

THẨM ĐỊNH PHƯƠNG PHÁP ĐỊNH LƯỢNG BẰNG SẮC KÝ LỒNG HIỆU NĂNG CAO ĐỂ ỨNG DỤNG TRONG ĐÁNH GIÁ ĐỘ ỔN ĐỊNH CỦA CAPSAICIN

*Nguyễn Đức Cường¹; Nguyễn Chí Đức Anh²; Đỗ Thị Phương Chi²
Nguyễn Tiến Đạt²; Đào Minh Hạnh²; Đỗ Quyên²
Nguyễn Thanh Bình²; Nguyễn Thạch Tùng²*

TÓM TẮT

Mục tiêu: thẩm định phương pháp định lượng capsaicin bằng sắc ký lỏng hiệu năng cao, qua đó ứng dụng trong nghiên cứu đánh giá độ ổn định của capsaicin. *Phương pháp:* thẩm định các chỉ tiêu khoảng tuyến tính, độ lặp lại, độ đúng của phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao. Đánh giá sự phân hủy oxy hóa của capsaicin trong dung dịch hydroperoxid 3% có hay không có các chất chống oxy hóa trong những khoảng thời gian khác nhau bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao đã được thẩm định. Natri edetat, natri metabisulfit, D,L-methionin, natri hydrosulfit, hydroxytoluen butylat được sử dụng làm các chất chống oxy hóa trong nghiên cứu. *Kết quả:* các chỉ tiêu khoảng tuyến tính, độ lặp lại, độ đúng của phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao đã được thẩm định. Capsaicin bị phân hủy mạnh trong dung dịch hydroperoxid 3%. Trong số các chất chống oxy hóa được thử nghiệm, hydroxytoluen butylat là chất chống oxy hóa hiệu quả nhất trong việc bảo vệ capsaicin. *Kết luận:* đã thẩm định được phương pháp định lượng capsaicin bằng sắc ký lỏng hiệu năng cao. Lựa chọn được chất chống oxy hóa có tác dụng tốt nhất trong bảo vệ dược chất là hydroxytoluen butylat.

* Từ khóa: Capsaicin; Độ ổn định; Oxy hóa; Hydroxytoluen butylat.

A High Performance Liquid Chromatography Quantification Method of Capsaicin for Applying in Stability Assessment

Summary

Objectives: To validate methodology for the determination of capsaicin content by high performance liquid chromatography and apply in stability assessment. *Methods:* High performance liquid chromatography method was applied to validate linearity, repeatability, accuracy and to evaluate the oxidative degradation of capsaicin in 3% hydroperoxide solution with/without antioxidants after different periods. Sodium edetate, sodium metabisulfite, D,L-methionin, sodium hydrosulfite, butylate hydroxytoluene were used as the antioxidants. *Results:* The linearity, repeatability, accuracy were validated. Capsaicin was strongly degraded in 3% hydroperoxide solution.

1. Học viện Quân y

2. Trường Đại học Dược Hà Nội

Người phản hồi (Corresponding): Nguyễn Thạch Tùng (nguyenthachtung@hup.edu.vn)

Ngày nhận bài: 04/04/2019; Ngày phản biện đánh giá bài báo: 08/05/2019

Ngày bài báo được đăng: 30/05/2019

Among the antioxidants, butylate hydroxytoluene proved to be the most effective antioxidant in protection of capsaicin. Conclusions: High performance liquid chromatography method for the determination of capsaicin content was validated. Butylate hydroxytoluene was selected as the best antioxidant in protection of capsaicin.

