

Nghiên cứu định lượng axit glycyrrhizic trong dược liệu cam thảo (*radix glycyrrhizae*) bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao

Hoàng Việt Dũng*; Đào Văn Đôn*; Nguyễn Văn Long*

TÓM TẮT

Tiến hành nghiên cứu phương pháp định lượng axit glycyrrhizic trong dược liệu Cam thảo. Kết quả: phương pháp định lượng bằng sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) với điều kiện sắc ký: cột Phenomenex Genimi (RP - C18, 5 μ m, 100A0, 250 x 4,6 mm); pha động acetonitril: axit phosphoric 0,02M (28/72); detector UV 346 nm, có tuyến tính chặt chẽ giữa diện tích peak và nồng độ axit glycyrrhizic trong khoảng nồng độ nghiên cứu ($R^2 = 0,9998$), độ lặp lại (RSD = 3,16%) và độ đúng (96,50 - 101,47%, RSD = 1,93%) cao. Thời gian phân tích mẫu HPLC phù hợp (8,8 phút).

* Từ khóa: Axit glycyrrhizic; Cam thảo; Sắc ký lỏng hiệu năng cao.

Study on quantifying Acid glycyrrhizic in *Radix glycyrrhizae* by the high performance liquid chromatographic method

SUMMARY

A method for quantifying acid glycyrrhizic, a main active compound in *Radix Glycyrrhizae* by HPLC was developed. Results of method validation showed the condition of HPLC analysis is suitable (RP - C18 column, detector UV: 346 nm, mobile phase: acetonitrile: phosphoric acid 0.02M in water = 28:72, flow rate: 1 ml/min, injection volume: 20 μ l); the method had good linear relationship between corresponding peak areas and acid glycyrrhizic concentrations ($R^2 = 0.9998$), high repeatability (RSD = 3.16%) and high accuracy (96.50 - 101.47%, RSD = 1.93%); the time for analyzing a HPLC sample is quite short (about 8.8 minutes).

* Key words: Acid glycyrrhizic, *Radix glycyrrhizae*, HPLC.

ĐẶT VẤN ĐỀ

Cam thảo (*Radix Glycyrrhizae*) là dược liệu được sử dụng khá phổ biến trong các bài thuốc y học cổ truyền. Dược liệu này vừa được sử dụng như một chất dẫn thuốc, vừa dùng để chữa một số bệnh như: viêm

loét dạ dày tá tràng, ho, bệnh Addison... Hoạt chất chính trong Cam thảo bao gồm các chất thuộc nhóm saponin và flavonoid như: axit glycyrrhizic, liquiritin, liquiritin apioside, glabridin... Trong đó, axit glycyrrhizic là hoạt chất thu hút được nhiều sự quan tâm nhất do có tác dụng bảo vệ tế bào gan, ức chế virút nhân lên.

* Học viện Quân y

Phân biệt khoa học: PGS. TS. Nguyễn Văn Minh

Để đảm bảo hiệu quả chữa bệnh cho các chế phẩm có thành phần Cam thảo, chất lượng dược liệu đóng vai trò rất quan trọng. Do hàm lượng hoạt chất thay đổi rất

lớn giữa vùng trồng nguyên liệu, giữa thời điểm thu hái và điều kiện chế biến, bảo quản. Hơn nữa, trong dược điển các nước như: Việt Nam, Trung Quốc, Nhật, Mỹ...

chưa có phương pháp định lượng axit glycyrrhizic trong dược liệu được công bố. Vì vậy, chúng tôi tiến hành nghiên cứu phương pháp định lượng axit glycyrrhizic trong Cam thảo.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Vật liệu và trang thiết bị.

- Dược liệu: Cam thảo mua ở phố Lãn Ông, Hà Nội.

- Hóa chất:

+ Chất chuẩn axit glycyrrhizic (Sigma Aldrich).

+ Cồn 96, methanol... đạt tiêu chuẩn tinh khiết phân tích.

+ Acetonitril, axit phosphoric: đạt tiêu chuẩn phân tích HPLC - Merck.

- Thiết bị, dụng cụ:

+ Bình chiết siêu âm Soniclean.

+ Máy HPLC Alliance Water 2695D; detector PDA.

+ Cân phân tích Sartorius, độ chính xác 0,1 mg.

+ Bộ lọc hút chân không Alltech (Mỹ).

+ Màng lọc nylon Sartorius Minisart, kích thước lỗ lọc 0,45 μ m.

2. Phương pháp nghiên cứu

- Xây dựng phương pháp định lượng axit glycyrrhizic trong dược liệu dựa trên đánh giá các thông số: tính tương thích hệ thống, tính đặc hiệu, khoảng tuyến tính, độ

lặp lại, độ đúng, giới hạn phát hiện và giới hạn định lượng dưới.

