

NGHIÊN CỨU QUY TRÌNH ĐỊNH LƯỢNG ASIATICOSID TỪ RAU MÁ (*CENTELLA ASIATICA* (L.) URB. – APIACEAE) TRỒNG TẠI XÃ QUẢNG THỌ, QUẢNG ĐIỀN, THỪA THIÊN HUẾ

Đào Thị Cẩm Minh, Nguyễn Việt Khanh, Nguyễn Hữu Tiến,

Lê Thị Thanh Ngọc, Hồ Việt Đức

Khoa Dược, Trường Đại học Y Dược Huế

Tóm tắt

Đặt vấn đề: Từ xa xưa, rau má (*Centella asiatica* (L.) Urb. - Apiaceae) đã được sử dụng trong dân gian để chữa trị rất nhiều bệnh như: tả lỵ, bạch đới, mụn nhọt, khí hư, ho, viêm họng, rôm sảy, trĩ, phong, giải độc, tiêu thũng. Đề tài có mục tiêu là xác định hàm lượng hoạt chất asiaticosid có tác dụng sinh học từ rau má trồng tại hợp tác xã Quảng Thọ 2, huyện Quảng Điền, tỉnh Thừa Thiên Huế. **Đối tượng và phương pháp nghiên cứu:** Rau má sau khi được thu hái, rửa sạch, để ráo, phơi hoặc sấy khô. Cân 20g rau má, chiết bằng các phương pháp ngâm kiệt, hầm hoặc sắc với các dung môi hòa tan phù hợp. Dịch chiết thu được pha loãng vừa đủ 1000ml với dung môi chiết. Dung dịch này được lọc qua màng lọc 0,45µm để tiến hành sắc ký. **Kết quả:** Chương trình sắc ký có pha động gồm methanol: trifluoroacetic acid 1% (60: 40); Cột: HiQ Sil C18 (4,6 x 250 mm) 3µm; Tốc độ dòng: 0,7 ml/min; Bước sóng cực đại phát hiện: 215 nm; thời gian lưu của asiaticosid (t_R): 18,7 phút. Phương pháp có độ tuyến tính tốt với $R^2=0,9973$. **Kết luận:** Hàm lượng asiaticosid trong rau má từ 0,09% đến 1,35% tùy theo quá trình xử lý mẫu ban đầu và phương pháp chiết xuất mẫu trong hầm hoặc sắc.

Từ khóa: *Centella asiatica* (L.) Urb. - Apiaceae, asiaticoside, HPLC.

Abstract

DETERMINATION THE CONCENTRATION OF ASIATICOSIDE IN *CENTELLA ASIATICA* (L.) URB. – APIACEAE AT QUANG DIEN DISTRICT, THUA THIEN HUE PROVINCE

Dao Thi Cam Minh, Nguyen Viet Khan, Nguyen Huu Tien,

Le Thi Thanh Ngoc, Ho Viet Duc

Faculty of Pharmacy, Hue University of Medicine and Pharmacy

Background: *Centella asiatica* (L.) Urb. - Apiaceae has been used in traditional medicine to cure many diseases such as cholera dysentery, pimples, discharge, cough, sore throat, hemorrhoids and detoxification. The objective is to determine the amount of active ingredient asiaticoside in *Centella asiatica* (L.) Urb at Quang Tho 2 cooperatives, Quang Dien District, Thua Thien Hue province. **Materials and method:** *C. asiatica* after being harvested, washed and drained was dried in sunlight or in dryer with different temperature. Each 20g of *C. asiatica* was extracted using various methods with dissolving appropriate solvents. The extracted solution was diluted by extracted solvent. This diluted solution was filtered through 0.45µm membrane filter for the purpose of chromatography. **Results:** The chromatography condition: mobile phase consisting of methanol: Trifluoroacetic acid 1% (60: 40); Column: HiQ Sil C18 (4.6 x 250 mm) 3µm; flow rate at 0.7 ml/min; The maximum detection wavelength: 215 nm; retention time of asiaticosid (t_R): 18.7 minutes. **Conclusion:** The content of asiaticoside in sample is from 0.09% to 1.35% depending on the initial sample handling and sample extraction method.

Keywords: *Centella asiatica* (L.) Urb. - Apiaceae, asiaticoside, HPLC.