* *Keywords: Capsaicin; Stability; Oxidation; Butylate hydroxytoluene.*

ĐẶT VẤN ĐỀ

Capsaicinoid là hỗn hợp các alcaloid được chiết từ quả ớt (*Capsicum* spp.). Trong đó, capsaicin (CAP) là thành phần chính có nhiều tác dụng sinh học, một trong những tác dụng đó là giảm đau tại chỗ nên được sử dụng trong điều trị một số chứng như đau cơ, đau đầu, đau sau phẫu thuật [2, 6]. Gần đây, với việc phát hiện ra CAP là chất kích thích thụ thể transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) đã chứng minh CAP ngoài tác dụng giảm đau còn có tác dụng chống viêm [6]. Bên cạnh đó, CAP còn được chứng minh có vai trò trong ức chế tế bào ung thư *in vitro*, tác dụng bảo vệ dạ dày [3, 6]. Tuy nhiên, trong cấu trúc của CAP có chứa nhóm chức có khả năng bị oxy hóa là nhóm -OH phenol, hơn nữa trong mạch nhánh của phân tử còn có một nhóm amid dễ bị tấn công bởi các gốc tự do, nên CAP kém ổn định. Do đó, việc sử dụng các biện pháp chống oxy hóa cho CAP ứng dụng trong bào chế chế phẩm là cần thiết [4]. Hiện nay, có ít nghiên cứu về độ ổn định của CAP. S. Alankar và CS tiến hành nghiên cứu độ ổn định của CAP, định lượng bằng phương pháp HPLC, nhưng chưa đánh giá ảnh hưởng của các chất chống oxy hóa đến độ ổn định của CAP [8]. Vì vậy, nghiên cứu này

được tiến hành nhằm: *Thẩm định phương pháp định lượng CAP bằng HPLC để ứng dụng trong đánh giá ảnh hưởng của các chất chống oxy hóa đến độ ổn định của CAP.*

NGUYÊN VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Nguyên vật liệu và thiết bị.

Chuẩn thứ cấp CAP (Fluca, hàm lượng 61,1% CAP, lô: LRAA2843), nonivamid (hàm lượng 99,1%, lô: Y0000670) (Sigma Aldrich, Đức).

Các dung môi, hóa chất sử dụng trong nghiên cứu đạt tiêu chuẩn HPLC, tiêu chuẩn phân tích được Merck (Đức) hoặc Sigma Aldrich (Đức) cung cấp.

Hệ thống HPLC (Agilent, Mỹ) gồm bơm 1260 Quat Pump VL; detector 1260 DAD VL; bộ phận ổn nhiệt 1260 TCC; hệ thống tiêm mẫu thủ công. Cột sắc ký: InertSustain Phenylhexyl silica gel (250 mm x 4,6 mm; 5 µm).

2. Phương pháp nghiên cứu.

* *Điều kiện sắc ký:*

Capsaicinoid chiết từ ớt ngoài CAP là thành phần có hoạt tính sinh học đáng quan tâm, còn chứa một thành phần có độc tính là nonivamid. Các phương pháp sắc ký thông thường sử dụng cột sắc ký C18

đều không có khả năng tách 2 pic CAP và nonivamid [1], hơn nữa trong Dược điển Việt Nam chưa có chuyên luận về Ót. Nhóm nghiên cứu đánh giá khả năng tách 2 pic CAP và nonivamid với điều kiện sắc ký như sau [5]: cột InerSustain Phenylhexyl silica gel (25 cm x 6,4 mm x 5 μ m); detector DAD bước sóng 225 nm. Pha động là axit phosphoric 0,1% - acetonitril (60:40, v/v). Tốc độ dòng 1,2 ml/phút. Nhiệt độ cột 30°C. Thể tích mẫu tiêm 20 μ l.

Chuẩn bị dung dịch chứa CAP nồng độ 0,10 mg/ml và nonivamid nồng độ 0,02 mg/ml. Quan sát sắc ký đồ để đánh giá khả năng tách của 2 chất.

- Thẩm định phương pháp định lượng CAP: theo hướng dẫn của ICH với các tiêu chí về khoảng tuyến tính, độ lặp lại, độ đúng.

* *Phương pháp đánh giá ảnh hưởng của các chất chống oxy hóa đến độ ổn định của CAP:*

- Đánh giá ảnh hưởng của chất oxy hóa đến độ ổn định của CAP:

Chuẩn bị dung dịch chuẩn CAP (A) nồng độ 1,0 mg/ml trong methanol.

Chuẩn bị dung dịch thử chứa H₂O₂ 3% (B): phối hợp dung dịch chuẩn ở trên với dung dịch H₂O₂ 3% vào bình định mức.