- Qua tham khảo tài liệu và thực nghiệm, chúng tôi đã xây dựng được điều kiện phân tích HPLC như sau:

+ Hệ thống HPLC (như trên).

+ Detector PDA, ở bước sóng 346 nm.

+ Chương trình rửa giải isocratic với hệ pha động acetonitril, axit phosphoric 0,02M tỷ lệ 28:72.

+ Tốc độ dòng: 1 ml/phút.

+ Thể tích tiêm: 20 μ l.

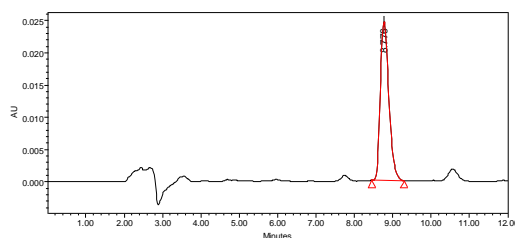
- Dung dịch thử: cân chính xác 0,1g bột dược liệu (nghiền tới kích thước thích hợp) cho vào ống nhựa dung tích 50 ml. Thêm khoảng 30 ml methanol 50%, chiết siêu âm trong thời gian 30 phút ở 50°C (chiết 3 lần). Gộp các dịch chiết vào bình định mức dung tích 100 ml, thêm methanol 50% vừa đủ đến vạch. Dung dịch trong bình được lọc qua màng 0,45 μ m, sau đó đem phân tích sắc ký.

- Dung dịch chuẩn: cân chính xác 75 mg chất chuẩn axit glycyrrhizic và hòa tan vào bình định mức 100 ml với methanol 50% để được dung dịch chuẩn gốc có nồng độ khoảng 0,75 mg/ml.

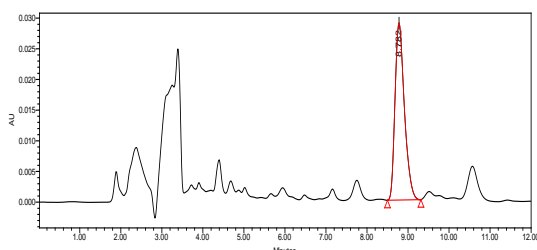
KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ BÀN LUẬN

1. Tính tương thích hệ thống.

Đánh giá bằng cách tiêm lặp lại 6 lần một dung dịch chuẩn vào hệ thống sắc ký với điều kiện nêu trên.



Hình 1: Sắc ký đồ của axit glycyrrhizic chuẩn.



Hình 2: Sắc ký của dịch chiết dược liệu.

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

CÁC THÔNG SỐ	KẾT QUẢ
Diện tích pic	Stb = 380806 RSD = 0,62%
Thời gian lưu	tR, tb = 8,82 phút RSD = 0,75%
Hệ số bất đối xứng	1,28
Số đĩa lý thuyết	3400

Hệ thống sắc ký tương thích với mẫu phân tích RSD của diện tích pic và thời gian lưu đều nhỏ hơn 1%.

2. Tính đặc hiệu.

Sử dụng detector PDA để đánh giá tính đặc hiệu của phương pháp: xác định phổ hấp thụ UV - VIS tại một số điểm trên peak mẫu thử. Kết quả nhận thấy các phổ này giống về hình dạng, có số lượng và vị trí

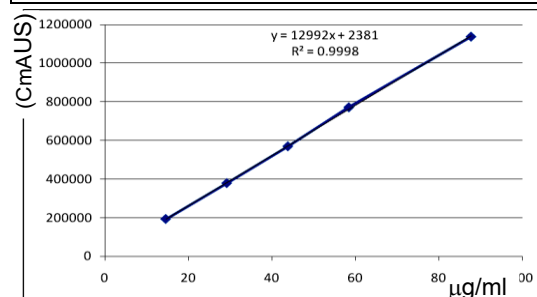
đỉnh cực đại hấp thụ trùng với phổ hấp thụ UV - VIS của chất chuẩn. Kết quả này chứng tỏ phương pháp có tính đặc hiệu cao.

3. Khoảng tuyến tính.

Để khảo sát khoảng tuyến tính của phương pháp, chúng tôi tiến hành pha một dãy dung dịch chuẩn có nồng độ: 14,62; 29,24; 43,86; 58,48; và 87,72 µg/ml. Sau đó xác định tương quan giữa diện tích pic và nồng độ dung dịch chuẩn.

Bảng 2: Sự phụ thuộc của diện tích peak vào nồng độ axit glycyrrhizic chuẩn.

NỒNG ĐỘ (µg/ml)	DIỆN TÍCH
14,62	192980
29,24	378647
43,86	569462
58,48	771845
87,72	1138027
$y = 12992x + 2381$ với $R^2 = 0,9998$	



Hình 3: Đồ thị tương quan giữa diện tích pic và nồng độ axit glycyrrhizic.

