

XÂY DỰNG PHƯƠNG PHÁP ĐỊNH LƯỢNG ADENOSIN, CORDYCEPIN TRONG ĐÔNG TRÙNG HẠ THẢO NUÔI CẤY VÀ ỨNG DỤNG KIỂM TRA MỘT SỐ MẪU TRÊN THỊ TRƯỜNG

Nguyễn Thị Thủy^{1*}, Đào Thị Thanh Thùy¹
Ngô Văn Tuyên¹, Vũ Ngọc Thắng¹
Đình Hữu Nghị¹

TÓM TẮT

Mục tiêu: Xây dựng phương pháp định lượng adenosin và cordycepin trong đông trùng hạ thảo (*Cordyceps militaris*) nuôi cấy và ứng dụng kiểm tra một số mẫu trên thị trường.

Đối tượng và phương pháp: Các mẫu đông trùng hạ thảo nuôi cấy tại Viện Kiểm nghiệm nghiên cứu dược và trang thiết bị y tế Quân đội và một số mẫu trên thị trường. Khảo sát lựa chọn điều kiện sắc kí, dung môi chiết mẫu và thẩm định phương pháp định lượng theo hướng dẫn của ICH.

Kết quả: Xây dựng thành công phương pháp định lượng đồng thời adenosin và cordycepin trong đông trùng hạ thảo nuôi cấy bằng HPLC. Áp dụng phương pháp đã xây dựng để định lượng 3 mẫu quả thể đông trùng hạ thảo nuôi cấy tại Viện và 4 mẫu trên thị trường (3 mẫu quả thể và 1 mẫu viên nang). Kết quả cho thấy hàm lượng adenosin và cordycepin trong các mẫu quả thể tương ứng nằm trong khoảng từ 2,26-2,98 mg/g và 1,73-6,51 mg/g tính theo khối lượng khô, trong mẫu viên nang tương ứng là 0,13 mg/viên và 0,86 mg/viên tính theo khối lượng trung bình bột thuốc trong nang.

Kết luận: Có thể ứng dụng phương pháp để phân tích một số mẫu đông trùng hạ thảo và viên nang, góp phần kiểm soát chất lượng các sản phẩm chứa đông trùng hạ thảo trên thị trường; đồng thời, áp dụng phân tích, nghiên cứu phát triển các sản phẩm mới từ đông trùng hạ thảo.

Từ khóa: HPLC, adenosin, cordycepin, đông trùng hạ thảo, *Cordyceps militaris*.

ABSTRACT

Objectives: To develop a method for quantifying adenosine and cordycepin in cultivated *Cordyceps* (*Cordyceps militaris*) and application in testing market samples.

Subjects and methods: Samples of cultivated *Cordyceps* at the Military Institute of Drug Testing, Pharmaceutical Research, and Medical Equipment and some samples on the market were studied. The study involved selecting chromatographic conditions, extraction solvents, and validating the quantification method according to ICH (International Conference on Harmonisation) guidelines..

Results: A successful method was developed for simultaneously quantifying adenosine and cordycepin in cultivated *Cordyceps* using HPLC (High-Performance Liquid Chromatography). This method was applied to quantify three cultivated *Cordyceps* fruiting body samples from the Institute and four market samples (three fruiting body samples and one capsule sample). The results showed that the adenosine and cordycepin content in the fruiting body samples ranged from 2.26-2.98 mg/g and 1.73-6.51 mg/g, based on dry weight, respectively, in the capsule samples, they were 0.13 mg/capsule and 0.86 mg/capsule, respectively, based on the average weight of the powder in the capsule.

Conclusion: The method can be applied to analyze some *Cordyceps* samples and capsules, contributing to quality control of *Cordyceps*-containing products on the market; At the same time applying analysis and development of new products from *Cordyceps*.

Keywords: HPLC, adenosine, cordycepin, *Cordyceps*, *Cordyceps militaris*.

Chịu trách nhiệm nội dung: Nguyễn Thị Thủy, Email: hienthuy1509@gmail.com

Ngày nhận bài: 23/10/2023; mời phản biện khoa học: 11/2023; chấp nhận đăng: 13/12/2023

¹Viện Kiểm nghiệm, nghiên cứu dược và trang thiết bị y tế Quân đội

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Đông trùng hạ thảo (*Cordyceps militaris*) được biết đến với nhiều tác dụng quý cho sức khỏe, như kích thích miễn dịch, chống ung thư, chống oxy

hóa, chống viêm, hạ glucose máu... [7, 9]. Những năm gần đây, ở Việt Nam, các nghiên cứu về nuôi cấy đông trùng hạ thảo (ĐTHT) đã đạt được một số thành tựu nhất định. Nhiều cơ sở kinh doanh đã

nuôi cấy ĐTHT ở quy mô lớn với mục đích tạo ra nguồn dược liệu có giá trị và năng suất cao. Các sản phẩm ĐTHT ở dạng nguyên liệu thô và các chế phẩm từ ĐTHT được bán rất nhiều trên thị trường. Do giá trị kinh tế cao, nên đã xuất hiện các sản phẩm ĐTHT giả, ĐTHT kém chất lượng.