- Đánh giá ảnh hưởng của các chất chống oxy hóa đến độ ổn định của CAP:

Chuẩn bị 5 mẫu dung dịch thử: ban đầu tất cả mẫu được phối hợp dung dịch chuẩn A với dung dịch H₂O₂ 3%. Sau đó thêm vào mẫu M1 chất hiệp đồng chống

oxy hóa natri edetat (NaEDTA) 0,5%. Mẫu M2, M3, M4 thêm các chất chống oxy hóa bản chất thân nước: natri metabisulfit 0,5%, D,L-methionin 0,5%, natri hydrosulfit 0,5%. Mẫu M5 thêm chất chống oxy hóa bản chất thân dầu butylated hydroxytoluen (BHT) 0,5%.

Tất cả dung dịch thử được để ở nhiệt độ phòng [7], tránh ánh sáng. Sau những khoảng thời gian thích hợp: đối với dung dịch B là 0, 7, 14, 21, 28, 42 ngày, đối với 5 mẫu đánh giá ảnh hưởng của chất chống oxy hóa là 0, 14, 28, 42, 56 ngày; hút mẫu bổ sung thể tích bằng methanol để thu được dung dịch thử chứa 0,2 mg/ml CAP, H₂O₂ 0,6%, các chất chống oxy hóa và hiệp đồng chống oxy hóa 0,1%. Định lượng hàm lượng dược chất còn lại trong mẫu bằng phương pháp HPLC.

* *Xử lý số liệu và tính toán kết quả:*

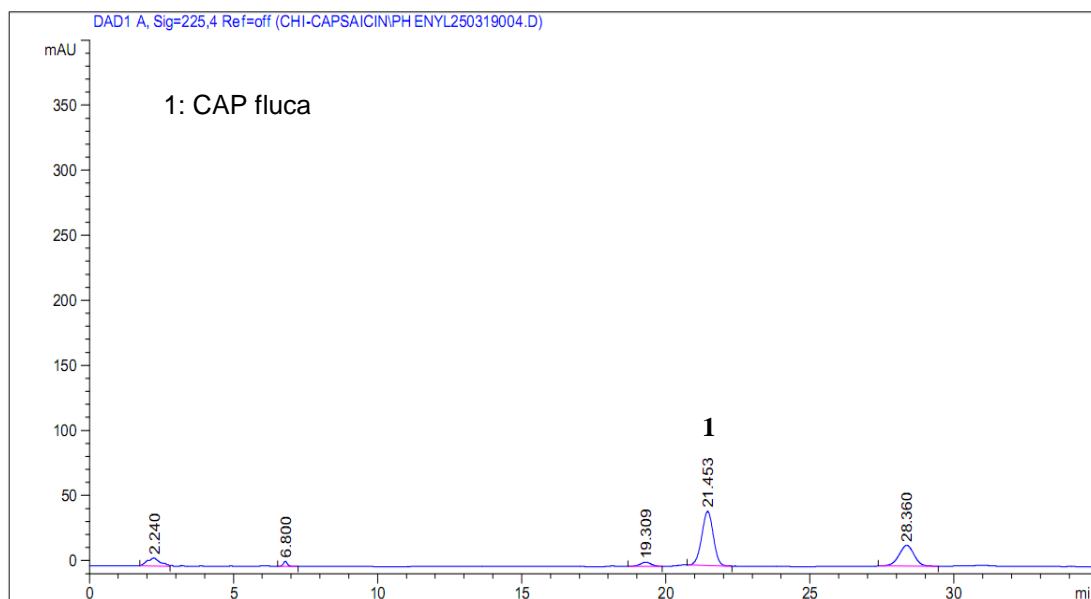
Sử dụng phần mềm Microsoft Excel 2013.

KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ BÀN LUẬN

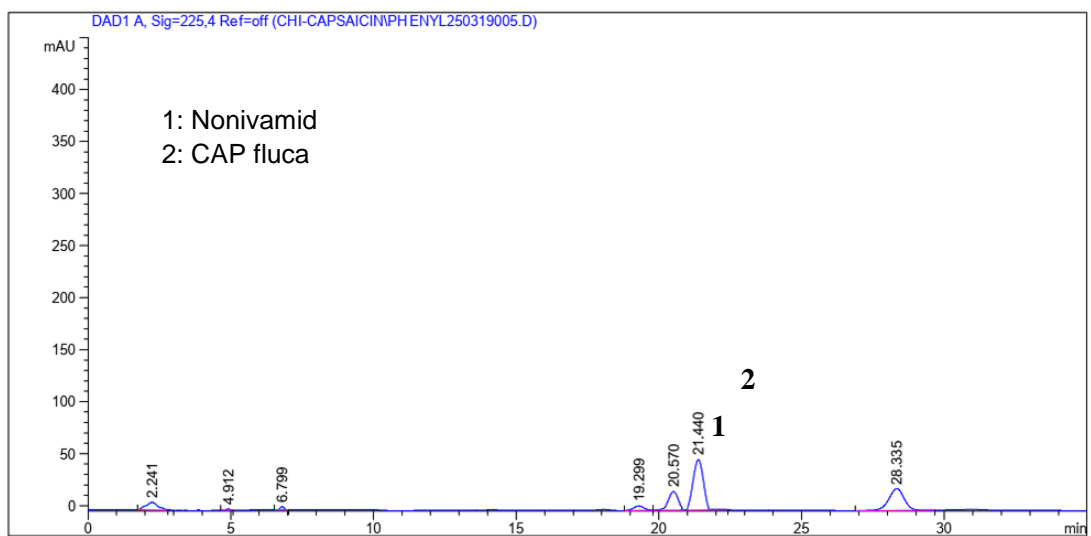
1. Kết quả thẩm định phương pháp định lượng CAP bằng HPLC.

* *Kết quả của phương pháp đánh giá khả năng tách 2 pic CAP và nonivamid:*

Tiến hành chạy sắc ký với điều kiện ở trên với 2 mẫu: mẫu 1 là dung dịch chuẩn CAP nồng độ 0,10 mg/ml; mẫu 2 là dung dịch chứa CAP nồng độ 0,10 mg/ml và nonivamid nồng độ 0,02 mg/ml, thu được hình ảnh 2 sắc ký đồ như sau:



Hình 1: Sắc ký đồ của mẫu chuẩn CAP.



Hình 2: Sắc ký đồ của mẫu chứa CAP và nonivamid.

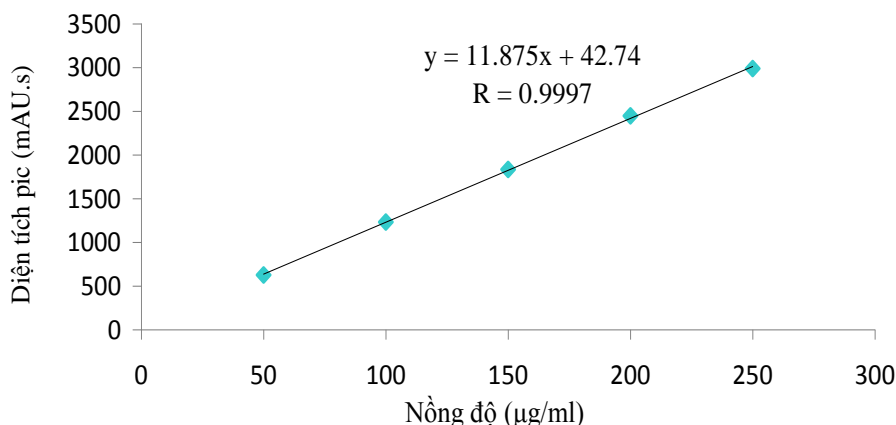
Từ sắc ký đồ của mẫu 1 và mẫu 2, với điều kiện sắc ký như trên CAP và nonivamid tách ra khỏi nhau. Do đó, có thể ứng dụng điều kiện sắc ký trên làm phương pháp định lượng CAP.

* *Kết quả thẩm định phương pháp định lượng CAP bằng HPLC:*

Kết quả đánh giá các chỉ tiêu khoảng tuyến tính, độ lặp lại và độ đúng như sau:

- Khoảng tuyến tính:

Tiến hành tiêm lần lượt 5 mẫu dung dịch chuẩn nồng độ từ 50 - 250 µg/ml.