Trong khoảng nồng độ khảo sát, diện tích peak và nồng độ axit glycyrrhizic có tương quan tuyến tính chặt chẽ với $R^2 = 0,9998$.

4. Độ lặp lại.

Độ lặp lại của phương pháp được tiến hành bằng cách định lượng axit glycyrrhizic với 6 thí nghiệm riêng biệt đã chọn.

Bảng 3: Kết quả khảo sát độ lặp lại.

TT	LƯỢNG CÂN (mg)	HÀM LƯỢNG (%)	THỐNG KÊ
1	103,5	3,39	HLtb = 3,55 % RSD= 3,16 %
2	101,8	3,56	
3	102,3	3,60	
4	102,1	3,45	
5	101,3	3,68	
6	102,9	3,64	

Phương pháp định lượng có độ lặp lại tốt, RSD = 3,16%.

5. Độ đúng.

Xác định độ đúng của phương pháp bằng phương pháp thêm chuẩn.

- Dung dịch chuẩn gốc: hút chính xác 2 ml dung dịch chuẩn, hòa loãng vào bình định mức 50 ml bằng methanol 50%, lắc kỹ.

- Dung dịch thử gốc: tiến hành chuẩn bị như phần dung dịch thử.

- Dung dịch hỗn hợp: hút chính xác 5 ml dung dịch thử gốc cho vào bình định mức

10 ml, thêm dung dịch chuẩn gốc vừa đủ tới vạch, lắc đều. Dung dịch được lọc qua màng 0,45 μm , sau đó đem phân tích sắc ký.

Tiến hành đo HPLC với điều kiện đã nêu trên.

Lặp lại thực nghiệm với 5 dung dịch thử khác nhau.

Bảng 4: Kết quả khảo sát độ đúng.

TT	LƯỢNG THÊM VÀO (μg)	LƯỢNG TÌM LẠI (μg)	Tỷ lệ (%)
1	146,2	140,98	96,50
2	146,2	146,92	98,69
3	146,2	142,66	99,82
4	146,2	141,48	101,47
5	146,2	142,33	97,78
Thống kê		% tìm lại tb = 98,85%, RSD = 1,93%.	

Phương pháp định lượng có độ đúng cao với tỷ lệ tìm lại từ 96,50 - 101,47%; RSD = 1,93%.

6. Giới hạn phát hiện và giới hạn định lượng dưới.

Đã khảo sát và xác định được:

+ Nồng độ mẫu thử khoảng 0,5 $\mu\text{g/ml}$, là giới hạn phát hiện. Tại nồng độ này, đáp ứng peak mẫu thử có diện tích gấp hơn 3 lần diện tích đáp ứng của mẫu trắng.

+ Nồng độ mẫu thử khoảng 1,5 $\mu\text{g/ml}$, là giới hạn định lượng dưới, tại nồng độ này đáp ứng peak mẫu thử có diện tích gấp hơn 10 lần diện tích đáp ứng của mẫu trắng.

KẾT LUẬN

Đã xây dựng được phương pháp định lượng axit glycyrrhizic trong Cam thảo bằng phương pháp HPLC với điều kiện sắc ký: cột Phenomenex Genimi RP-C18; pha động: acetonitril: axit phosphoric 0,02M (28:72); detector UV: 346 nm. Phương pháp định lượng này tương quan tuyến tính chặt chẽ giữa diện tích pic và nồng độ axit glycyrrhizic trong khoảng nồng độ khảo sát, $R^2 = 0,9998$, độ lặp lại (RSD = 3,16%) và độ đúng (từ 96,50 - 101,47%, RSD = 1,93%) cao. Thời gian phân tích một mẫu bằng HPLC phù hợp (khoảng 8,8 phút).

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. *Đỗ Tất Lợi*. Những cây thuốc và vị thuốc Việt Nam. Nhà xuất bản Y học, Hà Nội, 2004, tr 604-605.
2. *Bộ Y tế*. Dược điển Việt Nam IV. 2010.
3. *J. R. Hennell, S. Lee, C. S. Khoo, M. J. Gray, A. Bensoussan*. The determination of glycyrrhizic acid in *Glycyrrhiza uralensis* Fisch.ex DC. (ZhiGanCao) root and the dried aqueous extract by LC-DAD. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2008, 47, pp.494-500.
4. *SUN Chen, XJE Yuchun, LIU Huizhou*. Microwave - assisted micellar extraction and determination of glycyrrhizic acid and liquiritin in licorice root by HPLC. *Chin J Chem Eng*. 2007. 15 (4), pp.474-477.
5. *The Merck index*. 13th. Monograph: glycyrrhizic acid.

