất chiết (%)
1	Chiết với ethanol 96°	2	306,25	15,31
2	Chiết với ethanol 70°	2	374,06	18,70
3	Chiết alkaloid tổng	2	216,92	10,85

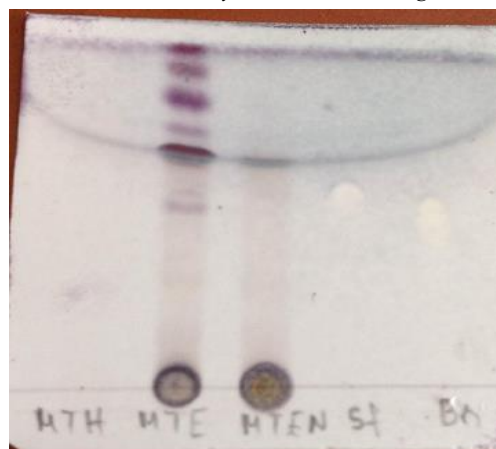
Các thí nghiệm được lặp lại 3 lần, kết quả trung bình được trình bày trên Bảng 1. Kết quả trên Bảng 1 cho thấy phương pháp chiết bột Mã tiền chế với ethanol 70° cho lượng cặn chiết với hiệu suất cao nhất.

3.2. Kết quả đánh giá định tính strychnin và brucin

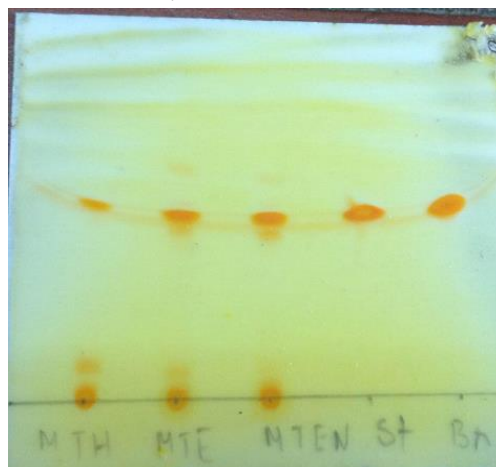
Hình ảnh các vết sắc ký của 3 cặn chiết (**MTE**, **MTEN**, **MTH**) so sánh với strychnin (**St**) và brucin (**Br**) trên bản mỏng hiện với các phương pháp khác nhau, được trình bày trên Hình 1, 2 và 3.



Hình 1. Vết sắc ký hiện dưới đèn tử ngoại



Hình 2. Vết sắc ký hiện với thuốc thử Vanilin/H₂SO₄



Hình 3. Vết sắc ký hiện với thuốc thử Dragendoff

Nhận xét: Các bản mỏng trên cho thấy các cặn chiết **MTH**, **MTE**, **MTEN** đều có chứa strychnin, brucin và một số alkaloid khác với hàm lượng nhỏ. Ngoài các hợp chất alkaloid, cặn chiết **MTE** có chứa một số chất kém phân cực, trong khi cặn chiết **MTEN** chứa các hợp chất phân cực. Đây chỉ là các kết quả định tính, phương pháp HPLC sẽ cho biết hàm lượng 2 alkaloid quan trọng này trong các cặn chiết Mã tiền chế.

3.3. Kết quả đánh giá định lượng alkaloid brucin và strychnin

3.3.1. Xây dựng đường chuẩn cho brucin và strychnin

Kết quả phân tích HPLC cho dãy chuẩn của brucin và strychnin được trình bày trên Bảng 2 và Bảng 3, từ kết quả này sẽ tiến hành xây dựng đường chuẩn.

Bảng 2. Kết quả phân tích HPLC cho chất brucin

TT	Nồng độ (mg/ml)	Diện tích pic	Diện tích Pic LT	RT (phút)
1	0,01	147933	38785	6,4
2	0,1	1804838	1800297	6,4
3	0,2	3663515	3757532	6,4
4	0,3	5579296	5714768	6,4
5	0,5	9745037	9629239	6,4

Bảng 3. Kết quả phân tích HPLC cho chất strychnin

TT	Nồng độ (mg/ml)	Diện tích pic	Diện tích pic LT	RT (phút)
1	0,01	79773	18247	5,4
2	0,1	1165872	1159089	5,4
3	0,2	2393406	2426690	5,4
4	0,3	3579914	3694292	5,4
5	0,5	6308848	6229495	5,4

Từ kết quả Bảng 2 và 3, dựa vào phương pháp bình phương tối thiểu (phương pháp hồi quy tuyến tính cấp một) để xác định các tham số của phương trình hồi quy ($y = ax + b$). Kết quả phân tích phương sai cho các chất brucin và strychnin được trình bày trên Bảng 4 và Bảng 5.