- Địa chỉ liên hệ: Đào Thị Cẩm Minh; Email: camminh83@yahoo.com

DOI: 10.34071/jmp.2015.2.10

- Ngày nhận bài: 16/2/2015 * Ngày đồng ý đăng: 22/3/2015 * Ngày xuất bản: 30/3/2015

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Từ xa xưa, rau má (*Centella asiatica* (L.) Urb. - Apiaceae) đã được sử dụng trong dân gian để chữa trị rất nhiều bệnh như: tả lỵ, bạch đới, mụn nhọt, khí hư, ho, viêm họng, rôm sảy, trĩ, phong, giải độc, tiêu thũng [1], [2], [3], [5]. Từ những tác dụng đó, Hợp tác xã Quảng Thọ 2, huyện Quảng Điền, tỉnh Thừa Thiên Huế đã tiến hành trồng rau má theo tiêu chuẩn Vietgap lên 40ha và đầu tư dây chuyền sản xuất trà rau má thực phẩm chức năng vào đầu năm 2014. Vì vậy, để góp phần khẳng định tác dụng chữa bệnh của các sản phẩm trà được sản xuất tại Hợp tác xã Quảng Thọ 2, đề tài được thực hiện với mục tiêu: *Xác định hàm lượng hoạt chất asiaticosid có tác dụng sinh học từ rau má trồng tại địa phương.*

2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu

- Rau má (*Centella asiatica* (L.) Urb. - Apiaceae) đã được trồng tại Hợp tác xã Quảng Thọ 2, huyện Quảng Điền, tỉnh Thừa Thiên Huế, thu mẫu vào tháng 07/2014 - 01/2014.

- Chất đối chiếu: Asiaticosid được chiết xuất tại khoa Dược, có độ tinh khiết 99%.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Xử lý mẫu, chiết xuất asiaticosid có trong rau má

2.2.1.1. Định lượng hàm lượng asiaticosid trong các mẫu phơi và sấy ở các nhiệt độ khác nhau

- Xử lý mẫu ban đầu: rau má sau khi được thu hái, rửa sạch, để ráo, phơi khô hoặc sấy khô ở 50°C, 60°C, 70°C và 110°C. Trong đó mẫu phơi khô và mẫu sấy khô ở 110°C được tiến hành tại hợp tác xã Quảng Thọ 2. Các mẫu còn lại tiến hành sấy khô tại Khoa Dược.

- Phương pháp chiết: Cân 20g/mẫu và tiến hành ngâm kiệt trong thời gian 2 ngày. Mỗi mẫu phơi hoặc sấy ở các nhiệt độ khác nhau được tiến hành chiết 3 lần để lấy kết quả trung bình.

2.2.1.2. Định lượng hàm lượng asiaticosid trong các mẫu chiết xuất bằng các phương pháp hòa tan chiết xuất thường sử dụng trong bào chế:

+ Xử lý mẫu ban đầu: phơi khô, được tiến hành tại Hợp tác xã Quảng Thọ 2.

+ Phương pháp chiết: Cân 20g/mẫu và tiến hành chiết bằng các phương pháp khác nhau:

+ Ngâm kiệt: thời gian 1 ngày, 2 ngày, 3 ngày ở nhiệt độ phòng

+ Hầm: thời gian 1 giờ ở nhiệt độ 50°C, 70°C

+ Sắc: thời gian 1,5 h, 2,5h ở nhiệt độ 100°C

Mỗi mẫu tiến hành 3 lần để lấy kết quả trung bình.

2.2.1.3. Chuẩn bị mẫu để chạy sắc ký

+ Dịch chiết thu được pha loãng vừa đủ 1000 ml với dung môi chiết. Lọc, và lấy chính xác 1ml dịch lọc đem chạy sắc ký.

+ Chuẩn gốc: Cân 19,6 mg chuẩn asiaticosid pha loãng với ethanol 60 độ vừa đủ 10 ml, được nồng độ gốc là 1960 ppm. Tiến hành pha với ethanol 60 độ được dãy các nồng độ thứ cấp là 1176 ppm, 980 ppm, 784 ppm, 392 ppm, 196 ppm, 98 ppm, 49 ppm.

2.2.1.4. Tính hàm lượng asiaticosid trong mẫu rau má:

Công thức tính hàm lượng asiaticosid trong mẫu rau má như sau:

$HL = X \cdot 100 / (1000 \cdot \text{Khối lượng khô tuyệt đối})$

trong đó: X là nồng độ asiaticosid trong mẫu đem chạy sắc ký được suy ra từ phương trình hồi quy tuyến tính của khoảng nồng độ từ 1176 ppm đến 49 ppm.

