



XÂY DỰNG QUY TRÌNH ĐỊNH LƯỢNG BERBERIN CLORID TRONG HỆ PHÂN TÁN RẮN BERBERIN-EUDRAGIT L100

Võ Văn Lệnh^{1a}, Nguyễn Việt Cường¹, Bùi Thị Yên Linh¹, Phạm Nhật Tân¹

¹Khoa Dược, Đại học Lạc Hồng
^alenhvophar@gmail

TÓM TẮT: Berberin (BBR) là một isoquinolon alkaloid, có nhiều tác dụng dược lý như trị tiêu chảy, kháng khuẩn, kháng viêm, hạ lipid huyết, kháng *Helico pylori* và đặc biệt là chống khối u. Tuy nhiên nó có vị rất đắng, tan kém trong nước, bị kết tụ trong môi trường pH dạ dày, tính thấm kém dẫn đến sinh khả dụng của BBR rất thấp. Tạo hệ phân tán rắn (HPTR) berberin với Eudragit L100 có thể che được vị đắng và góp phần tăng sinh khả dụng của berberin. Đề tài đã xây dựng và thẩm định một quy trình định lượng berberin trong HPTR bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao nhằm góp phần xây dựng tiêu chuẩn chất lượng cho HPTR berberin-Eudragit L100.

ABSTRACT: Berberine is an isoquinolon alkaloid, has many pharmacological effects such as diarrhea, antibacterial, anti-inflammatory, lowering blood lipids, anti *Helico pylori* and especially anti tumor. However, it has a very bitter taste, poor water solubility, agglomeration in gastric pH, poor permeability leads to very low bioavailability. Preparation of solid dispersion with berberine and Eudragit L100 can mask bitter taste and contribute to increase the bioavailability of berberine. This study was to build and to validate a process of quantitative methods of berberine in solid dispersion by high-performance liquid chromatography in order to contribute to building quality standards for berberin-Eudragit L100 solid dispersion.

TỪ KHOÁ: Berberin, hệ phân tán rắn, Eudragit L100, HPLC, che vị đắng.

KEYWORDS: Berberine, solid dispersion, Eudragit L100, HPLC, mask bitter taste.

1. GIỚI THIỆU

Berberin (BBR) là một isoquinolon alkaloid phân lập từ các dược liệu như Vàng đắng (*Coscinium fenestratum*), Hoàng bá (*Phellodendron amurense*), Hoàng liên (*Coptis chinensis*); có nhiều tác dụng dược lý như trị tiêu chảy kháng khuẩn, kháng viêm, hạ lipid huyết, kháng *Helico pylori* và đặc biệt là chống khối u đã và đang được nghiên cứu gần đây^[1].

BBR có vị rất đắng, tan kém trong nước, bị kết tụ trong môi trường pH dạ dày, tính thấm kém dẫn đến sinh khả dụng của BBR rất thấp (<5%)^[2]. Các dạng bào chế của BBR hiện tại là viên nén, viên nang cứng, viên bao đường; không phù hợp với đối tượng trẻ em và chưa cải thiện được sinh khả dụng của BBR. Tạo hệ phân tán rắn với một polymer kém tan trong nước nhằm che vị đắng của các hoạt chất có là phương pháp đã được nghiên cứu và có nhiều ứng dụng^[3]. Eudragit L100 là polymer thường được lựa chọn cho phương pháp này vì khả năng tạo hệ phân tán tốt với dược chất, độ tan kém trong nước và giải phóng dược chất ở pH của dịch tiêu hóa (pH >6.8)^[4]. Từ đó, hệ phân tán rắn berberin-Eudragit L100 được nghiên cứu nhằm hướng đến cải thiện sinh khả dụng và che được vị đắng của berberin. Vì vậy một quy trình định lượng berberin trong hệ phân tán rắn đã được xây dựng và thẩm định.

2. ĐỐI TƯỢNG, PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1 Đối tượng nghiên cứu

Chất đối chiếu berberin clorid của Viện kiểm thuốc thành phố Hồ Chí Minh, hàm lượng 88,2% số lô QT122 061116; berberin clorid nguyên liệu (Trung Quốc), hàm lượng 89 %; Eudragit L100 (Pháp).

HPTR berberin-Eudragit L100 được bào chế theo phương pháp bay hơi dung môi với tỷ lệ berberin và Eudragit L100 tối ưu là 1:4.

