

Nghiên cứu định lượng axit 1-Naphtalen Acetic trong sinh khối Sâm ngọc linh bằng sắc ký lỏng hiệu năng cao

Vũ Bình Dương*; Đào Văn Đôn*
Nguyễn Văn Long*; Nguyễn Thị Hương**

TÓM TẮT

Đã xây dựng được các điều kiện để định lượng axit 1-naphtalen acetic (1-NAA) trong sinh khối sâm Ngọc Linh bằng phương pháp HPLC, bao gồm: cột SAX; 40°C; pha động: MeCN: 0,025M KH₂PO₄ pH 5 (30:70); tốc độ dòng F = 0,8 ml/phút; thể tích tiêm mẫu V = 20 µl; nhiệt độ buồng bơm mẫu 4°C; detector huỳnh quang. Kết quả thử định cho thấy phương pháp có độ đặc hiệu, độ tuyến tính, độ chính xác, độ đúng cao, giới hạn định lượng thấp. Kết quả định lượng 1-NAA trong mẫu sinh khối sâm Ngọc Linh theo phương pháp đã xây dựng là 2,6 ppm với mẫu sinh khối sâm Ngọc Linh mà môi trường nuôi cấy trước khi thu hoạch không bổ sung 1-NAA.

* Từ khoá: Sinh khối sâm Ngọc Linh; Axit 1-naphtalen acetic; Định lượng.

Determination of 1-naphthalene Acid in vietnamese Ginseng cell mass by HPLC

SUMMARY

A HPLC method for the determination of 1-naphthalene acetic acid in Vietnamese ginseng cell mass was validated. Using an isocratic of acetonitrile and 0.025M KH₂PO₄ pH 5 (30:70, v:v) as the mobile phase and FR detection at 240 nm excitation and 340 nm emission, 1-NAA was separated satisfactorily within 20 min. The quantitation limit of 1-NAA was 5 ng/ml. The calibration curve of 1-NAA had a correlation coefficient close to 1. Intraday and interday precisions were about 5%. The recovery rate of extraction of 1-NAA was more than 95%. The results of 1-NAA quantitation in the Vietnamese cell mass found that: 2.6 ppm for the sample without 1-NAA in the final cell culture.

* Key words: Vietnamese ginseng cell mass; 1-naphthalene acetic acid; Determination.

ĐẶT VẤN ĐỀ

Những năm gần đây, Việt Nam đã ứng dụng thành công công nghệ sinh khối tế bào thực vật để tạo nguyên liệu sâm Ngọc Linh sinh khối phục vụ sản xuất thuốc và nhiều sản phẩm khác [1]. Công nghệ này thường phải sử dụng chất kích thích tăng trưởng, đặc biệt là 1-NAA. Nhưng 1-NAA tồn dư quá

nhều trong nguyên liệu sinh khối, có thể ảnh hưởng tới tính an toàn của các chế phẩm bào chế từ nguyên liệu này [2]. Do đó, cần có quy trình định lượng chất tồn dư 1-NAA trong nguyên liệu sinh khối thực vật nói chung và sinh khối sâm Ngọc Linh nói riêng. Vì vậy, chúng tôi tiến hành nghiên cứu này nhằm: *xây dựng quy trình định lượng 1-NAA trong sinh khối sâm Ngọc Linh.*

* Học viện Quân y

** Xí nghiệp Dược phẩm 120 - Tổng cục Hậu cần
Phản biện khoa học: PGS. TS. Nguyễn Văn Minh

NGUYÊN LIỆU VÀ THIẾT BỊ

- Sinh khối sâm Ngọc Linh (Trung tâm Nghiên cứu Ứng dụng Y - Sinh - Dược học,

Học viện Quân y cung cấp, ngày sản xuất 01 - 02 - 2009 và 01 - 03 - 2009).

- Hệ thống sắc ký lỏng hiệu năng cao Alliance Water 2695D, detector Water UV 2487 và Fluorescein 2490, buồng gia nhiệt tới nhiệt độ 70°C, bơm mẫu tự động; máy ly tâm Universal 320 - 1605; hệ thống chiết pha rắn Manifold (Alltech); hệ thống cất quay chân không Tokyo Rikakikai model N-100 (Nhật); hệ thống chiết hồi lưu; hệ thống đuổi dung môi hữu cơ bằng khí nitơ.

- Chuẩn 1-NAA (Sigma); MeOH, MeCN, nước cất đạt tiêu chuẩn HPLC.