Hình 3: Đồ thị biểu diễn mối tương quan giữa diện tích pic và nồng độ CAP.

Kết quả cho thấy trong khoảng nồng độ từ 50 - 250 µg/ml, đường biểu diễn mối tương quan giữa diện tích pic và nồng độ CAP là một đường tuyến tính có phương trình hồi quy $y = 11,875x + 42,74$; hệ số tương quan $R = 0,9997 > 0,995$. Như vậy, trong khoảng nồng độ này, diện tích pic phụ thuộc tuyến tính vào nồng độ CAP.

- Độ lặp lại: thẩm định độ lặp lại của phương pháp trên ở nồng độ 150 µg/ml. Tiến hành tiêm lặp lại 6 mẫu với nồng độ này.

Bảng 1: Độ lặp lại của phương pháp HPLC.

Thứ tự	1	2	3	4	5	6	RSD
Diện tích pic (mAU.s)	1831,5	1842,1	1840,5	1843,1	1872,2	1847,7	0,75%

Kết quả cho thấy $RSD < 2\%$ đáp ứng được yêu cầu của phương pháp phân tích.

- Độ đúng: thẩm định độ đúng của phương pháp trên ở 3 nồng độ 50, 150, 250 µg/ml, mỗi nồng độ tiêm lặp lại 3 lần.

Bảng 2: Độ đúng của phương pháp HPLC.

Nồng độ ban đầu	Nồng độ phát hiện	Độ đúng
50	49,7 ± 0,7	99,4%
150	151,5 ± 0,6	101,0%
250	247,8 ± 0,4	99,1%

Phương pháp có độ đúng trong khoảng từ 99,1 - 101,0%, đáp ứng yêu cầu của phương pháp phân tích.

Sau khi tiến hành định lượng CAP bằng HPLC cho thấy độ tin cậy của phương pháp khi đánh giá 3 chỉ tiêu khoảng tuyến tính, độ lặp lại và độ đúng. Do đó, có thể áp dụng phương pháp này để định lượng CAP trong các mẫu thử.

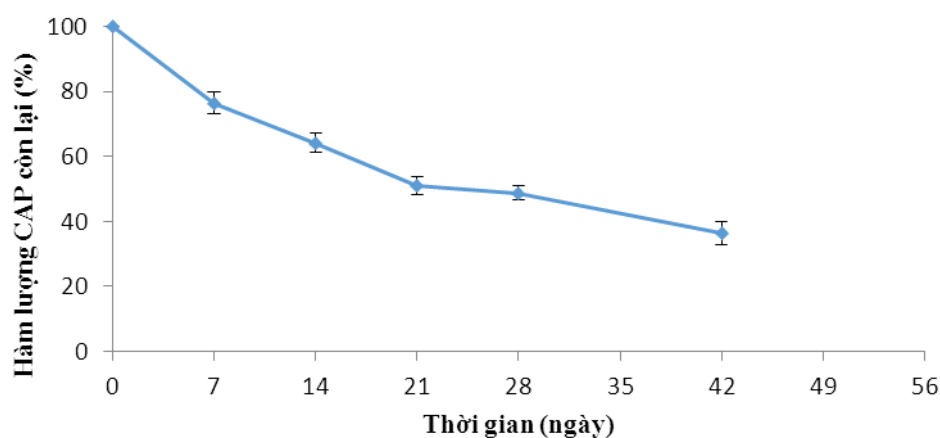
2. Kết quả đánh giá ảnh hưởng của các chất chống oxy hóa đến độ ổn định của CAP.

- Ảnh hưởng của chất oxy hóa đến độ ổn định của CAP:

Sau khi định lượng CAP còn lại trong dung dịch chứa H₂O₂ 3% theo thời gian, kết quả như sau:

Bảng 3: Tỷ lệ (%) CAP còn lại theo thời gian (n = 3).

Thời gian (ngày)	0	7	14	21	28	42
Hàm lượng (%)	100	76,5 ± 3,4	64,2 ± 3,0	50,9 ± 2,7	48,8 ± 2,0	36,5 ± 3,5



Hình 4: Phần trăm CAP còn lại trong dung dịch H₂O₂ 3% theo thời gian.