2.2.2. Chương trình chạy sắc lỏng hiệu năng cao

Hệ thống sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC-Shimadzu (CAT. N0 228, JAPAN), đi kèm phần mềm để khảo sát dung môi pha mẫu và bước sóng định lượng thích hợp. Buồng cột CTO-10AS VP với cột C18 (4,6 x 250 mm) 3µm; hệ thống bơm tự động SIL-20A HT, detector Diode array SPD-M20A.

2.2.3. **Thẩm định quy trình:** Gồm xác định tính chọn lọc, tính tuyến tính, độ phù hợp hệ thống, độ đúng, độ chính xác.

3. KẾT QUẢ

3.1. Xây dựng phương pháp

Tham khảo các tài liệu [4], [6] đã tiến hành lựa chọn được chương trình chạy sắc ký như sau:

- Pha động: Methanol: Trifluoroacetic acid 1% (60: 40)

- Cột: HiQ Sil C18 (4,6 x 250 mm) 3µm

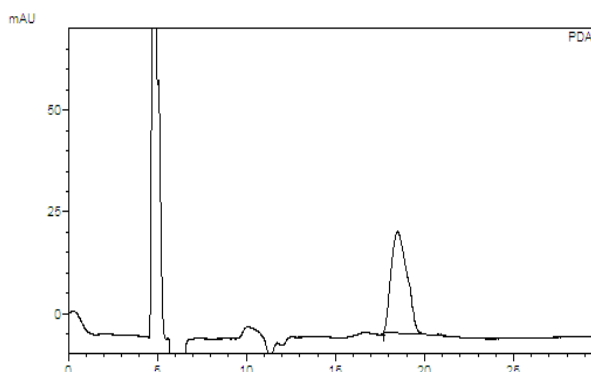
- Tốc độ dòng: 0,7 ml/min
- Bước sóng cực đại phát hiện: 215 nm
- Thể tích tiêm mẫu: 20 μ l
- Thời gian lưu của asiaticosid (t_R): 18,7 phút
- Thời gian chạy mẫu: 30 phút

3.2. Thẩm định phương pháp

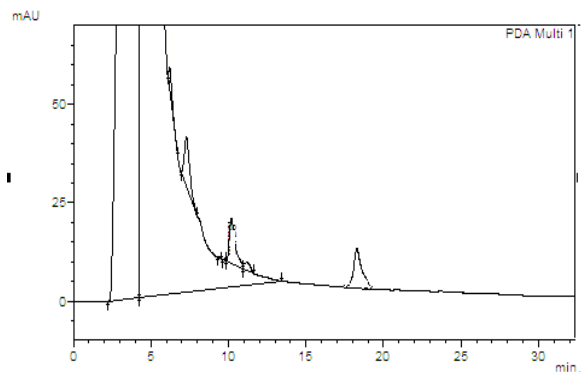
3.2.1. Tính chọn lọc

Tiến hành chiết xuất asiaticosid, pha loãng rồi chạy sắc ký và quét phổ 2 mẫu dung dịch sau:

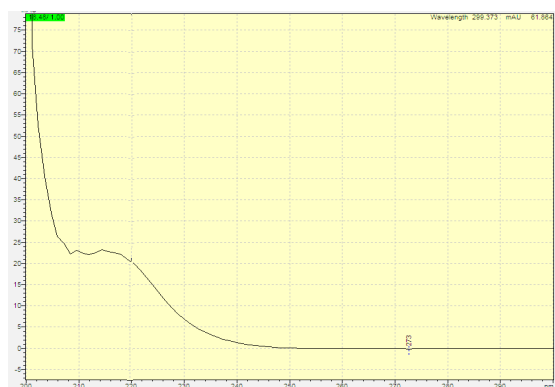
- Mẫu 1: mẫu chuẩn asiaticosid
- Mẫu 2: dịch chiết từ rau má