- Các hoá chất khác: dichloromethan, axit acetic, axit hydrochloric, natri hydroxyd, n-hexan, kali dihydrophosphat... đạt tiêu chuẩn tinh khiết phân tích (Merck - PA).

KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

1. Xây dựng quy trình định lượng.

* *Khảo sát điều kiện sắc ký:*

Tiến hành khảo sát với điều kiện sắc ký: cột C18, SAX; pha động chứa đệm axit formic 0,1%, đệm phosphat kết hợp MeOH, MeCN với những tỷ lệ khác nhau, đã tìm được điều kiện sắc ký thích hợp: cột trao đổi anion phenomenex: 4,6 x 250 mm, 5 µm; nhiệt độ cột 40°C; pha động: MeCN: 0,025M KH₂PO₄ pH 5 (30:70...); tốc độ dòng F = 0,8 ml/phút; thể tích tiêm mẫu V = 20 µl; nhiệt độ buồng bơm mẫu 4°C; detector huỳnh quang với bước sóng kích thích 220 nm và phát xạ 340 nm.

* *Khảo sát phương pháp xử lý mẫu:*

Xử lý mẫu theo 2 phương pháp: không loại tạp bằng SPE và có loại tạp bằng SPE, sau đó tiến hành phân tích mẫu theo điều

kiện sắc ký đã khảo sát ở trên. Kết quả cho thấy: phương pháp loại tạp bằng SPE (*hình 1 và hình 2*) có thể loại được hầu hết các tạp chất ra khỏi mẫu khi đưa vào phân tích HPLC. Từ đó, chúng tôi lựa chọn được quy trình xử lý mẫu sau: cân chính xác khoảng 1g bột sinh khối sâm Ngọc Linh khô, thêm 20 ml nước deion, lắc ngâm nước 1 phút. Thêm 4 ml NaOH 50% và 2 giọt antifoam, đun sôi hồi lưu trong 3 giờ. Để nguội, ly tâm 4.000 vòng/phút trong 10 phút, lấy phần dịch trong. Tráng bình và rửa bã với 10 ml nước x 2 lần. Cho các dịch thu được vào bình gạn. Thêm 10 ml DCM, lắc trong 1 phút. Chờ phân lớp, loại bỏ lớp DCM ở dưới, lấy phần dịch nổi ở trên. Axit hoá bằng khoảng 3 - 4 ml HCl đặc tới pH < 2. Để nguội, chiết 20 ml DCM x 2 lần, lắc trong 1 phút. Chờ tách lớp, gạn lấy lớp dung môi hữu cơ phía dưới cho chảy qua 5g natri sulfat khan [4]. Gộp dịch chiết DCM và đuổi dung môi bằng dòng nitơ nhẹ ở 35°C, tới cạn. Thêm chính xác 10 ml DCM, lắc kỹ trong 1 phút. Lọc qua 2g natri sulfat khan. Bỏ khoảng 2 ml dịch lọc đầu. Lấy dịch lọc tiếp theo. Hút chính xác 1 ml dịch lọc chuyển vào cột chiết pha rắn (silica gel 2g) đã hoạt hoá với 5 ml n-hexan. Rửa cột với 5 ml 49,5% DCM, 49,5% hexan và axit acetic 1%. Rửa giải với 5 ml hỗn hợp 99% DCM axit acetic 1% x 3 lần. Lấy toàn bộ dịch rửa giải để đuổi dung môi hữu cơ bằng dòng khí nitơ tới cạn. Thêm chính xác 10 ml ACN 50% trong nước, lắc kỹ, lọc màng lọc HPLC 0,45 µm [5].

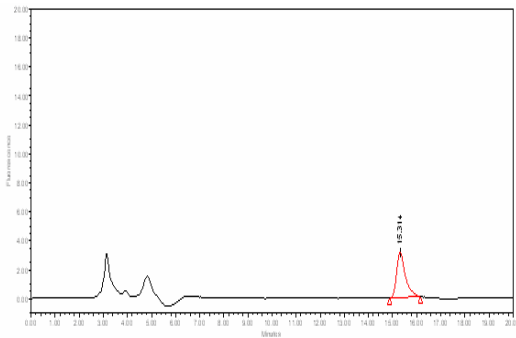
2. Thẩm định phương pháp.