Adenosin và cordycepin là các nucleotid có trong ĐTHT và là thành phần có hoạt tính, được coi là chất chỉ điểm để đánh giá chất lượng và phân biệt ĐTHT thật với giả [3, 5, 8]. Dược điển Trung Quốc đã có chuyên luận riêng về ĐTHT, nhưng mới chỉ quy định hàm lượng adenosin, chưa quy định hàm lượng cordycepin [4]. Ở nước ta, đã có một số nghiên cứu định lượng các hoạt chất này. Tuy nhiên, các nghiên cứu mới chỉ áp dụng trên một đối tượng mẫu cụ thể [1, 2]. Vì vậy, xây dựng phương pháp định lượng đồng thời adenosin và cordycepin trên các nền mẫu khác nhau có ý nghĩa quan trọng, cung cấp cơ sở để kiểm tra, kiểm soát chất lượng ĐTHT nuôi cấy cũng như các chế phẩm từ ĐTHT đang có mặt trên thị trường hiện nay.

Xuất phát từ thực tế trên, chúng tôi thực hiện nghiên cứu này nhằm xây dựng phương pháp định lượng adenosin và cordycepin trong ĐTHT nuôi cấy và ứng dụng để kiểm tra một số mẫu trên thị trường.

2. ĐỐI TƯỢNG, PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng, hóa chất, thiết bị nghiên cứu

- Đối tượng nghiên cứu: các mẫu quả thể ĐTHT nuôi cấy tại Viện Kiểm nghiệm nghiên cứu dược và trang thiết bị y tế Quân đội và các mẫu quả thể (mẫu M1, M2, M3), viên nang ĐTHT (mẫu M4) thu mua trên thị trường.

- Hóa chất, chất đối chiếu: methanol HPLC (Merck, Đức), natri dihydrophosphat PA (Merck, Đức), dinatri hydrophosphat PA (Merck, Đức), acid orthophosphoric PA (Merck, Đức). Chuẩn đối chiếu adenosin (số lô: LC32522, 99,43%, AK Scientific); cordycepin (số lô: PRF2111741, 99,8%, Biopurify).

- Máy móc, thiết bị: hệ thống sắc kí lỏng hiệu năng cao Prominence-i LC2030 3D Plus (Shimadzu, Nhật Bản), cột sắc kí C18 (GL Sciences, 250 x 4,6 mm, 5 µm), cân phân tích AB 265 (0,01 mg) và XS 204 (0,1 mg) (Mettler Toledo, Đức), tủ sấy UNB 400 Memmert, máy lắc siêu âm Easy 180H (Elma, Đức), màng lọc mẫu 0,45 µm (Sartorius, Đức) và một số dụng cụ thủy tinh (pipet, bình định mức, ống đong các loại...).

2.2. Phương pháp nghiên cứu

- Khảo sát điều kiện sắc kí: lựa chọn điều kiện sắc kí ban đầu để khảo sát như sau: cột pha đảo

C18 (250 mm x 4,6 mm, 5 µm); nhiệt độ cột 30°C; pha động MeOH : nước (15 : 85, v/v), detector UV 260 nm; tốc độ dòng 1,0 ml/phút; thể tích tiêm 20 µl. Tiêm dung dịch chuẩn hỗn hợp và dung dịch thử vào hệ thống sắc kí kết hợp thay đổi pha động và tốc độ dòng. Dựa vào các thông số thời gian lưu, diện tích pic, số đĩa lí thuyết, hệ số đối xứng, hệ số phân giải để chọn điều kiện sắc kí phù hợp.

- Khảo sát lựa chọn dung môi chiết mẫu: khảo sát với ba dung môi chiết khác nhau là EtOH 50%, MeOH 50% và nước.

- Quy trình xử lí mẫu: cân chính xác khoảng 0,2g quả thể ĐTHT đã được nghiền mịn vào bình định mức 50 ml. Thêm 40 ml dung môi khảo sát, chiết siêu âm trong 60 phút, để nguội, bổ sung vừa đủ thể tích bằng dung môi khảo sát, li tâm 5.000 vòng/phút trong 5 phút, thu dịch chiết và lọc qua màng 0,45 µm. Tiêm vào hệ thống sắc kí. Dựa vào diện tích pic adenosin và cordycepin, pic tạp và khả năng phân tách của các pic hoạt chất và tạp để lựa chọn dung môi chiết mẫu phù hợp.

- Thẩm định phương pháp phân tích: thẩm định tính tương thích hệ thống, độ chọn lọc - đặc hiệu, độ tuyến tính và khoảng xác định, độ lặp lại, độ đúng, giới hạn phát hiện, giới hạn định lượng của phương pháp theo hướng dẫn của ICH [6].

