

# ỨNG DỤNG SẮC KÝ LỎNG HIỆU NĂNG CAO TRONG ĐIỀU CHẾ CHẤT CHUẨN ASIATICOSID

Nguyễn Thụy Hai\*, Nguyễn Minh Đức\*

## TÓM TẮT

**Mục tiêu:** Tiến hành điều chế asiaticosid có độ tinh khiết cao từ bột trích tinh Rau má bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao.

**Phương pháp:** Sử dụng máy sắc ký lỏng hiệu năng cao phân tích để thăm dò điều kiện thích hợp, từ đó áp dụng qua máy sắc ký lỏng hiệu năng cao điều chế để thu được asiaticosid.(2)

**Kết quả:** Thu được asiaticosid có độ tinh khiết cao có thể sử dụng làm chất chuẩn với điều kiện sắc ký điều chế như sau: Cột Discovery HS C18 (250 x 21,2mm; 10 $\mu$ m), với pha động là hỗn hợp gồm methanol – nước (60:40), tốc độ dòng 20ml/phút, đầu dò SPD đặt ở 203 nm. Cấu trúc hóa học và độ tinh khiết được xác định lại bằng phương pháp NMR.(1)

**Kết luận:** Bằng sắc ký lỏng hiệu năng cao, chúng ta có thể điều chế các chất chuẩn có độ tinh khiết cao một cách nhanh chóng và hiệu quả.

**Từ khóa:** điều chế, sắc ký lỏng hiệu năng cao phân tích, asiaticosid.

## ABSTRACT

### PREPARATION OF ASIATICOSIDE REFERENCE STANDARD BY HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY

Nguyen Thuy Hai, Nguyen Minh Duc

\* Y Hoc TP. Ho Chi Minh \* Vol. 14 - Supplement of No 1 - 2010: 59-63

**Objective:** Preparation of asiaticoside with high purity from a powder extract of *Centella asiatica* by preparative high performance liquid chromatography (HPLC) method.

**Method:** Using analytical HPLC to determine the appropriate separating conditions, we carried out the found conditions to the preparative HPLC to obtain asiaticoside.

**Results:** We obtained asiaticoside of high purity which can be used as standard with the preparative HPLC conditions as follows: Discovery HS C18 column (l:250 x i.d :21.2 mm; particle size: 10 $\mu$ m), mobile phase: MeOH – H<sub>2</sub>O (60: 40), flow rate 20ml/min, SPD- 20A detector set at 203 nm. Chemical structure and purity of asiaticoside were determined by conventional methods (analytical HPLC and NMR).

**Conclusions:** By preparative HPLC, we can produce asiaticoside with standard grade, the process was proven more quickly and efficient than classical methods.

**Key words:** preparation, analytical HPLC, asiaticoside.

## ĐẶT VẤN ĐỀ

Một trong những điểm yếu lớn nhất hiện nay của việc khai thác sử dụng cây thuốc và các chế phẩm từ cây thuốc là vấn đề kiểm soát chất lượng. Điều này làm hạn chế khả năng

khai thác sử dụng nguồn tài nguyên cây thuốc dồi dào của đất nước ta. Hiện nay nhiều phương pháp kiểm nghiệm hiện đại như các phương pháp phổ, sắc ký lỏng hiệu năng cao . . . rất hữu hiệu trong việc tiêu chuẩn hoá và

\* Khoa Dược - Đại học Y Dược Tp.HCM

Địa chỉ liên hệ: DS. Nguyễn Thụy Hai

ĐT: 01696831286

Email: [ngthuyhai1986@gmail.com](mailto:ngthuyhai1986@gmail.com)

kiểm định cây thuốc và thuốc từ dược liệu. Tuy nhiên, để áp dụng các phương pháp này, một trong những yêu cầu đầu tiên là phải có các chất chuẩn. Hơn thế nữa, các chất chuẩn còn rất cần thiết cho công tác nghiên cứu phát triển dược liệu và các chế phẩm từ dược liệu.