Kết quả cho thấy hàm lượng CAP trong dung dịch H₂O₂ 3% giảm nhanh sau mỗi khoảng thời gian định lượng. Sau 42 ngày, lượng CAP trong mẫu chỉ còn 36,5%. Như vậy, có thể kết luận CAP là dược chất dễ bị oxy hóa khi đưa vào dạng bào chế, cần bổ sung thêm các chất chống oxy hóa thích hợp.

Tốc độ phản ứng oxy hóa thường phụ thuộc vào nồng độ tác nhân oxy hóa trong môi trường, do vậy, muốn kết luận về bậc của phản ứng oxy hóa CAP bởi H₂O₂, cần thêm dữ liệu nồng độ H₂O₂ còn lại trong môi trường tại các thời điểm.

Dựa vào cấu trúc phân tử dược chất có thể giải thích nguyên nhân CAP bị oxy

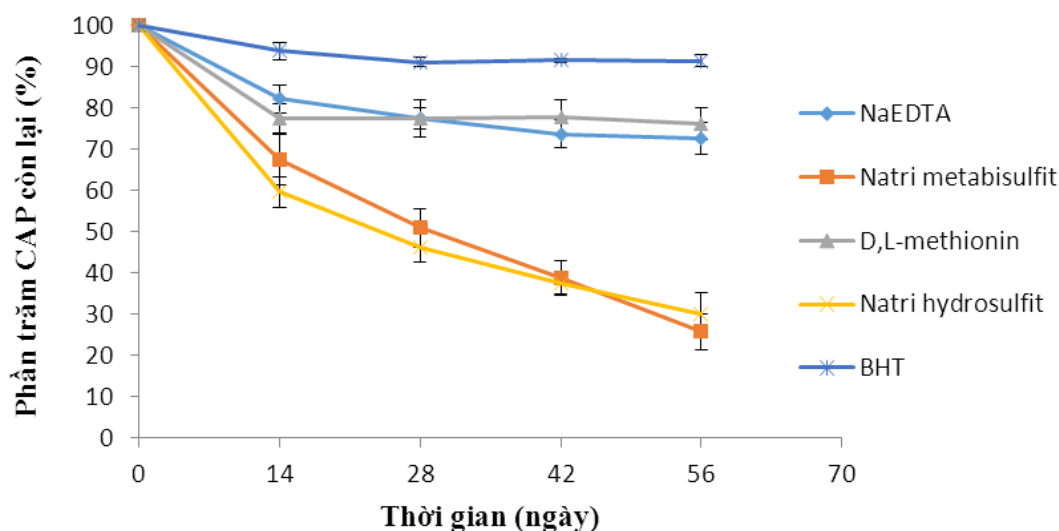
hóa là do trong phân tử có chứa nhóm -OH phenol dễ bị oxy hóa, ngoài ra trong mạch nhánh của phân tử có chứa một nhóm amid, là nơi dễ bị các gốc tự do tấn công [4].

- Ảnh hưởng của các loại chất chống oxy hóa và hiệp đồng chống oxy hóa đến độ ổn định của CAP:

Các tá dược khảo sát bao gồm natri edetat (chất hiệp đồng chống oxy hóa), natri metabisulfit, D,L-methionin, natri hydrosulfit (các chất chống oxy hóa thân nước), BHT (chất chống oxy hóa thân dầu). Khi sử dụng đơn độc các chất này ở nồng độ 0,1%, chúng ảnh hưởng đến độ ổn định của CAP (bảng 3 và hình 5):

Bảng 3: Tỷ lệ (%) CAP còn lại theo thời gian trong dung dịch H₂O₂ chứa các chất chống oxy hóa, hiệp đồng chống oxy hóa (n = 3).