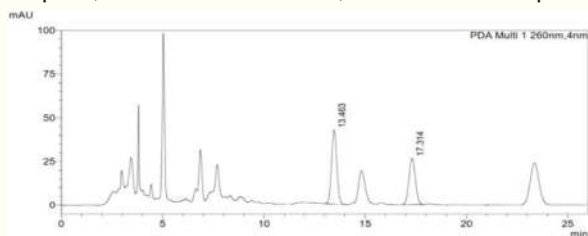
- Ứng dụng để kiểm tra một số mẫu ĐTHT trên thị trường: kiểm tra các mẫu quả thể ĐTHT nuôi cấy tại cơ sở nghiên cứu và 4 mẫu trên thị trường (3 mẫu quả thể khô và 1 mẫu viên nang có chứa ĐTHT). Thẩm định tính chọn lọc - đặc hiệu trên 4 nền mẫu ĐTHT và độ đúng, độ lặp lại trên nền mẫu viên nang. Xác định hàm lượng adenosin và cordycepin trong các mẫu nghiên cứu.

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ BÀN LUẬN

3.1. Kết quả khảo sát điều kiện sắc kí

Với pha động ban đầu là MeOH : nước (15 : 85, v/v), trên sắc kí đồ mẫu chuẩn, thời gian lưu của adenosin và cordycepin không ổn định. Khảo sát tiếp với hệ pha động gồm MeOH : đệm phosphat pH 6,5 ở các tỉ lệ 15 : 85; 12 : 88; 10 : 90, tốc độ dòng 1,0 ml/phút cho thấy, trên sắc kí đồ mẫu chuẩn, thời gian lưu của hai chất phân tích là ổn định, lặp lại. Tuy nhiên, trên sắc kí đồ mẫu thử, pic của hai chất này không tách hoàn toàn khỏi pic tạp. Tiến hành thay đổi tỉ lệ pha động kết hợp với điều chỉnh tốc độ dòng để lựa chọn điều kiện sắc kí thích hợp. Kết quả cho thấy, khi sử dụng pha động MeOH : đệm phosphat pH 6,5 với tỉ lệ 13 : 87, tốc độ dòng 0,8 ml/phút hai pic adenosin và cordycepin cân đối, tách hoàn toàn khỏi các pic tạp (hình 1).

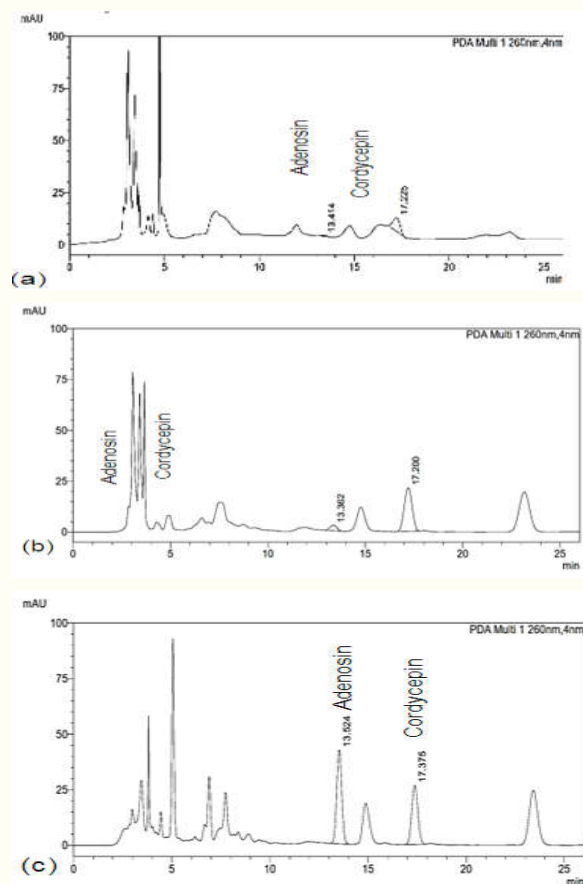
Kết quả khảo sát đã lựa chọn được điều kiện sắc kí phù hợp gồm: cột pha đảo C18 (250 mm x 4,6 mm, 5 µm); nhiệt độ cột 30°C, pha động MeOH : đệm phosphat pH 6,5 (13 : 87, v/v), tốc độ dòng 0,8 ml/phút, detector UV 260 nm, thể tích tiêm 20 µl.



Hình 1. Hình ảnh sắc kí đồ mẫu thử với pha động MeOH : đệm phosphat pH 6,5 (13 : 87).

3.2. Kết quả khảo sát lựa chọn dung môi chiết mẫu

Mẫu thử được chiết với các dung môi EtOH 50%, MeOH 50% và nước. Phân tích theo điều kiện đã lựa chọn. Kết quả sắc kí đồ mẫu thử được trình bày trong hình 2.



Hình 2. Kết quả sắc kí đồ khảo sát lựa chọn dung môi chiết mẫu. (a) Dung môi EtOH 50%; (b) Dung môi MeOH 50%; (c) Dung môi nước.

