

PHƯƠNG PHÁP ĐỊNH LƯỢNG HỢP CHẤT 3,5-DIBROMO-1-HYDROXY-4,4-DIMETHOXY-2,5 CYCLOHEXADIENE-1-ACETAMIDE TỪ CAO CHIẾT LOÀI HẢI MIỀN *ACANTHELLA OBTUSA* BẰNG HPLC-DAD

Vũ Anh Tú¹, Châu Ngọc Diệp¹, Nguyễn Thị Cúc¹, Đan Thị Thúy Hằng¹, Hoàng Lê Tuấn Anh¹, Đinh Thị Nhung², Nguyễn Thị Anh Hường², Nguyễn Văn Thanh^{1*}, Nguyễn Xuân Cường¹, Nguyễn Hoài Nam¹, Châu Văn Minh¹

¹Viện Hóa sinh biển (IMBC), Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam (VAST)

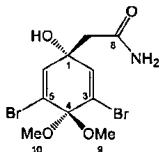
²Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội

Abstract

High performance liquid chromatography with diode array detector (HPLC-DAD) was developed for the quantitative determination of 3,5-dibromo-1-hydroxy-4,4-dimethoxy-2,5 cyclohexadiene-1-acetamide (1) in methanol extract of the sponge *Acanthella obtusa*. The separations were effected by using a mobile phase of acetonitrile and water. The gradient elution of the mobile phase was 5-20% ACN in 0-12 min, 20-60% ACN in 12-50 min, 60-75% ACN in 50-65 min, 75-95% ACN in 65-95 min. The flow rate was 0.5 ml/min and the detector wavelength was set at 210 nm. This method was validated in terms of compatibility, specificity, linearity, precision, accuracy, limit of detection and limit of quantitation.

Keywords. 3,5-dibromo-1-hydroxy-4,4-dimethoxy-2,5 cyclohexadiene-1-acetamide, *Acanthella obtusa*, HPLC.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ



Hình 1: Cấu trúc hợp chất 3,5-dibromo-1-hydroxy-4,4-dimethoxy-2,5 cyclohexadiene-1-acetamide

Các loài hải miên được coi là những nguồn dồi dào trong tự nhiên có chứa các hợp chất brominated. Nhiều hợp chất chứa brom không chỉ có hoạt tính sinh học tốt mà còn được chứng minh là những hợp chất “đánh dấu phân loại hóa học” (chemotaxonomic marker) trong các loài hải miên [1]. Trong chương trình nghiên cứu tìm kiếm các hoạt chất sinh học từ các loài hải miên vùng biển Đông Bắc Việt nam, chúng tôi đã phát hiện được hợp chất 3,5-dibromo-1-hydroxy-4,4-dimethoxy-2,5 cyclohexadiene-1-acetamide (1) có hàm lượng khá cao trong mẫu hải miên *Acanthella obtusa* thu thập tại Hạ Long, Quảng Ninh. Hợp chất này cũng đã được phân lập từ các loài hải miên khác trên thế giới như *Aplysina cauliformis* [2], *Aplysina caissara* [3], *Aplysina cavernicola* [4], *Aplysina fulva* [5],

Azinella sp. [6], nhưng chưa từng được công bố từ chi *Acanthella*. Trong bài báo này, chúng tôi báo cáo phương pháp định lượng hợp chất (1) từ cao chiết mẫu hải miên *Acanthella obtusa* bằng HPLC-DAD.

2. THỰC NGHIỆM

2.1. Thiết bị và hóa chất

Hệ thống sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) Agilent 1200, 4 kênh dung môi, bơm mẫu tự động, detector DAD, cột sắc ký Zorbax Eclipse XDB-C18 (4.6 x 150 mm, 5 μ m).

Cân phân tích Ohaus-USA độ chính xác 0,0001 g, máy siêu âm, các dụng cụ thủy tinh, bình định mức, micropipette có độ chính xác phù hợp.

Dung môi Methanol (MeOH), Acetonitril (ACN) loại dùng cho HPLC (Merck).

Sắc ký cột (CC) sử dụng silica gel (Kieselgel 60, 70–230 mesh and 230–400 mesh, Merck) và YMC RP-18 (30–50 μ m, Fuji Silysia Chemical Ltd.). Sắc ký lớp mỏng (TLC) sử dụng bản trắng sẵn silica gel 60 F₂₅₄ (1.05554.0001, Merck) và RP-18 F_{254s} plates (1.15685.0001, Merck). Vết chất được phát hiện bằng cách phun đều thuốc thử axit H₂SO₄ 10% và hơi nóng từ từ đến khi hiện màu.