Tuy nhiên, một trong những khó khăn cho việc phân tích, kiểm nghiệm ở nước ta là thiếu các chất chuẩn cần thiết, vì các chất chuẩn mua từ nước ngoài rất đắt tiền, nhiều khi không có sẵn.

Xuất phát từ các lý do trên, đề tài này được thực hiện nhằm mục tiêu chiết xuất, điều chế asiaticosid để làm chất chuẩn phục vụ công tác kiểm định thuốc, tiêu chuẩn hóa chất lượng các sản phẩm và nguyên liệu chứa asiaticosid.

## **ĐỐI TƯỢNG - PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU**

### **Đối tượng**

Bột trích tinh rau má do Công ty TNHH ADC cung cấp.

### **Dung môi, hóa chất**

Methanol, HPLC, Merck, Đức.

### **Thiết bị**

Máy HPLC phân tích LC-10 AD (Shimadzu, Japan).

Máy HPLC điều chế LC- 20 A (Shimadzu, Japan).

Máy cô chân không R-200, Buchi, Thụy Sĩ.

### **Phương pháp nghiên cứu**

#### **Thăm dò điều kiện trên HPLC phân tích**

Chúng tôi tiến hành thăm dò điều kiện thích hợp để tách asiaticosid từ bột trích tinh rau má trên máy HPLC phân tích, từ đó áp dụng qua máy HPLC điều chế. Do nếu trực tiếp thăm dò trên máy HPLC điều chế sẽ rất lãng phí dung môi.

#### **Điều kiện sắc ký**

Cột Supelcosil LC18 250 x 4.6 mm, 5  $\mu$ m + guard column

Hệ dung môi: MeOH – H<sub>2</sub>O

Bước sóng: 203 nm

Tốc độ dòng: 0,7 ml/min

Mẫu: Bột trích tinh rau má được pha với nồng độ 3mg/ 5ml pha động

Thể tích bơm mẫu: 20 $\mu$ l

#### **Tiến hành tách asiaticosid trên máy HPLC điều chế từ bột trích tinh rau má**

Sau khi tìm được điều kiện thích hợp để tách asiaticosid từ bột trích tinh rau má, ta áp dụng điều kiện đó qua máy HPLC điều chế để bắt đầu tiến hành tách thu lấy asiaticosid.

#### **Điều kiện sắc ký**

Cột Discovery HS C18 250 x 21.2 mm, 10  $\mu$ m + guard column

Hệ dung môi: MeOH – H<sub>2</sub>O đã thăm dò được ở trên

Bước sóng: 203 nm

Tốc độ dòng: 20 ml/min

Mẫu: Bột trích tinh rau má được pha với nồng độ 300mg/ 10ml pha động.

Thể tích bơm mẫu: 10ml

#### **Thu nhận phân đoạn asiaticosid**

Tiến hành cô giảm áp phân đoạn asiaticosid tách được từ máy HPLC điều chế.

Sau đó đem sấy chân không ở 50°C. Thu được asiaticosid ở dạng tinh thể màu trắng.

#### **Tinh chế asiaticosid lần 2 bằng máy HPLC điều chế để thu được asiaticosid tinh khiết**

Do ta thực hiện bơm mẫu overload nên phần asiaticosid thu nhận được chưa thực sự tinh khiết hoàn toàn, do đó ta phải tiến hành tinh chế lần 2 để có được asiaticosid tinh khiết hơn.

#### **Điều kiện sắc ký**

Cột Discovery HS C18 250 x 21.2 mm, 10  $\mu$ m + guard column

Hệ dung môi: MeOH – H<sub>2</sub>O

Bước sóng: 203 nm

Tốc độ dòng: 20 ml/min

Mẫu: asiaticosid thu được ở trên được pha với nồng độ 200mg/ 10ml pha động.