Kết quả nghiên cứu cho thấy, sử dụng EtOH 50% làm dung môi chiết mẫu thì diện tích pic adenosin

và cordycepin thu được là rất nhỏ, các pic hoạt chất bị chồng lấp, không tách hoàn toàn khỏi các pic tạp. Khi chiết mẫu với MeOH 50%, diện tích pic adenosin nhỏ hơn nhiều so với chiết bằng nước. Khi chiết mẫu bằng nước, diện tích pic adenosin và cordycepin thu được là lớn nhất, chứng tỏ hiệu quả chiết kiệt hoạt chất là tốt nhất. Đồng thời, pic adenosin và cordycepin tách hoàn toàn khỏi các pic tạp. Ngoài ra, nước là dung môi xanh, an toàn, không gây độc hại, dễ kiểm. Chúng tôi lựa chọn nước là dung môi chiết mẫu.

3.3. Kết quả thẩm định phương pháp

- Tính tương thích hệ thống:

Tiêm 6 lần dung dịch chuẩn hỗn hợp adenosin và cordycepin ở mức nồng độ 8,0 µg/ml vào hệ thống sắc kí theo điều kiện sắc kí đã lựa chọn.

Bảng 1. Kết quả đánh giá tính tương thích hệ thống

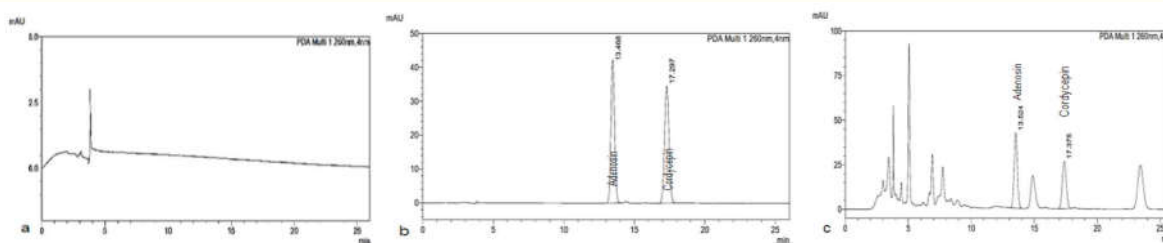
TT	Adenosin			Cordycepin		
	tR	Spic	AF	tR	Spic	AF
1	13,475	643.291	1,050	17,308	687.064	1,035
2	13,527	643.581	1,049	17,386	686.791	1,034
3	13,566	643.342	1,049	17,438	687.399	1,034
4	13,559	643.401	1,050	17,425	687.931	1,033
5	13,551	643.475	1,050	17,412	687.902	1,033
6	13,538	643.387	1,049	17,397	687.126	1,036
X̄	13,54	643.413		17,39	687.369	
RSD	0,24%	0,02%		0,27%	0,07%	

tR: thời gian lưu; Spic: diện tích pic;
AF: hệ số bất đối

Kết quả từ bảng 1 cho thấy, độ lệch chuẩn tương đối (RSD) của thời gian lưu và diện tích pic của adenosin lần lượt là 0,24% và 0,02%. Các giá trị này đối với cordycepin tương ứng là 0,27% và 0,07%. Hệ số bất đối xứng của pic adenosin và cordycepin tương ứng nằm trong khoảng 1,049-1,050 và 1,033-1,036. Như vậy, phương pháp phân tích bảo đảm tính tương thích hệ thống.

- Tính chọn lọc - đặc hiệu: tiến hành tiêm mẫu trắng, mẫu chuẩn và mẫu thử (mẫu quả thể nuôi cấy tại cơ sở nghiên cứu) vào hệ thống sắc kí. Kết quả SKĐ được thể hiện:

Tại vị trí xuất hiện pic của adenosin và cordycepin trên sắc kí đồ mẫu chuẩn, không có tín hiệu pic trên sắc kí đồ mẫu trắng. Sắc kí đồ mẫu thử xuất hiện các pic có thời gian lưu tương ứng, các pic này tách hoàn toàn khỏi các pic tạp. So sánh phổ hấp thụ UV-Vis của pic adenosin và cordycepin trong sắc kí đồ của mẫu thử và mẫu chuẩn là tương đồng nhau. Như vậy, phương pháp phân tích bảo đảm tính chọn lọc - đặc hiệu (hình 3).



Hình 3. Hình ảnh sắc kí đồ mẫu trắng, mẫu chuẩn và mẫu thử. (a) Mẫu trắng; (b) Mẫu chuẩn; (c) Mẫu thử.