2.2. Nguyên liệu

Mẫu hải miên *Acanthella obtusa* được thu tại Hạ Long, Quảng Ninh, vào tháng 11 năm 2013 và được PGS. TS. Đỗ Công Thung viện Tài nguyên Môi trường biển định loài. Mẫu tiêu bản được lưu giữ tại Viện Hóa sinh biển.

2.3. Phân lập hợp chất (1)

Mẫu hải miên *Acanthella obtusa* tươi, lạnh, được làm khô và xay nhỏ (3.0 kg), sau đó chiết trong MeOH nóng ba lần. Sau khi cất loại dung môi, cặn chiết (200 g) tiếp tục được chiết phần lớp với dung môi CH_2Cl_2 .

Cặn chiết n-hexan (80 g) được phân tách bằng hệ thống sắc ký lỏng trung áp trên silica gel pha đảo, rửa giải bằng hỗn hợp acetone/ H_2O (1.1/1) thu được các phân đoạn. Phân đoạn chứa (1) tiếp tục được chạy sắc ký cột pha thường với hệ dung môi $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{EtOAc}$ (9/1) thu được 50 mg chất (1). Hợp chất này được tinh chế thêm bằng hệ thống HPLC điều chế, rửa giải bằng hỗn hợp ACN/ H_2O thu được 33 mg 3,5-dibromo-1-hydroxy-4,4-dimethoxy-2,5

cyclohexadiene-1-acetamide tinh khiết, sử dụng làm chất chuẩn để định lượng.

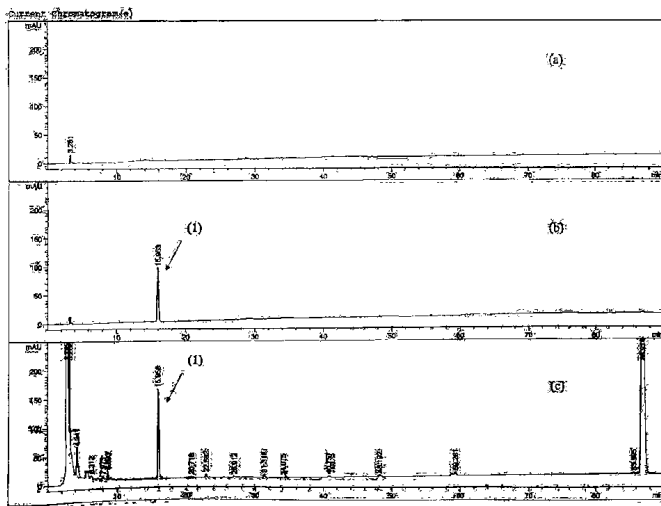
Cấu trúc hợp chất (1) được xác định bằng cách so sánh dữ liệu phổ cộng hưởng từ hạt nhân (NMR) và các hằng số vật lý với các tài liệu đã công bố [6].

2.4. Chuẩn bị mẫu phân tích

Cân khoảng 100 mg cao chiết MeOH mẫu hải miên *Acanthella obtusa*, chuyển vào bình định mức 10 ml, thêm MeOH tới vạch mức và lắc đều. Dung dịch thu được được lọc qua màng lọc 0.45 μm trước khi phân tích bằng HPLC.

2.5. Chuẩn bị mẫu chuẩn

Các dung dịch chuẩn được pha từ 3,5-dibromo-1-hydroxy-4,4-dimethoxy-2,5 cyclohexadiene-1-acetamide tinh khiết trong MeOH ở các nồng độ 10, 20, 50, 100, 250, 500 $\mu\text{g/ml}$ và được bảo quản tránh ánh sáng ở 4°C cho đến khi phân tích



Hình 2: Sắc ký đồ mẫu trắng (a), chất chuẩn nồng độ 100 $\mu\text{g/ml}$ (b) và dịch chiết MeOH của hải miên *Acanthella obtusa* nồng độ 10 mg/ml (c)

2.6. Điều kiện sắc ký (*)

Cột sắc ký Zorbax Eclipse XDB-C18 (4.6 x 150 mm, 5 μ m), detector DAD, bước sóng phát hiện 210 nm, tốc độ dòng 0.5 ml/ph, thể tích tiêm mẫu 5 μ l, pha động ACN - H₂O với chương trình dung môi: 5-20% ACN từ 0-12 phút, 20-60% ACN từ 12-50 phút, 60-75% ACN từ 50-65 phút, 75-95% ACN từ 65-95 phút.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Xây dựng phương pháp phân tích

Qua tiến hành khảo sát bước sóng cho độ hấp thụ cực đại, tỷ lệ thành phần pha động, thể tích tiêm mẫu, tốc độ dòng, chúng tôi đã xây dựng được điều kiện sắc ký thích hợp để định lượng (1) là điều kiện (*). Với điều kiện sắc ký này chất (1) có thời gian lưu là 15.96 phút và được tách khỏi các pic khác trong mẫu phân tích (hình 2). Hàm lượng chất phân tích được xác định dựa vào diện tích pic thu được và đường chuẩn.