Bảng 4. Bảng phân tích phương sai cho brucin

SUMMARY OUTPUT								
Regression Statistics								
Multiple R	0,9995							
R Square	0,9990							
Adjusted R Square	0,9987							
Standard Error	132331,7							
Observations	5							
ANOVA								
	df	SS	MS	F	Significance F			
Regression	1	5,50405E+13	5,50405E+13	3143,075467	1,25009E-05			
Residual	3	52535025563	17511675188					
Total	4	5,50931E+13						
	Coefficients	Standard Error	t Stat	P-value	Lower 95%	Upper 95%	Lower 99,0%	Upper 99,0%
Intercept	-156939	97514	-2	0,205905	-467273	153395	-726512	412634
Nong do Bru (mg/ml)	19572355	349113	56	0,000013	18461323	20683388	17533220	21611491

Bảng 5. Bảng phân tích phương sai cho strychnin

SUMMARY OUTPUT								
Regression Statistics								
Multiple R	0,99947							
R Square	0,99895							
Adjusted R Square	0,99860							
Standard Error	90034,2							
Observations	5							
ANOVA								
	df	SS	MS	F	Significance F			
Regression	1	2,30867E+13	2,30867E+13	2848,0458	1,45E-05			
Residual	3	24318461215	8106153738					
Total	4	2,3111E+13						
	Coefficients	Standard Error	t Stat	P-value	Lower 95%	Upper 95%	Lower 99,0%	Upper 99,0%
Intercept	-108513	66346	-1,6356	0,200447	-319654	102628,6	-496031	279006
Nong do Stry (mg/ml)	12676015	237525	53,3671	1,449E-05	11920105	13431926	11288653	14063377

Kết quả phân tích phương sai cho brucin cho thấy hệ số tương quan **R = 0,9995**.

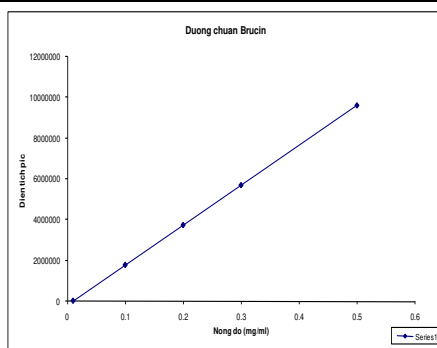
Phương trình hồi quy tuyến tính đối với brucin được xác định là: $Y = 19572355 \cdot x_i - 156939$.

Đồ thị đường chuẩn brucin được trình bày trên Hình 4.

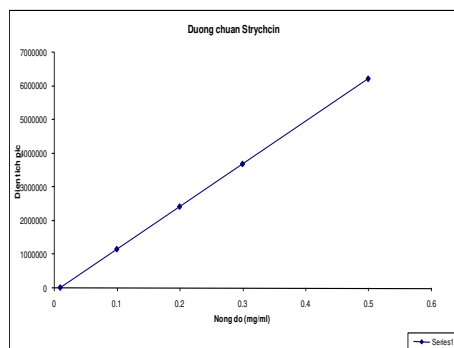
Kết quả phân tích phương sai cho strychnin cho thấy hệ số tương quan **R = 0,99947**.

Phương trình hồi quy tuyến tính đối với strychnin được xác định là: $Y = 12676015 \cdot x_i - 108513$.

Đồ thị đường chuẩn **strychnin** được trình bày trên Hình 5.