2.2 Phương pháp nghiên cứu

Dung môi pha loãng: hỗn hợp gồm acetonitril - nước cất hai lần (25:75).

Chuẩn bị mẫu đối chiếu: cân chính xác khoảng 20 mg chất đối chiếu berberin, hòa tan trong bình định mức 100ml với methanol. Lấy chính xác 2 ml dung dịch vừa thu được, pha loãng với dung môi pha loãng trong bình định mức 50ml thu được dung dịch berberin đối chiếu. Lọc dung dịch thu được qua màng lọc 0,45 µm. Dung dịch đối chiếu có nồng độ berberin khoảng 8 mcg/ml.

Chuẩn bị mẫu thử: Cân chính xác khoảng 50 mg HPTR chứa berberin, hòa tan trong bình định mức 100ml với methanol. Lấy chính xác 2 ml dung dịch vừa thu được, pha loãng với dung môi pha loãng trong bình định mức 25 ml. Lọc dung dịch thử thu được qua màng lọc 0,45 µm.

Quy trình định lượng được thực hiện trên máy sắc ký lỏng hiệu năng cao Agilent 1260 với cột sắc ký Phenomenex Gemini C18 (250 x 4,6 mm, 5µm), đầu dò phát hiện DAD ở bước sóng 345 nm. Nhiệt độ cột 30°C, thể tích tiêm mẫu 10 µl, tốc độ dòng 1 ml/phút. Dung môi pha động: acetonitril - acid acetic 0,5% (25:75).

Hàm lượng berberin trong hệ phân tán rắn được tính theo công thức (1).

$$X(\%) = \frac{St}{Sc} \times \frac{mc \times C\%}{Nc} \times Nt \times \frac{100}{m \text{ cân}} \quad (1)$$

Received: January 3rd, 2021

Accepted: May 13th, 2021

*Corresponding Author

Email: lenhvophar@gmail

Trong đó:

Sc là diện tích pic berberin trong sắc ký đồ mẫu đối chiếu.

St là diện tích pic berberin trong sắc ký đồ mẫu thử.

mc là khối lượng cân berberin đối chiếu (mg).

C% là độ tinh khiết của berberin đối chiếu

Nc là độ pha loãng mẫu đối chiếu.

Nt là độ pha loãng mẫu thử.

m cân là khối lượng cân của hệ phân tán rắn sử dụng (mg)

Quy trình định lượng berberin được thẩm định: tính tương thích của hệ thống, tính đặc hiệu, tính tuyến tính, độ lặp lại, độ chính xác trung gian, độ đúng theo hướng dẫn của ICH^[5].

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1 Tính tương thích hệ thống

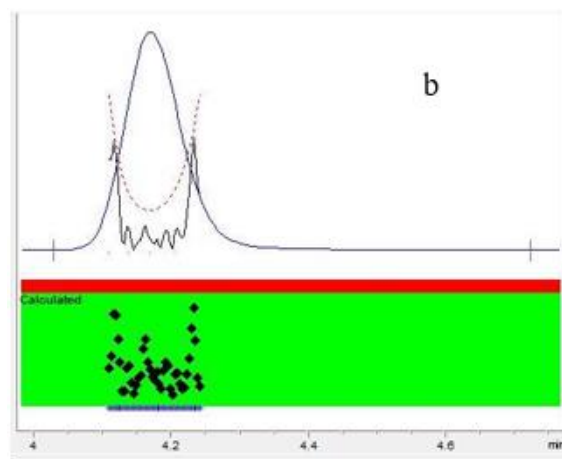
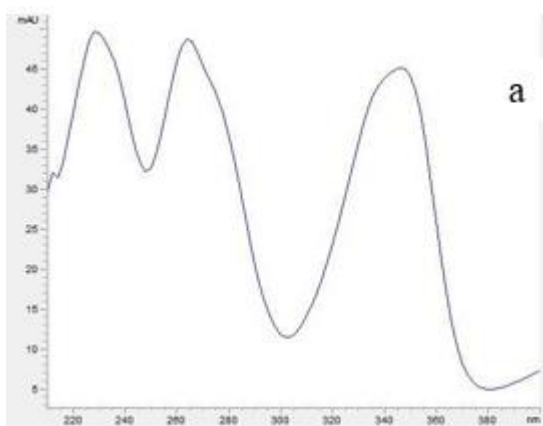
Tiến hành sắc ký 6 lần liên tiếp mẫu dung dịch đối chiếu. Kết quả RSD% của thời gian lưu và diện tích pic berberin clorid thu được sau 6 lần sắc ký $\leq 2\%$. Các thông số sắc ký như hệ số dung lượng k', hệ số đối xứng As, số đĩa lý thuyết N, độ phân giải Rs đều đạt yêu cầu. Quy trình định lượng đạt tính tương thích hệ thống.