- Độ tuyến tính và khoảng xác định: tiến hành sắc kí dãy nồng độ chuẩn hỗn hợp adenosin và cordycepin từ 2-80 µg/ml. Đánh giá mối tương quan tuyến tính giữa diện tích pic và nồng độ các chất phân tích. Kết quả thu được như sau (bảng 2):

Bảng 2. Kết quả thẩm định độ tuyến tính và khoảng xác định (n = 3)

Ngày		X1	X2	X3	X4	X5	X6	
Adenosin	1	C (µg/ml)	2,02	4,04	8,08	16,16	40,41	80,82
		(mAU.s)	161.071	321.947	643.405	1.292.005	3.218.671	6.440.577
	2	C (µg/ml)	2,07	4,13	8,26	16,53	41,32	82,65
		(mAU.s)	164.894	327.294	662.036	1.326.420	3.306.361	6.631.106
	3	C (µg/ml)	2,01	4,03	8,06	16,12	40,29	80,58
		(mAU.s)	159.459	317.688	635.529	1.279.492	3.194.817	6.404.379
Phương trình hồi quy trung bình: $y = 79802,57x - 1649,82$; $r \approx 1$								
Cordycepin	1	C (µg/ml)	2,08	4,15	8,30	16,61	41,52	83,03
		(mAU.s)	171.824	342.916	687.085	1.379.101	3.425.253	6.857.474
	2	C (µg/ml)	1,96	3,92	7,83	15,67	39,17	78,34
		(mAU.s)	162.108	323.318	647.295	1.298.262	3.252.071	6.492.177
	3	C (µg/ml)	2,21	4,41	8,82	17,65	44,12	88,23
		(mAU.s)	180.906	361.600	726.576	1.462.485	3.666.359	7.312.892
Phương trình hồi quy trung bình: $y = 82805,81x - 202,46$; $r \approx 1$								

Kết quả bảng 2 cho thấy, trong khoảng nồng độ khảo sát, diện tích pic và nồng độ của adenosin và cordycepin có quan hệ tuyến tính chặt chẽ với nhau ($r \approx 1$). Phương trình hồi quy thu được đối với adenosin và cordycepin lần lượt là $y = 79802,57x - 1649,82$ và $y = 82805,81x - 202,46$.

- Độ lặp lại: đánh giá độ lặp lại bằng cách phân tích sắc kí 12 mẫu thử riêng biệt (6 mẫu thử/ngày) theo điều kiện đã lựa chọn được. Kết quả độ lặp lại trong ngày và khác ngày thu được như sau:

Bảng 3. Kết quả thẩm định độ lặp lại trong ngày và khác ngày

Độ lặp lại		Adenosin (mg/g)		Cordycepin (mg/g)	
		Ngày 1	Ngày 2	Ngày 1	Ngày 2
Trong ngày	1	2,36	2,39	1,65	1,65
	2	2,42	2,40	1,66	1,61
	3	2,39	2,38	1,66	1,63
	4	2,40	2,39	1,66	1,61
	5	2,36	2,38	1,65	1,60
	6	2,41	2,41	1,68	1,62
	TB (n = 6)	2,39	2,39	1,66	1,62
	SD (n = 6)	0,03	0,01	0,01	0,02
	RSD (% , n = 6)	1,08	0,43	0,70	1,12
Khác ngày	TB (n = 12)	2,39		1,64	
	SD (n = 12)	0,02		0,03	
	RSD (n = 12)	0,79%		1,61%	

Kết quả bảng 3 cho thấy, phương pháp có độ lặp lại trong ngày cao với RSD thấp nhất là 0,43% và cao nhất là 1,12%. Độ lặp lại khác ngày của adenosin và cordycepin lần lượt là 0,79% và 1,61%. Như vậy, phương pháp đã xây dựng bảo đảm yêu cầu về độ lặp lại.

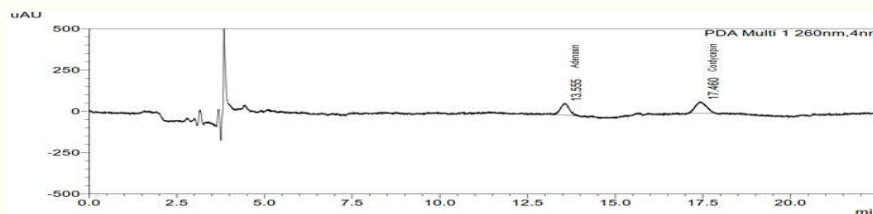
- Độ đúng: thực hiện theo phương pháp thêm chuẩn vào mẫu thử đã biết trước hàm lượng chất phân tích ở 3 mức nồng độ, mỗi mức nồng độ lặp lại 3 lần. Kết quả thẩm định độ đúng:

Bảng 4. Kết quả thẩm định độ đúng của phương pháp

Nồng độ		LQC			MQC			HQC		
		1-1	1-2	1-3	2-1	2-2	2-3	3-1	3-2	3-3
mcân (mg)		193,5	195,2	196,3	202,4	193,5	205,9	200,5	219,4	212,5
Adenosin	Cmẫu sẵn có (µg/ml)	8,44	8,51	8,56	8,82	8,44	8,98	8,74	9,57	9,27
	Cthêm vào (µg/ml)	4,13			8,26			16,53		
	Ctìm lại (µg/ml)	4,08	4,15	4,18	8,12	8,61	8,16	17,32	16,57	16,99
	Độ đúng (%)	98,67	100,53	101,10	98,28	104,15	98,73	104,80	100,25	102,76
	TB (%)	101,03								
	RSD (%)	2,38								
Cordycepin	Cmẫu sẵn có (µg/ml)	5,81	5,86	5,89	6,07	5,81	6,18	6,02	6,58	6,38
	Cthêm vào (µg/ml)	3,92			7,83			15,67		
	Ctìm lại (µg/ml)	3,81	3,85	3,83	7,91	8,06	7,56	16,36	15,81	15,91
	Độ đúng (%)	97,36	98,27	97,71	100,94	102,87	96,47	104,41	100,89	101,56
	TB (%)	100,05								
	RSD (%)	2,72								
<i>LQC, MQC, HQC: mẫu kiểm soát nồng độ thấp, nồng độ trung bình, nồng độ cao</i>										

Kết quả bảng 4 cho thấy, độ đúng của adenosin và cordycepin ở 3 mức nồng độ thêm vào lần lượt nằm trong khoảng từ 98,28-104,80% và 96,47-104,41% (RSD = 2,38% và 2,72%), đáp ứng yêu cầu về độ đúng của phương pháp phân tích (95-105%).

- Giới hạn phát hiện và giới hạn định lượng: giới hạn phát hiện (LOD) được xác định dựa vào tỉ lệ đáp ứng pic của các chất phân tích so với nhiễu đường nền (S/N). Pha loãng dịch chuẩn hỗn hợp và phân tích sắc kí. Thực nghiệm cho thấy ở nồng độ 0,016 µg/ml đối với cả adenosin và cordycepin thì tỉ lệ S/N nằm trong khoảng 3:1 và 2:1. LOD của adenosin và cordycepin là 0,016 µg/ml (hình 4).



Hình 4. Hình ảnh sắc kí đồ dung dịch chuẩn hỗn hợp ở nồng độ LOD.

Giới hạn định lượng (LOQ) đối với cả adenosin và cordycepin được xác định theo công thức:

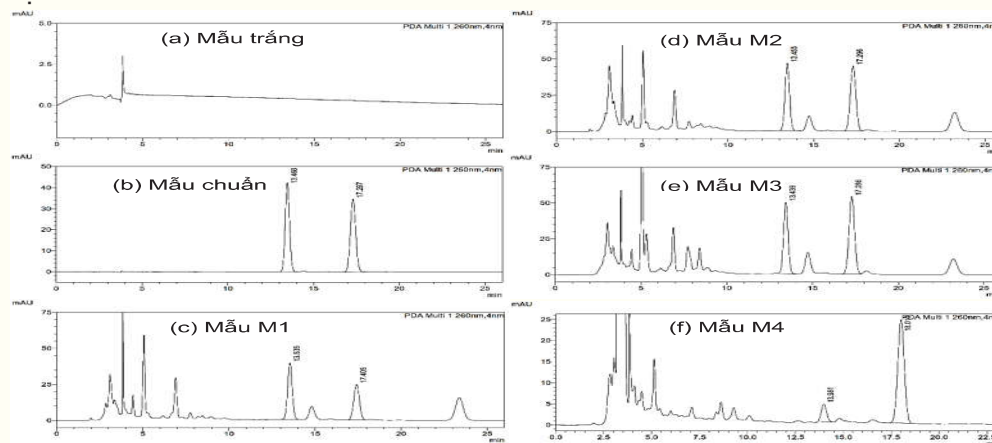
$$LOQ = 3,3 \times LOD = 3,3 \times 0,016 = 0,053 \mu\text{g/ml}.$$

3.4. Ứng dụng phương pháp đã xây dựng kiểm tra một số mẫu trên thị trường

- Kết quả thẩm định phương pháp định lượng trên các nền mẫu khảo sát: phương pháp định lượng trên đã được thẩm định với nền mẫu quả thể ĐTHT nuôi cấy đáp ứng yêu cầu theo hướng dẫn của ICH. Đối với các mẫu quả thể thu mua trên thị trường, nền mẫu tương tự như nền mẫu đã được thẩm định ở trên nên chỉ tiến hành thẩm định rút gọn tính chọn lọc - đặc hiệu. Đối với mẫu viên nang, ngoài ĐTHT, còn có các thành phần dược liệu và tá dược khác. Vì vậy, ngoài thẩm định tính chọn lọc - đặc hiệu, chúng tôi thẩm định thêm độ đúng và độ lặp lại trên nền mẫu này.