* *Độ đặc hiệu:*

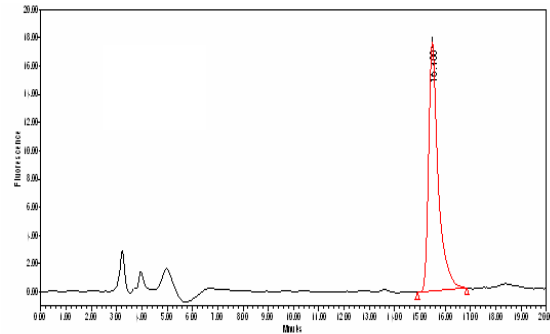
Tiến hành phân tích mẫu trắng, mẫu chuẩn và mẫu thử sinh khối sâm Ngọc Linh,

kết quả cho thấy: trong mẫu trắng không có pic tại thời điểm xuất hiện pic 1-NAA trong

mẫu thử và mẫu chuẩn; pic 1-NAA tách nhau khác biệt so với pic của tạp chất.



Hình 1: Sắc ký đồ mẫu chuẩn 1-NAA 5 ng/ml.



Hình 2: Sắc ký đồ sinh khối sâm Ngọc Linh.

*** Giới hạn định lượng dưới:**

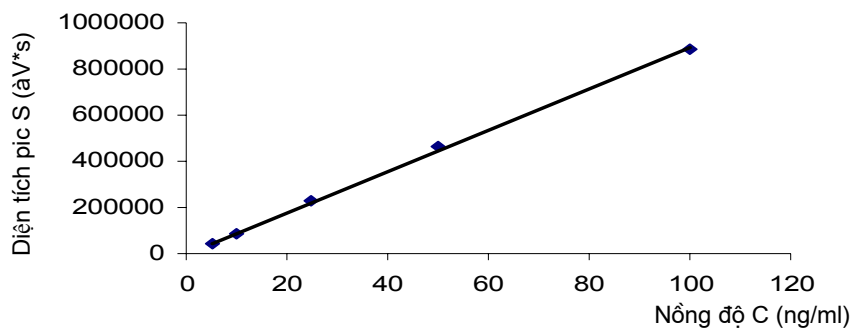
Tiến hành sắc ký 6 mẫu trắng và 6 mẫu chuẩn có nồng độ 5 ng/ml. Xác định diện tích pic của mẫu thử và mẫu trắng trong cùng khoảng thời gian xuất hiện pic từ phút thứ 15 - 16. Kết quả cho thấy: nồng độ 5 ng/ml là giới hạn định lượng dưới của phương pháp (signal/noise = 20 > 10, RSD < 5%, n = 6).

*** Đường chuẩn:**

Tiến hành pha dung dịch gốc có nồng độ 1 mg/ml trong MeCN, từ đó pha loãng dung dịch này thành các nồng độ 5, 10, 25, 50 và 100 ng/ml trong MeCN 50%. Kết quả cho thấy: trong khoảng nồng độ khảo sát, diện tích pic và nồng độ 1-NAA có sự tương quan tuyến tính với $R^2 \sim 1$.

Bảng 1: Sự phụ thuộc của diện tích pic vào nồng độ các chuẩn 1-NAA.

NỒNG ĐỘ C (ng/ml)	5	10	25	50	100
Diện tích pic S (mV*s)	39.689	84.771,4	225.146	465.150	882.617
$y = ax + b$	$S = 9.167,6 * C - 6.184,3; R^2 = 0,999$				



Hình 3: Đồ thị biểu diễn mối tương quan nồng độ 1-NAA và diện tích pic.

*** Độ đúng:**

Xác định độ đúng theo phương pháp thêm chuẩn. Mẫu thử sinh khối sâm Ngọc

Linh được thêm chính xác 1 và 5 µg 1-NAA (tương ứng 100 và 500 µl 1-NAA 10 µg/ml), mẫu đối chứng thêm MeCN 50% và tiến hành định lượng theo quy trình đã xây dựng. Kết quả cho thấy: phương pháp có độ đúng cao, thể hiện qua tỷ lệ tìm thấy 1-NAA từ > 95%.

Bảng 2: Độ đúng theo phương pháp thêm chuẩn (n = 5).