Hình 1. Sắc ký đồ của mẫu chuẩn asiaticosid



Hình 2. Sắc ký đồ của dịch chiết từ rau má phơi

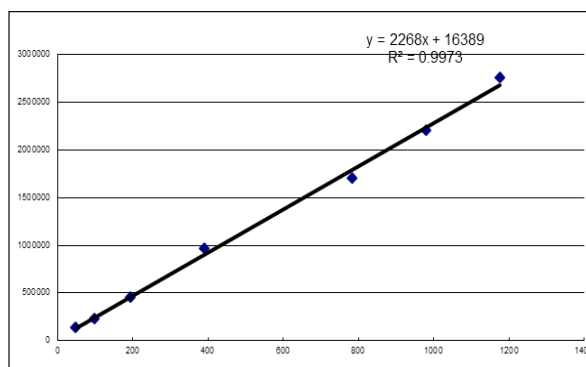


Hình 3. Phổ đồ UV của hoạt chất asiaticosid

Sắc ký đồ của mẫu chuẩn và mẫu dịch chiết từ rau má có rõ ràng, thời gian lưu của asiaticosid chuẩn là t_R là 18,7 phút, trùng hợp với đỉnh peak của sắc ký đồ của dịch chiết rau má. Bên cạnh đó, phổ UV của mẫu chuẩn và mẫu dịch chiết từ rau má tại $t_R = 18,7$ phút, có cực đại hấp thụ tại 215 nm, đặc trưng riêng cho hoạt chất asiaticosid cần phân tích, tương tự với kết quả nghiên cứu của tài liệu [4]. Vậy phương pháp có tính chọn lọc cao.

3.2.2. Tính tuyến tính

Với các dung dịch chuẩn asiaticosid có nồng độ giảm dần từ 1176 ppm, 980 ppm, 784 ppm, 392 ppm, 196 ppm, 98 ppm, 49 ppm, chạy sắc ký và thu được diện tích peak có tuyến tính với nồng độ dung dịch. Ta có phương trình hồi quy tuyến tính trong khoảng nồng độ này: $y = 2268x + 16389$ với hệ số tương quan $R=0,9973$.



Hình 4. Đồ thị biểu diễn khoảng tuyến tính của nồng độ asiaticosid chuẩn (ppm)

3.2.3. Tính phù hợp của hệ thống sắc ký

Chuẩn bị mẫu chuẩn có nồng độ 392 ppm, phân tích theo điều kiện sắc ký đã xác định. Tiến hành 6 lần liên tiếp, kết quả thời gian lưu, diện tích peak được trình bày ở Bảng 1.

Nhận xét: Độ lệch chuẩn của hệ thống phân tích nhỏ hơn 2%, điều này cho thấy phương pháp tương thích trên hệ thống sắc ký.

Bảng 1. Kết quả khảo sát tính phù hợp hệ thống

Mẫu đo	Thời gian lưu (phút)	Diện tích peak (mAU)
1	18,743	959802
2	18,667	969412
3	18,801	979433
4	18,721	959454
5	18,784	959563
6	18,689	949439
TB	18,73417	962850,5
RSD (%)	0,279948	1,06882

3.2.4. Độ chính xác

Chuẩn bị các mẫu ở 3 nồng độ khác 1176-392-49 ppm. Mỗi nồng độ làm 6 lần song song. Tiến hành chạy sắc ký. Tính RSD% nồng độ tìm lại.

Bảng 2. Khảo sát độ chính xác của phương pháp

Nồng độ (ppm)	49,00	392,00	1176,00
Nồng độ tìm lại (ppm)	57,56	429,08	1241,51
	56,40	433,44	1236,23
	57,90	437,97	1251,39
	58,81	428,92	1221,44
	58,55	428,97	1216,62
	59,89	424,38	1234,89
TB	58,20	430,46	1233,68
RSD(%)	1,87	1,07	1,04

Độ chính xác nằm trong giới hạn cho phép.

3.2.5. Độ đúng: Cho vào dung dịch mẫu thử một lượng chất chuẩn là 40ppm, tiến hành phân tích hàm lượng asiaticosid trong 6 mẫu dung dịch chất thử có thêm chuẩn, kết quả được trình bày như sau:

Bảng 3. Khảo sát độ đúng của phương pháp

Mẫu đo	Lượng mẫu (ppm)	Lượng chuẩn thêm vào (ppm)	Lượng tìm thấy (ppm)	Tỷ lệ phục hồi (%)
1	49,0	40,0	39,5	98,9
2	49,0	40,0	40,2	100,6
3	49,0	40,0	39,8	99,7
4	49,0	40,0	38,8	96,9
5	49,0	40,0	40,4	101,0
6	49,0	40,0	39,7	99,1
Trung bình			99,4	
RSD (%)			1,3	

Kết quả cho thấy phương pháp có độ đúng cao (tỷ lệ phục hồi là 99,4%) với RSD là 1,3%, phù hợp với yêu cầu chung về đánh giá độ đúng trong phương pháp xác định hàm lượng hoạt chất trong dược liệu.