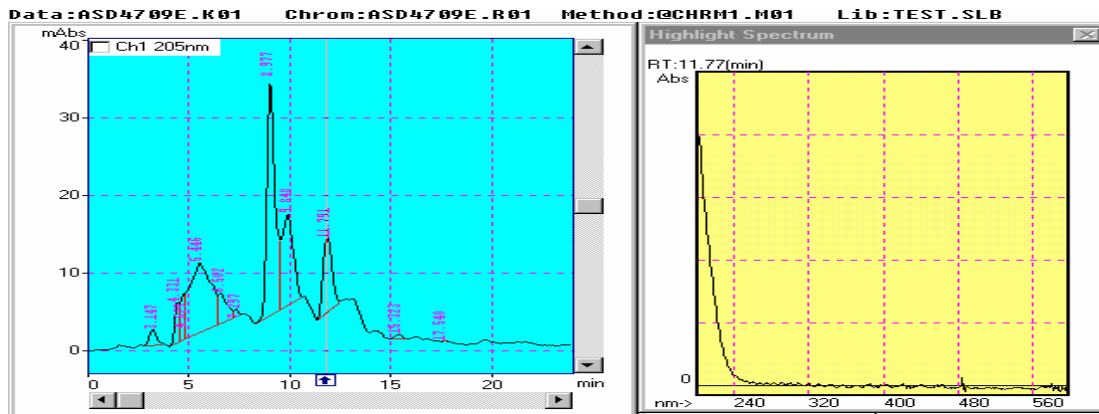
Thể tích bơm mẫu: 10 ml

## Kiểm tra phổ NMR

Sau khi tiến hành tinh chế lần 2 xong, đem cô giảm áp rồi sấy chân không ở 50°C thu được tinh thể asiaticosid tinh khiết.

Tiến hành kiểm tra lại bằng phương pháp NMR để xác định rõ cấu trúc.

## Kết quả



Hình

Sắc ký đồ của mẫu bột trích tinh rau má trên máy HPLC phân tích.

1.

Sau khi đã tìm được điều kiện sắc ký thích hợp, sẽ áp dụng qua máy HPLC điều chế để tiến hành điều chế asiaticosid.

## Kết quả

Với điều kiện thích hợp nhất thăm dò được áp dụng qua máy sắc ký điều chế:

Cột Discovery HS C18 250 x 21.2 mm, 10  $\mu$ m + Guardcol

Hệ dung môi: MeOH – H<sub>2</sub>O

60 40

Bước sóng: 203 nm

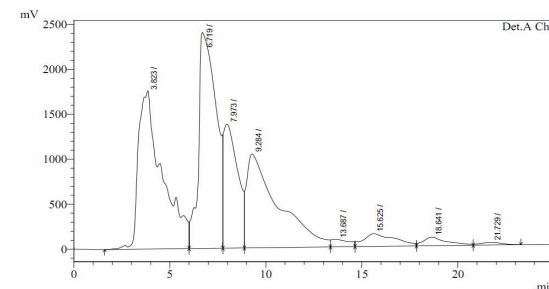
Tốc độ dòng: 20 ml/min

Mẫu: Bột trích tinh rau má được pha với nồng độ 300mg/ 10ml pha động.

Thể tích bơm mẫu: 10ml

## KẾT QUẢ

Dựa vào các tài liệu tham khảo về asiaticosid và thăm dò điều kiện trên máy HPLC phân tích, chúng tôi đã đưa ra điều kiện sắc ký với hệ dung môi MeOH – H<sub>2</sub>O (60: 40) cho kết quả tách tốt nhất.(2)



Hình 2. Sắc ký đồ của bột trích tinh rau má trên máy HPLC điều chế.

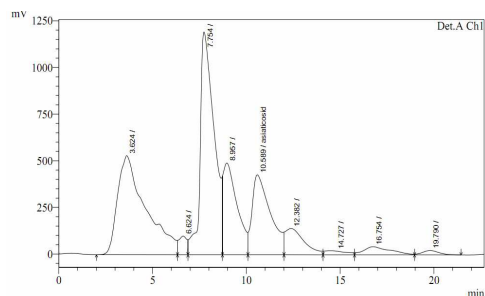
Dựa trên sắc ký đồ từ máy HPLC điều chế, ta lần lượt thu nhận các phân đoạn 1 ở (7,754 phút); phân đoạn 2 (8,957 phút) và phân đoạn 3 (10,589 phút).