MẪU THỬ	NAA THẤM VÀO 1 µg		NAA THẤM VÀO 5 µg	
	NAA tìm thấy (µg)	Tỷ lệ NAA tìm thấy (%)	NAA tìm thấy (µg)	Tỷ lệ NAA tìm thấy (%)
1	0,943	94,3	4,468	89,3
2	1,03	103	4,845	96,9
3	0,918	91,8	4,747	94,9
4	0,976	97,6	5,245	104,9
5	0,927	92,7	4,583	91,6
$\bar{X} \pm SD$		95,9 ± 4,6		95,5 ± 5,98

* *Độ lặp lại trong ngày và khác ngày:*

Xác định độ chính xác trong ngày và khác ngày của mẫu thử và mẫu chuẩn bằng cách xử lý mẫu thử 5 lần độc lập, còn mẫu chuẩn được tiêm lặp lại các ngày [3]. Kết quả thực nghiệm cho thấy: chuẩn có độ chính xác trong ngày 0,79% (n = 5) và khác ngày 1,21% (n = 15); mẫu thử có độ chính xác trong ngày 4,2% và khác ngày từ 5,3%.

3. Định lượng 1-NAA trong sinh khối sâm Ngọc Linh.

Áp dụng quy trình định lượng đã xây dựng, tiến hành định lượng một số mẫu sinh khối sâm Ngọc Linh của Học viện Quân y. Kết quả cho thấy: hàm lượng 1-NAA trong sinh khối sâm Ngọc Linh mà môi trường nuôi cấy cuối cùng không bổ sung 1-NAA là 2,8 ppm.

Bảng 3: Hàm lượng 1-NAA trong các mẫu sinh khối sâm Ngọc Linh.

Hàm lượng 1-NAA trong các mẫu sinh khối sâm Ngọc Linh	1	2	3	4	5	$\bar{X} \pm SD$
Môi trường nuôi cấy khi thu hoạch không bổ sung 1-NAA	4,8	5,0	5,1	5,2	5,4	5,1 ± 0,22
Môi trường nuôi cấy khi thu hoạch có bổ sung 1-NAA	2,5	2,4	2,8	2,7	2,5	2,6 ± 0,16

KẾT LUẬN

Đã xây dựng quy trình định lượng 1-NAA trong sinh khối sâm Ngọc Linh có xử lý mẫu bằng SPE và phân tích bằng HPLC với điều kiện sắc ký: cột SAX; 40⁰C; pha động: MeCN: 0,025M KH₂PO₄ pH 5 (30:70...); tốc độ dòng F = 0,8 ml/phút; thể tích tiêm mẫu V = 20 µl; nhiệt độ buồng bơm mẫu 4⁰C; detector huỳnh quang. Phương pháp này có độ đặc hiệu, độ tuyến tính, độ chính xác, độ đúng cao, giới hạn định lượng thấp. Kết quả định lượng 1-NAA trong mẫu sinh khối sâm Ngọc Linh theo phương pháp đã xây dựng là 2,6 ppm với mẫu sinh khối sâm Ngọc Linh có môi trường nuôi cấy trước khi thu hoạch không bổ sung 1-NAA.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Lê Bách Quang, Hoàng Văn Lương, Nguyễn Văn Long, Vũ Bình Dương. Nghiên cứu quy trình tạo tế bào sâm Ngọc Linh. Tạp chí Y Dược học quân sự. 2006, tập 31, số 6, tr.23-29.
2. *Environmental Protection Agency (EPA)*. Naphthaleneacetic acid, salts, ester and acetamide. HED Records Center Series 361 Science Reviews-File R086913. 2003, pp.1-80.
3. Ma Z., Ge L., Lee A.S, Yong J.W, Tan S.N, Ong E.S. Simultaneous analysis of different classes of phytohormones in coconut (*Cocos nucifera* L.) water using high-performance liquid chromatography and liquid chromatography-tandem mass spectrometry after solid-phase extraction. *Anal Chim Acta*. 2008, Mar, 610 (2), pp.274-281.
4. Husain S, Sarma N. Swamy N.S, Alvi S.N, Rao R.N. High-performance liquid chromatographic separation and determination of small amounts of 2-naphthaleneacetic acid in 1-naphthaleneacetic acid. *Journal of chromatography*. 1991, Vol 558, N^o2, pp.435-439.
5. Nikolelis D.P, Ntanos N, Nikoleli G.P, Tampouris K. Development of an electrochemical biosensor for the rapid detection of naphthalene acetic acid in fruits by using air stable lipid films with incorporated auxin-binding protein 1 receptor. *Protein Pept Lett*. 2008, 15 (8), pp.789-794.