3.3. Ứng dụng phương pháp để định lượng hàm lượng asiaticosid trong rau má

3.3.1. Định lượng hàm lượng asiaticosid trong các mẫu phơi và sấy ở các nhiệt độ khác nhau

Bảng 4. Hàm lượng asiaticosid trong các mẫu rau má xử lý ban đầu khác nhau (n=3)

Mẫu đo	Xử lý mẫu ban đầu	Hàm lượng trung bình của asiaticosid (%)
1	Phơi khô	1,27
2	Sấy 50°C	0,80
3	Sấy 60°C	1,02
4	Sấy 70°C	1,08
5	Sấy 110°C	1,35

Kết quả ở Bảng 2 cho thấy mẫu sấy ở 110°C có hàm lượng asiaticosid cao nhất (1,35%) và mẫu phơi khô có hàm lượng cao thứ 2 (1,27%). Tuy nhiên khi tiến hành chiết mẫu sấy ở 110°C và mẫu phơi khô bằng phương pháp chiết siêu âm với dung môi Ethanol 70°, 30 phút x 3 lần và định tính flavonoid cao toàn phần bằng các phản ứng định tính đặc trưng của flavonoid thì mẫu sấy 110°C hầu như cho kết quả âm tính. Vì vậy chọn mẫu phơi khô để chiết bằng

Tiến hành xử lý mẫu, chiết xuất asiaticosid trong rau má theo theo phương pháp 2.1.1 và chạy sắc ký. Kết quả hàm lượng asiaticosid trong các mẫu khảo sát được trình bày ở Bảng 4.

các phương pháp khác nhằm so sánh hàm lượng asiaticosid với phương pháp ngâm kiệt.

3.3.2. Định lượng hàm lượng asiaticosid trong các mẫu chiết xuất bằng các phương pháp hòa tan chiết xuất thường sử dụng trong bào chế

Tiến hành xử lý mẫu, chiết xuất asiaticosid trong rau má theo phương pháp 2.1.2 và chạy sắc ký. Kết quả hàm lượng asiaticosid trong các mẫu khảo sát được trình bày ở Bảng 5.

Bảng 5. Hàm lượng asiaticosid trong các mẫu rau má chiết xuất bằng các phương pháp khác nhau (n=3)

Mẫu đo	Phương pháp bào chế sau khi phơi	Hàm lượng trung bình của asiaticosid (%)
1	Ngâm kiệt 1 ngày	1,13
2	Ngâm kiệt 2 ngày	1,27
3	Ngâm kiệt 3 ngày	1,34
4	Hầm ở 50°C	0,09
5	Hầm ở 70°C	0,11
6	Sắc/1,5h	0,70
7	Sắc/2,5h	0,74

Kết quả ở Bảng 3 cho thấy phương pháp ngâm kiệt trong 3 ngày cho hàm lượng asiaticosid cao nhất (1,34%).

4. BÀN LUẬN

Phương pháp định lượng có quy trình xử lý mẫu đơn giản và dễ thực hiện. Với mục đích nghiên cứu và chuyển giao quy trình chiết xuất và định lượng hoạt chất asiaticosid trong rau má cho hợp tác xã Quảng Thọ 2, quá trình xử lý mẫu đã lựa chọn ethanol và nước vì đây là các dung môi dễ kiếm, rẻ tiền, không gây độc. Bên cạnh đó, chương trình sắc ký sử dụng cột C18 (4,6 x 250 mm)

3µm là cột sắc ký phổ biến thường dùng trong phân tích sắc ký lỏng hiệu năng, dung môi pha động gồm methanol: trifluoroacetic acid 1% (60: 40) là các dung môi dễ kiếm với thể tích tiêm mẫu nhỏ. Tuy nhiên, do tốc độ dòng nhỏ (0,7 ml/phút) nên thời gian lưu hơi nhiều (18,7 phút). Mặc dù vậy đỉnh peak lại sắc nhọn, rõ ràng và phổ đồ UV ở bước sóng cực đại 215 nm phù hợp với hoạt chất asiaticosid so với [4], [6].