3.2. Thẩm định phương pháp

Thẩm định phương pháp phân tích được tiến hành theo các chỉ tiêu: độ tương thích của hệ thống sắc ký, độ chọn lọc - đặc hiệu, khoảng nồng độ tuyến tính, độ chính xác, độ đúng, giới hạn phát hiện và giới hạn định lượng [7], [8].

3.2.1. Độ tương thích của hệ thống sắc ký

Chạy sắc ký 6 lần mẫu chuẩn nồng độ 100 μ g/ml theo điều kiện sắc ký đã chọn. Kết quả cho thấy RSD của thời gian lưu và diện tích pic đều nhỏ hơn 2% (bảng 1) chứng tỏ hệ thống sắc ký tương thích cho quá trình phân tích mẫu.

Bảng 1: Kết quả khảo sát tính tương thích của hệ thống

TT	Thời gian lưu (phút)	Diện tích pic (1) (mAU)
1	15.818	1242.53
2	15.891	1232.78
3	15.963	1235.8
4	15.981	1226.03
5	15.993	1236.17
6	15.978	1228.35
RSD (%)	0.43	0.48

3.2.2. Độ chọn lọc - Đặc hiệu

Tiến hành phân tích mẫu trắng, mẫu chuẩn và mẫu phân tích theo phương pháp đã xây dựng. Kết quả cho thấy (hình 2) trên sắc ký đồ của mẫu trắng tại vị trí thời gian lưu của (1) không xuất hiện pic như ở mẫu chuẩn và mẫu phân tích. Pic của (1) trong mẫu phân tích được tách biệt khỏi các pic khác. Như vậy phương pháp có tính chọn lọc tốt và độ đặc hiệu cao.

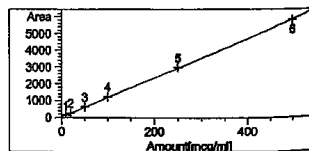
3.2.3. Khoảng nồng độ tuyến tính

Tiến hành sắc ký các mẫu chuẩn có nồng độ từ 10 – 500 μ g/ml theo phương pháp đã chọn và thiết lập mối quan hệ giữa diện tích pic với nồng độ chất chuẩn. Kết quả cho thấy trong khoảng nồng độ trên có sự tương quan tuyến tính giữa diện tích pic và nồng độ (1) với hệ số tương quan $r = 0.99990$.

Bảng 2: Kết quả khảo sát khoảng nồng độ tuyến tính

TT	Nồng độ chất chuẩn (μ g/ml)	Diện tích pic (1) (mAU)
1	0	0
2	10	131.95
3	20	259.00
4	50	637.84
5	100	1235.80
6	250	2981.22
7	500	5833.00

Phương trình hồi quy: $y = 11.65x + 35.40$
 Hệ số tương quan: $r = 0.99990$



Hình 3: Đường chuẩn biểu diễn mối tương quan giữa diện tích pic với nồng độ (1)

3.2.4. Độ chính xác

Tiến hành định lượng 6 mẫu phân tích khác nhau (được chuẩn bị theo quy trình trong mục 2.4) với điều kiện sắc ký đã lựa chọn. Kết quả (bảng 3) xác định được hàm lượng (1) trong cao chiết mẫu hải miên *Acanthella obtusa* là 1.79%, với độ lệch

chuẩn tương đối là 0.63%. Như vậy phương pháp có độ chính xác tốt, đáp ứng yêu cầu phân tích.

Bảng 3: Kết quả khảo sát độ chính xác của phương pháp

TT	Nồng độ mẫu phân tích (mg/ml)	Diện tích pic (1) (mAU)	Hàm lượng (%)
1	10.6	2257.28	1.799
2	10.2	2162.81	1.790
3	10	2110.30	1.781
4	9.8	2075.08	1.787
5	10.4	2185.28	1.774
6	9.6	2053.56	1.805
Trung bình			1.79
RSD (%)			0.63

3.2.5. Độ đúng

Thêm chính xác dung dịch chuẩn vào các mẫu phân tích (tỷ lệ 1:1 về thể tích) để thu được các dung dịch có nồng độ (1) tương ứng khoảng 80%, 100% và 120% so với nồng độ định lượng. Tiến hành sắc ký theo phương pháp đã xây dựng để xác định lượng chất chuẩn thu hồi. Kết quả (bảng 4) cho thấy phương pháp có độ đúng đáp ứng được yêu cầu của phương pháp phân tích HPLC với tỷ lệ thu hồi trung bình là 101.60% và RSD = 1.34%.