+ Tính chọn lọc - đặc hiệu: kết quả thẩm định tính chọn lọc - đặc hiệu của phương pháp trên 3 mẫu quả thể thu mua trên thị trường M1, M2, M3 và mẫu viên nang M4 (hình 5) thấy, tại vị trí xuất hiện pic adenosin và cordycepin trên sắc kí đồ mẫu chuẩn, sắc kí đồ mẫu trắng không có tín hiệu pic, sắc kí đồ mẫu thử

xuất hiện hai pic có thời gian lưu tương ứng. Đồng thời, các pic này tách hoàn toàn khỏi các pic tạp. Phổ UV-Vis của 2 pic tương ứng trong sắc kí đồ 4 mẫu khảo sát tương đồng với phổ hấp thụ của adenosin và cordycepin trong sắc kí đồ mẫu chuẩn. Điều này khẳng định phương pháp định lượng bảo đảm tính chọn lọc - đặc hiệu trên 4 nền mẫu khảo sát.



Hình 5. Hình ảnh sắc kí đồ mẫu trắng, mẫu chuẩn và mẫu thử của các mẫu khảo sát.

+ Thẩm định độ đúng và độ lặp lại trên nền mẫu viên nang M4:

Bảng 5. Kết quả thẩm định độ đúng và độ lặp lại trên mẫu viên nang M4

Nồng độ		LQC			MQC			HQC		
		1-1	1-2	1-3	2-1	2-2	2-3	3-1	3-2	3-3
mcân (mg)		354,5	361,5	356,6	353,8	364,4	351,8	361,2	353,6	354,4
Adenosin	Cmẫu sẵn có (µg/ml)	1,13	1,15	1,14	1,13	1,16	1,12	1,15	1,13	1,13
	Cthêm vào (µg/ml)	9,07			18,14			27,20		
	Ctìm lại (µg/ml)	8,92	8,84	8,88	17,77	17,62	17,67	26,40	26,36	26,41
	Độ đúng (%)	98,32	97,50	97,90	98,00	97,16	97,44	97,05	96,89	97,09
	TB (%)	97,48								
	RSD (%)	0,50								
Cordycepin	Cmẫu sẵn có (µg/ml)	7,49	7,63	7,53	7,47	7,69	7,43	7,63	7,47	7,48
	Cthêm vào (µg/ml)	2,03			8,11			12,16		
	Ctìm lại (µg/ml)	2,09	1,99	2,05	8,05	7,71	8,01	11,63	11,73	11,73
	Độ đúng (%)	103,31	98,27	100,97	99,33	95,08	98,82	95,63	96,45	96,50
	TB (%)	98,26								
	RSD (%)	2,73								

Kết quả nghiên cứu cho thấy, độ đúng của adenosin và cordycepin tương ứng nằm trong khoảng 96,89-98,32% và 95,08-103,31%. Giá trị RSD đối với adenosin và cordycepin ở 3 mức nồng độ lần lượt là 0,50% và 2,73%. Như vậy, phương pháp định lượng có độ đúng và độ lặp lại cao.

- Kết quả định lượng adenosin và cordycepin trong các mẫu khảo sát: áp dụng phương pháp đã thẩm định để xác định hàm lượng adenosin và cordycepin trong 3 mẫu quả thể nuôi cấy tại Viện Kiểm nghiệm nghiên cứu dược và trang thiết bị y tế Quân đội (mẫu V1, V2 và V3) và một số mẫu quả thể, viên nang thu mua trên thị trường. Kết quả phân tích được trình bày ở bảng 6.

Bảng 6. Kết quả định lượng adenosin và cordycepin trong các mẫu khảo sát

Mẫu	Adenosin	Cordycepin
Quả thể V1*	2,26 ± 0,04	6,51 ± 0,02
Quả thể V2*	2,28 ± 0,00	6,28 ± 0,03
Quả thể V3*	2,33 ± 0,01	5,88 ± 0,02
Quả thể M1*	2,28 ± 0,01	1,73 ± 0,02
Quả thể M2*	2,76 ± 0,04	3,19 ± 0,03
Quả thể M3*	2,98 ± 0,01	3,82 ± 0,07
Viên nang M4**	0,13*	0,86*

*Tính theo mg/g; **Tính theo mg/viên.

Hàm lượng adenosin và cordycepin trong 3 mẫu nuôi cấy tại Viện và 3 mẫu quả thể thu mua trên thị trường tương ứng nằm trong khoảng từ 2,26-2,98 mg/g và 1,73-6,51 mg/g tính theo khối lượng khô. Trong đó, các mẫu quả thể nuôi cấy tại Viện có hàm lượng cordycepin từ 5,88-6,51 mg/g cao hơn đáng kể so với một số mẫu quả thể thu mua trên thị trường (1,73-3,82 mg/g). Trong mẫu viên nang M4, hàm lượng adenosin và cordycepin lần lượt là 0,13 mg/viên và 0,86 mg/viên (tính theo khối lượng trung bình bột thuốc trong nang).