Về việc ứng dụng phương pháp để định lượng hàm lượng asiaticosid trong các mẫu phơi và sấy ở các nhiệt độ khác nhau, mẫu sấy ở 110°C có hàm lượng asiaticosid cao nhất (1,35%) nhưng hoạt

chất flavonoid trong mẫu hầu như không còn theo kết quả của các phản ứng định tính đặc trưng của flavonoid. Kết quả này có thể do sấy ở nhiệt độ cao làm hoạt chất bị phân hủy. Flavonoid là một hoạt chất quan trọng trong thành phần rau má, có tác dụng diệt gốc tự do, chống oxy hóa, chống viêm, chống độc, liên quan nhiều đến tác dụng của rau má. Vì vậy, nên chọn phương pháp xử lý mẫu ban đầu bằng cách phơi khô, vừa đơn giản, tiết kiệm nhiên liệu, vừa đảm bảo hàm lượng hoạt chất.

Đối với việc ứng dụng định lượng hàm lượng asiaticosid trong các mẫu chiết xuất bằng các phương pháp hòa tan chiết xuất thường sử dụng trong bào chế, kết quả cho thấy khi xử lý mẫu bằng cách phơi khô và chiết xuất bằng phương pháp ngâm kiệt trong thời gian 3 ngày thì hàm lượng asiaticosid cao (1,34%). Tuy nhiên người ta thường chọn ngâm kiệt trong thời gian 2 ngày (1,27%) để tiết kiệm thời gian và dung môi chiết nếu tiến hành ở quy mô bào chế nhỏ. Vì vậy, với việc định hướng bào chế trà tan rau má ở Hợp tác

xã Quảng Thọ 2 trên quy mô công nghiệp, nên chọn phương pháp ngâm kiệt trong 2 ngày (1,27%) để phù hợp với điều kiện cơ sở tại địa phương và vẫn đảm bảo hàm lượng hoạt chất.

5. KẾT LUẬN

Đề tài đã xây dựng và thẩm định được phương pháp định lượng asiaticosid trong rau má thu hái tại hợp tác xã Quảng Thọ 2, huyện Quảng Điền, tỉnh Thừa Thiên Huế như sau: Pha động gồm methanol: Trifluoroacetic acid 1% (60:40); Cột: HiQ Sil C18 (4,6 x 250 mm) 3 μ m; Tốc độ dòng: 0,7 ml/min; Bước sóng cực đại phát hiện: 215 nm; thời gian lưu của asiaticosid (t_R): 18,7 phút. Phương pháp có độ tuyến tính tốt với $R^2 = 0,9973$.

Sau khi khảo sát một số mẫu rau má, phương pháp định lượng cho thấy hàm lượng asiaticosid trong mẫu dao động từ 0,09% đến 1,35% tùy theo quá trình xử lý mẫu ban đầu và phương pháp chiết xuất.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Bonte F., Dumas M., Chadgne C., Meybeck A. (1993), "Influence of asiatic acid, madecassic acid and asiaticoside on human collagen I synthesis", *Planta Med.*, 60, pp. 133-135.
2. Nguyễn Thị Hoài (2003), Nghiên cứu đặc điểm thực vật và thành phần hoá học của cây Rau má, *Luận văn Thạc sĩ dược học*, Trường Đại học Dược Hà Nội.
3. Lê Thị Huyền (2010), Nghiên cứu chiết xuất một số hoạt chất Saponin từ Rau má (*Centella asiatica* (L.) Urb. – Apiaceae), trường Đại học Khoa học Huế - Đại học Huế.
4. Inamdar P.K., Yeole R.D., Ghogare A.B., Souza N.J. de (1996), "Determination of biologically active constituents in *Centella asiatica*", *Journal of Chromatography*, 742, pp. 127-130.
5. Đỗ Tất Lợi (1999), *Những cây thuốc và vị thuốc Việt Nam*, Nxb Y học, tr. 631- 632.
6. M.H. Rafamantanana, E. Rozet, G.E. Raoelison, K. Cheuk, S.U. Ratsimamanga, Ph. Hubert, J. Quetin-Leclercq (2009), "An improved HPLC-UV method for the simultaneous qualification of triterpenic glycosides and aglycones in leaves of *Centella asiatica* (L.) Urb. - Apiaceae", *Journal of Chromatography B*, 877, pp. 2396-2402.