3.2.6. Giới hạn phát hiện (LOD) và giới hạn định lượng (LOQ)

Tiến hành chạy sắc ký mẫu chuẩn theo điều kiện (*) (lặp lại 4 lần) ở nồng độ thấp sao cho chiều cao pic chất chuẩn gấp 3 lần độ nhiễu đường nền. Kết quả cho thấy giới hạn phát hiện của (1) là 0.06 µg/ml và giới hạn định lượng là 0.20 µg/ml.

Bảng 4: Kết quả khảo sát độ đúng của phương pháp

TT	Nồng độ mẫu (mg/ml)	Nồng độ chất chuẩn thêm vào (µg/ml)	Diện tích pic (1) (mAU)	Lượng chất chuẩn tìm lại (µg/ml)	Tỷ lệ thu hồi (%)	Trung bình	RSD (%)
1	9.8	100	1666.95	105.01	105.01	105.17	1.31
2	10	100	1693.90	106.62	106.62		
3	10.2	100	1704.18	103.88	103.88		
4	9.8	180	2092.81	178.12	98.96	100.33	1.21
5	10	180	2134.75	182.30	101.28		
6	10.2	180	2155.36	181.33	100.74		
7	9.8	250	2488.43	246.04	98.42	99.30	1.51
8	10	250	2506.57	246.13	98.45		
9	10.2	250	2570.35	252.57	101.03		
Trung bình						101.60	1.34

4. KẾT LUẬN

Đã xây dựng được phương pháp định lượng hợp chất 3,5-dibromo-1-hydroxy-4,4-dimethoxy-2,5 cyclohexadiene-1-acetamide trong cao chiết mẫu hải miên *Acanthella obtusa* bằng phương pháp HPLC, detector DAD với các điều kiện sắc ký như trên. Kết quả thẩm định cho thấy phương pháp thỏa mãn độ tương thích của hệ thống sắc ký, độ chọn lọc - đặc hiệu, khoảng nồng độ tuyến tính, độ chính xác, độ đúng, giới hạn phát hiện và giới hạn định lượng.

Lời cảm ơn: Công trình này được hoàn thành với sự tài trợ kinh phí của Viện Hàn lâm Khoa học và

Công nghệ Việt Nam, để tài mã số: VAST.TĐ.ĐAB.06/13-15.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. P. R. Bergquist, R. J. Wells, *Chapter 1 - Chemotaxonomy of the Porifera: The Development and Current Status of the Field*, Scheuer, P. J., Ed.; Academic Press, (1983), pp. 1-50.
2. T. N. Makarieva, V. A. Stonik, P. Alcolado, Y. B. Elyakov, *Comparative study of the halogenated tyrosine derivatives from Demospongiae (Porifera)*, Comparative

- Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry, 68(3), 481-484 (1981).
3. B. M. Saeki, A. C. Granato, R. G. S. Berlinck, A. Magalhães, A. B. Schefer, A. G. Ferreira, U. S. Pinheiro, E. Hajdu, *Two Unprecedented Dibromotyrosine-Derived Alkaloids from the Brazilian Endemic Marine Sponge Aplysina caissara*, Journal of Natural Products, 65(5), 796-799 (2002).
 4. P. Ciminiello, E. Fattorusso, M. Forino, S. Magno, M. Pansini, *Chemistry of verongida sponges VIII1-bromocompounds from the mediterranean sponges Aplysina aerophoba and Aplysina cavernicola*, Tetrahedron, 53(18), 6565-6572 (1997).
 5. C. V. Nufiez, E. V. R. de Almeida, A. C. Granato, S. O. Marques, K. O. Santos, F. R. Pereira, M. L. Macedo, A. G. Ferreira, E. Hajdu, U. S. Pinheiro, G. Muricy, S. Peixinho, C. J. Freeman, D. F. Gleason, R. G. S. Berlinck, *Chemical variability within the marine sponge Aplysina fulva*, Biochemical Systematics and Ecology, 36(4), 283-296 (2008).
 6. S. H. Qi, Y. F. Wang, S. Zhang, *Steroids and alkaloids from the South China Sea sponge Axinella sp.*, J Asian Nat Prod Res, 11(12), 1040-1044 (2009).
 7. D. M. Bliesner, *Validating Chromatographic Methods: A Practical Guide*, Hoboken, John Wiley & Sons, Inc., (2006).
 8. L. Huber, *Validation of Analytical Methods*, Germany, Agilent Technologies, (2010).

Liên hệ: Nguyễn Văn Thanh

Viện Hóa sinh biển, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

Số 18, Hoàng Quốc Việt, Cầu Giấy, Hà Nội, Việt Nam

Email: thanhcmgu@yahoo.com