Phân đoạn 3 chính là phân đoạn của asiaticosid cần thu nhận.

Bom overload để tiết kiệm thời gian và dung môi.

Mẫu được pha với nồng độ 550mg/ 10ml pha động, thể tích bơm 10ml/ lần.

## Kết quả



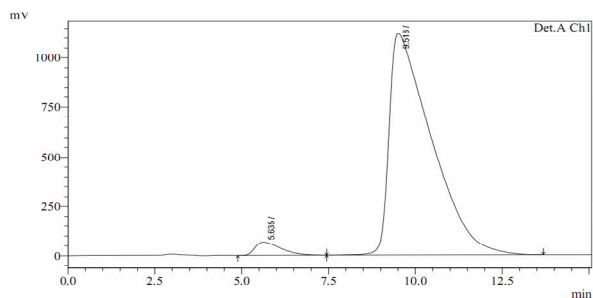
**Hình 3.** Sắc ký đồ của bột trích tinh rau má trên máy HPLC điều chế khi bơm overload.

Sau khi thu nhận các phân đoạn chính, ta tiến hành cô giảm áp thu lấy tinh thể asiaticosid.

Tiến hành tinh chế lần 2 vẫn với điều kiện sắc ký đã thăm dò được.

Mẫu được bơm vào là lượng asiaticosid thu được từ lần tinh chế 1 (đã có độ tinh khiết khá cao) được pha với nồng độ 200 – 300mg/10ml pha động.

### Kết quả



**Hình 4.** Sắc ký đồ của asiaticosid được tinh chế lần 2 trên máy HPLC điều chế.

Dựa trên sắc ký đồ từ máy HPLC điều chế ta dễ dàng thu nhận được asiaticosid tinh khiết (phân đoạn 9,518 phút).

Tiến hành cô giảm áp để thu lấy tinh thể asiaticosid tinh khiết

Tiến hành kiểm tra lại bằng phương pháp NMR.(1)

### Kết quả

Phổ  $^1\text{H-NMR}$  (pyridinD5) cho các tín hiệu đặc trưng sau:

7 tín hiệu proton ở 0,85ppm (3H, s); 0,87ppm (3H, s); 0,89ppm (3H, s); 1,04ppm (3H, s); 1,06ppm (3H, s); 1,11ppm (3H, s); 1,15ppm (3H, s) có thể gán lần lượt cho các nhóm – CH<sub>3</sub> ở vị trí 24, 25, 26, 27, 29, 30, 6'''.

Tín hiệu proton của 3 nhóm metin nối trực tiếp với oxigen cộng hưởng ở trường thấp 6,15ppm (1H, d, J = 8Hz); 5,39ppm (1H, d, J = 3,5Hz); 4,95ppm (1H, d, J = 7,5Hz) có thể gán cho các proton ở vị trí 1', 1'', 1'''.

1 tín hiệu proton ở vị trí 4,38ppm (1H, t, J = 9Hz) có thể gán cho proton ở vị trí 12.

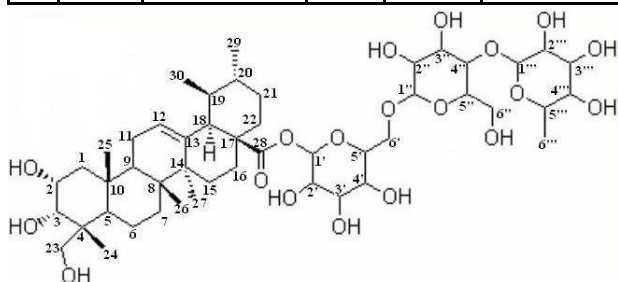
Vùng 3,0 - 5,0 ppm mang nhiều tín hiệu có thể gán cho proton các nhóm –CHOH trên aglycon và trên chuỗi đường. Các tín hiệu này bị chồng phủ nên khó xác định chính xác.