Phương pháp phân tích trong nghiên cứu này tương tự như của Phạm Văn Hiến và cộng sự, chỉ khác giá trị pH của đệm phosphat, tỉ lệ pha động và tốc độ dòng [1]. Tuy nhiên, phương pháp của tác giả nêu trên chỉ áp dụng đối với mẫu quả thể ĐTHT. Phương pháp định lượng trong nghiên cứu này đã được thẩm định trên một số nền mẫu ĐTHT và viên nang trên thị trường. Kết quả cho thấy có thể ứng dụng để phân tích một số mẫu ĐTHT và viên nang, góp phần kiểm soát chất lượng các sản phẩm chứa ĐTHT trên thị trường hiện nay cũng như áp dụng phân tích, nghiên cứu phát triển các sản phẩm mới từ ĐTHT.

4. KẾT LUẬN

Nghiên cứu đã xây dựng và thẩm định được phương pháp HPLC định lượng đồng thời adenosin và cordycepin trong ĐTHT nuôi cấy, cụ thể:

- Điều kiện sắc kí gồm: cột C18 (250 mm x 4,6 mm, 5 µm); nhiệt độ cột 30°C, pha động MeOH : đệm phosphat pH 6,5 (13 : 87, v/v), tốc độ dòng 0,8 ml/phút, detector UV 260 nm, thể tích tiêm 20 µl. Mẫu thử được chiết siêu âm với nước trong 60 phút.

- Phương pháp đã xây dựng bảo đảm tính tương thích hệ thống, độ chọn lọc - đặc hiệu, khoảng tuyến tính từ 2-80 µg/ml với hệ số tương quan $r \approx 1$; độ lặp lại trong ngày với giá trị RSD% nằm trong khoảng 0,43-1,12%, độ lặp lại khác ngày của adenosin và cordycepin tương ứng là 0,79% và 1,61%; độ đúng từ 98,28-104,80% (đối với adenosin) và 96,47-104,41% (đối với cordycepin). Giới hạn phát hiện và giới hạn định lượng của cả adenosin và cordycepin tương ứng là 0,016 µg/ml và 0,053 µg/ml.

- Với 4 nền mẫu thu mua trên thị trường, phương pháp có tính chọn lọc - đặc hiệu cao. Trên nền mẫu viên nang, độ đúng của adenosin và cordycepin tương ứng nằm trong khoảng 96,89-98,32% và 95,08-103,31%, RSD% lần lượt là 0,50% và 2,73%.

- Áp dụng phương pháp đã xây dựng để định lượng trên 3 mẫu quả thể ĐTHT nuôi cấy tại Viện và

4 mẫu thu mua trên thị trường (3 mẫu quả thể và 1 mẫu viên nang). Kết quả thấy hàm lượng adenosin và cordycepin trong các mẫu quả thể tương ứng nằm trong khoảng từ 2,26-2,98 mg/g và 1,73-6,51 mg/g tính theo khối lượng khô, trong mẫu viên nang tương ứng là 0,13 mg/viên và 0,86 mg/viên tính theo khối lượng trung bình bột thuốc trong nang.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Phạm Văn Hiến, Nguyễn Duy Bắc và cộng sự (2016), "Đánh giá hàm lượng adenosin và cordycepin trong các bộ phận khác nhau của đông trùng hạ thảo nuôi cấy (*Cordyceps sinensis* (Berk) Sacc) bằng phương pháp HPLC", *Tạp chí Dược học*, 56 (10), pp. 28-32.
2. Phan Lê Hiền, Hà Minh Hiến (2019), "Nghiên cứu xây dựng quy trình định lượng cordycepin trong đông trùng hạ thảo *Cordyceps militaris* bằng phương pháp HPLC", *Tạp chí Dược học*, 59 (3), pp. 20-23.
3. Cleaver P.D, Loomis-Powers M, Patel D (2004), "Analysis of quality and techniques for hybridization of medicinal fungus *Cordyceps sinensis* (Berk.) Sacc.(Ascomycetes)", *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 6 (2).
4. Chinese Pharmacopoeia Commission (2010), *Pharmacopoeia of the people's republic of China*, Vol. I, China Medical Science Press.
5. Hsu T.H, Shiao L.H et al (2002), "A comparison of the chemical composition and bioactive ingredients of the Chinese medicinal mushroom DongChongXiaCao, its counterfeit and mimic, and fermented mycelium of *Cordyceps sinensis*", *Food chemistry*, 78 (4), pp. 463-469.
6. International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use (ICH) (2005), *ICH guideline Q2(R1) & Q2(R2): validation of analytical procedures*, Secretariat, ICH, Editor^Editors, Geneva.
7. Tuli H.S, Sandhu S.S, Sharma A.K (2014), "Pharmacological and therapeutic potential of *Cordyceps* with special reference to *Cordycepin*", *3 Biotech*. 4, pp. 1-12.
8. Yue K, Ye M et al (2013), "The genus *Cordyceps*: a chemical and pharmacological review", *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 65 (4), pp. 474-493.
9. Zhang J, Wen C et al (2019), "Advance in *Cordyceps militaris* (Linn) Link polisaccharides: Isolation, structure, and bioactivities: A review", *International journal of biological macromolecules*. 132, pp. 906-914. □