Thời gian (ngày)	Tỷ lệ (%) CAP còn lại theo thời gian				
	M1	M2	M3	M4	M5
0	100	100	100	100	100
14	81,1 ± 3,5	67,5 ± 6,3	77,3 ± 3,7	59,6 ± 3,6	93,37 ± 2,1
28	77,5 ± 2,6	50,9 ± 4,6	77,4 ± 4,6	46,3 ± 3,7	91,2 ± 1,1
42	73,6 ± 3,4	38,7 ± 4,3	77,9 ± 4,0	37,6 ± 2,7	91,5 ± 0,5
56	72,8 ± 4,0	25,8 ± 4,3	76,2 ± 3,9	30,2 ± 5,1	91,4 ± 1,6



Hình 5: Ảnh hưởng của chất chống oxy hóa đến độ ổn định của CAP.

Như vậy, khi dùng đơn độc ở nồng độ 0,1%, BHT có tác dụng chống oxy hóa tốt nhất. Có thể giải thích: do cấu trúc phân tử của BHT cũng có nhóm -OH phenol tương tự được chất nên dễ bị oxy hóa, BHT sẽ thay thế được chất tham gia vào quá trình oxy hóa tốt hơn các chất chống oxy hóa còn lại [4]. Trong khi đó, NaEDTA chỉ là chất hiệp đồng chống oxy hóa nhờ khóa ion kim

loại trong môi trường - tác nhân xúc tác cho quá trình oxy hóa. Mặt khác, CAP kém bền trong môi trường axit, khá bền trong môi trường kiềm [8], do đó natri metabisulfite và natri hydrosulfite có tính axit sẽ làm giảm khả năng bảo vệ dược chất, còn D,L-methionin là axit amin có nhóm amin hơi kiềm nên dù bảo vệ dược chất không bằng BHT, nhưng vẫn tốt hơn 2 muối chứa lưu huỳnh còn lại.

KẾT LUẬN

Nghiên cứu đã thẩm định được phương pháp định lượng CAP để ứng dụng đánh giá độ ổn định của dược chất. Đã áp dụng phương pháp thẩm định để xác định hàm lượng dược chất còn lại trong dung dịch hydroperoxyd 3% có hay không có các chất chống oxy hóa, từ đó lựa chọn BHT là chất chống oxy hóa có tác dụng tốt nhất trong bảo vệ CAP.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu này được tài trợ bởi chương trình “Nghiên cứu ứng dụng và phát triển công nghệ tiên tiến phục vụ bảo vệ và chăm sóc sức khỏe cộng đồng” trong đề tài “Nghiên cứu bào chế cream, miếng dán giảm đau tại chỗ chứa capsaicinoid từ ớt (*Capsicum* spp.). Mã số KC.10.35/16-20.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. *Phuong Cao Hà*. Định lượng capsaicinoid trong quả ớt Việt Nam bằng HPLC. Luận văn Thạc sỹ Dược học. Trường Đại học Dược Hà Nội. 2018, tr.27-36.
2. *Bokhari Iram, Tahir Qurratulain*. Comparison of usefulness of topical capsicum ointment with diclofenac gel in the treatment of mastalgia.

Journal of Surgery Pakistan (International). 2015, 20, p.4.

3. *Hayman Mark, Kam Peter C.A*. Capsaicin: A review of its pharmacology and clinical applications. *Current Anaesthesia & Critical Care*. 2008, 19 (5-6), pp.338-343.

4. *Henderson David E, Slickman Adam M et al*. Quantitative HPLC determination of the antioxidant activity of capsaicin on the formation of lipid hydroperoxides of linoleic acid: A comparative study against BHT and melatonin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 1999, 47 (7), pp.2563-2570.

5. *Pharmacopoeia EU*. Pharmacopoeia European 8.0, European, NF1859, NF2529. 2014.

6. *Reyes-Escogido Maria, Gonzalez-Mondragon Edith G et al*. Chemical and pharmacological aspects of capsaicin. *Molecules*. 2011, 16 (2), pp.1253-1270.

7. *Sengupta Pinaki, Chatterjee Bappaditya et al*. Current regulatory requirements and practical approaches for stability analysis of pharmaceutical products: A comprehensive review. *International Journal of Pharmaceutics*. 2018, pp.17-21.

8. *Shrivastava Alankar, Saxena Prachi*. Stability indicating reverse phase high performance liquid chromatography method for the estimation of capsaicin. *Pharmaceutical Methods*. 2011, 2 (2), pp.135-142.