Phổ  $^{13}\text{C-NMR}$ , DEPT90 và DEPT135 cho thấy các mũi cộng hưởng ứng với 48 carbon bao gồm một carbon carbonyl của một nhóm ceton bất bão hòa cộng hưởng ở trường thấp [ $\delta\text{C} = 176,2$ ; C-28]; carbon của bảy nhóm metyl nằm trong vùng từ 13,0 – 25,0 ppm; mười một nhóm metylen trong đó carbon của ba nhóm metylen nối trực tiếp với oxigen cộng hưởng ở vị trí [ $\delta\text{C} = 66,7$ ; C-23], [ $\delta\text{C} = 69,0$ ; C-6'], [ $\delta\text{C} = 61,1$ ; C-6''], carbon của tám nhóm metylen còn lại nằm trong vùng từ 18,0 – 50,0 ppm; ba nhóm metin có carbon nối trực tiếp với oxigen cộng hưởng ở vị trí [ $\delta\text{C} = 95,7$ ; C-1'], [ $\delta\text{C} = 105,0$ ; C-1''], [ $\delta\text{C} = 102,6$ ; C-1''']; hai carbon của nối đôi cộng hưởng ở vị trí [ $\delta\text{C} = 125,9$ ; C-12], [ $\delta\text{C} = 138,8$ ; C-13].

**Bảng 1.** Bảng dữ liệu phổ  $^{13}\text{C-NMR}$  của SAS (pyridineD5) so với dữ liệu phổ  $^{13}\text{C-NMR}$  của asiaticosid

C	SAS	Asiaticosid	C	SAS	Asiaticosid
1	48,1	47,8	25	18,0	17,6
2	68,9	68,9	26	18,1	17,8
3	78,3	78,1	27	23,8	23,7
4	43,6	43,6	28	176,2	176,3
5	48,1	48,1	29	17,8	17,3
6	18,6	18,4	30	21,2	21,3
7	31,1	33,1	1'	95,8	95,6
8	40,5	40,2	2'	73,9	73,9
9	48,0	48,0	3'	77,9	77,9
10	38,3	38,3	4'	71,0	70,9
11	23,4	23,8	5'	77,1	77,1
12	125,9	126	6'	69,4	69,3
13	138,8	138,5	1''	104,9	104,8
14	42,9	42,5	2''	75,3	75,3

15	28,9	28,7	3"	76,5	76,4
16	24,9	24,5	4"	78,7	78,6
17	48,4	48,4	5"	78,3	78,2
18	53,3	53,2	6"	61,3	61,3
19	39,2	39,3	1'''	102,6	102,6
20	39,1	39	2'''	72,5	72,5
21	31,1	30,8	3'''	72,7	72,7
22	37,0	36,8	4'''	73,8	73,7
23	66,8	66,4	5'''	70,3	70,2
24	14,5	14,3	6'''	18,7	18,4



Hình 5. Asiaticosid

## KẾT LUẬN

Sau thời gian tiến hành đề tài “Ứng dụng sắc ký lỏng hiệu năng cao trong điều chế chất chuẩn asiaticosid” chúng tôi đã thu được một số kết quả sau:

Điều chế được asiaticosid với lượng lớn.

Sau khi điều chế được đã tiến hành kiểm tra độ tinh khiết, cấu trúc hóa học bằng NMR

Tiết kiệm được nhiều công đoạn, dung môi, hóa chất, đặc biệt là thời gian.

Không chỉ tách được asiaticosid mà đồng thời còn thu thêm được các chất khác như madecassosid...

Qua quá trình tiến hành đề tài, không chỉ thu được các chất chuẩn mà còn đề ra được một phương pháp điều chế, phân lập ổn định, là cơ sở để điều chế các chất chuẩn có qui mô lớn trong tương lai.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Nguyễn Kim Phi Phụng (2005). Phổ NMR sử dụng trong phân tích hữu cơ. Nhà xuất bản Đại học Quốc gia TP. Hồ Chí Minh.
2. Nguyễn Minh Đức (2006). Sắc ký lỏng hiệu năng cao và một số ứng dụng vào nghiên cứu, kiểm nghiệm dược phẩm, dược liệu và hợp chất tự nhiên. Nhà xuất bản Y học.