Hình 4. Đường chuẩn brucin



Hình 5. Đường chuẩn Strychnin

3.3.2. Kết quả phân tích hàm lượng brucin và strychnin

Từ các số liệu thu được ở Bảng 2 và 3, dựa vào các phương trình hồi quy thu được từ phương pháp lập đường chuẩn, đã xác định được hàm lượng brucin và strychnin trong bột Mã tiền chế với 3 phương pháp chiết khác nhau nêu trên, kết quả được trình bày ở Bảng 6.

Bảng 6. Hàm lượng brucin và strychnin

TT	Dịch chiết	Hàm lượng brucin (%)	Hàm lượng strychnin (%)
1	MTE (Chiết với ethanol 96°)	0,63	0,94
2	MTEN (Chiết với ethanol 70°)	0,85	1,20
3	MTH (Chiết alkaloid tổng)	0,79	1,07

Như vậy, với sự ổn định của việc lặp lại các lần đo cộng thêm sự tương quan chặt chẽ giữa nồng độ brucin, strychnin và diện tích pic thu được trên phổ HPLC, phương pháp này tối ưu cho việc phân tích định lượng brucin và strychnin trong các mẫu nghiên cứu. Các mẫu phân tích

cũng được thực hiện với cùng điều kiện như mẫu chuẩn.

4. Kết luận

Hàm lượng hai alkaloid brucin và strychnin thu được từ quy trình chiết 3 là cao nhất, nhưng hiệu suất chiết của quy trình thứ 2 cao hơn quy trình 3. Do vậy, lượng hai alkaloid thu được từ hai quy trình chiết 2 và 3 gần tương đương.

Các kết quả này cho thấy để chiết xuất các hoạt chất từ bột Mã tiền chế làm nguyên liệu sản xuất thuốc Phong tê thấp Bà Giằng dạng viên nang cứng thì điều kiện chiết xuất phù hợp nhất là nhiệt độ phòng, dung môi ethanol 70°.

Hàm lượng brucin trong 3 dịch chiết MTE, MTEN và MTH tương ứng là 0,63%; 0,85% và 0,79%. Hàm lượng strychnin trong 3 dịch chiết MTE, MTEN và MTH tương ứng là 0,94%; 1,20% và 1,07%.

Lời cảm ơn: Nghiên cứu này được tài trợ bởi Dự án “Hoàn thiện quy trình công nghệ sản xuất cao khô bán thành phẩm và thuốc Phong tê thấp Bà Giằng”, mã số CNHD. DASXTN 024 thuộc Chương trình nghiên cứu khoa học công nghệ trọng điểm quốc gia phát triển công nghiệp Hoá dược đến năm 2020 do Doanh nghiệp tư nhân Sản xuất thuốc Y học cổ truyền làm chủ trì, phối hợp với Viện Hóa học thực hiện.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] *Chinese Plant Names, Strychnos nux-vomica*. Linnaeus Sp. Pl.1:189.1753, pp. 325.
- [2] Arnold M. D., Harry L., *Poisonous Plants of Hawaii*, Tokyo, Nhật Bản, 1968.
- [3] Đỗ Tất Lợi, *Cây thuốc và vị thuốc Việt Nam*, NXB Thời đại, 2004, trang 529.
- [4] Anil Sah, Gopal L. Khatik, Manish Vyas, Pramod Yadav, “A Short Review on Anticancer Inves of Strychnos nux-vomica”, *International Journal of Green Pharmacy*, 10(3), S88, 2016, pp. 87-90.
- [5] <https://baomoi.com/su-khac-biet-giua-ma-tien-va-ma-tien-che/c/24581132.epi>.
- [6] Pasupuleti Sreenivasa Rao, Majeti Narasimha Vara Prasad, “Extraction, Purification and Characterization of Indole Alkaloids from Strychnos wallichiana L. – an Endangered Medicinal Plant from India”, *Medicinal and Aromatic Plant Science and Biotechnology*, 2008, pp. 63-66.
- [7] Jun Chen, Yange Qu, Dongyue Wang, Pei Peng, Hao Cai, Ying Gao, Zhipeng Chen, Baochang Cai, “Pharmacological Evaluation of Total Alkaloids from Nux Vomica: Effect of Reducing Strychnine Contents”, *Molecules*, 19, 2014, pp. 4395-4408.

(BBT nhận bài: 8/8/2018, hoàn tất thủ tục phân biên: 21/8/2018)