Bảng 1. Kết quả tính tương thích hệ thống

STT	t _R (phút)	Spic (mAU*s)
1	4,199	285,403
2	4,197	285,457
3	4,190	286,210
4	4,197	286,037
5	4,199	285,798
6	4,196	285,862
TB	4,196	285,795
RSD%	0,003	0,317

3.2 Tính đặc hiệu

Tiến hành sắc ký mẫu đối chiếu, mẫu thử, mẫu thử thêm đối chiếu, mẫu dung môi. Kết quả cho thấy sắc ký đồ mẫu đối chiếu cho pic có thời gian lưu tương đương pic trong sắc ký đồ mẫu thử. Phổ UV của pic trong sắc ký đồ mẫu đối chiếu và mẫu thử có hình dạng giống nhau và có cùng bước sóng hấp thụ cực đại. Độ tinh khiết các pic đều đạt yêu cầu (hình 1). Mẫu thử thêm đối chiếu cho pic có diện tích lớn hơn pic trong sắc ký đồ mẫu đối chiếu và mẫu thử. Mẫu dung môi không cho pic tại thời gian lưu tương ứng với pic trong sắc ký đồ mẫu đối chiếu. Quy trình định lượng có tính đặc hiệu.



Hình 1. Phổ UV (a) và độ tinh khiết (b) của pic berberin trong mẫu thử

3.3 Tính tuyến tính

Tiến hành sắc ký các mẫu dung dịch đối chiếu ở các mức nồng độ khoảng 20 - 250% so với nồng độ định lượng. Sử dụng trắc nghiệm thống kê F cho thấy nồng độ berberin có trong các dung dịch đối chiếu tương quan chặt chẽ với diện tích pic thu được trên sắc ký đồ. Kiểm tra ý nghĩa của các hệ số trong phương trình hồi quy bằng phép kiểm t cho thấy các hệ số b tự do không có ý nghĩa thống kê ($\alpha = 0,05$).

Bảng 2. Kết quả tính tuyến tính

C (µg/ml)	Spic (mAU*s)
1,724	71,359
3,528	142,762
7,056	285,400
10,584	428,569
17,640	713,509

3.4 Độ lặp lại

Tiến hành sắc ký 6 mẫu thử được chuẩn bị riêng biệt. Kết quả cho thấy hàm lượng berberin trong HPTR thu được cho RSD $\leq 2\%$. Quy trình đạt yêu cầu về độ lặp lại.

Bảng 3. Kết quả độ lặp lại

	Spic (mAU*s)	X (%)
	288,420	17,802
	287,045	17,717
	286,987	17,678
	288,990	17,802
	285,956	17,721
	288,808	17,826
TB		17,758
RSD%		0,438

3.5 Độ chính xác trung gian

Thực hiện quy trình định lượng với hai kiểm nghiệm viên khác nhau, mỗi người chuẩn bị 6 mẫu thử riêng biệt và ở hai ngày làm việc khác nhau. Kết quả cho thấy hàm lượng berberin thu được của hai kiểm nghiệm viên khác nhau không có ý nghĩa thống kê ($\alpha = 0,05$). Như vậy quy trình định lượng đạt độ chính xác trung gian.

Bảng 4. Kết quả độ chính xác trung gian

	Spic (mAU*s)	X (%)
	288,602	17,742
	286,735	17,698
	285,019	17,663
	286,470	17,646
	286,007	17,618
	288,123	17,784
TB		17,692
RSD%		0,772

3.6 Độ đúng

Chuẩn bị các mẫu thử thêm đối chiếu ở các nồng độ 80%, 100% và 120% so với nồng độ định lượng. Mỗi nồng độ thực hiện 3 mẫu riêng biệt. Tiến hành sắc ký các mẫu trên. Kết quả cho thấy tỷ lệ hồi phục ở các mức nồng độ đều nằm trong khoảng 98 - 102%. RSD% của các tỷ lệ hồi phục đều nhỏ hơn 2%. Quy trình đạt yêu cầu về độ đúng.

Bảng 5. Kết quả độ đúng

Mức nồng độ	Lượng đối chiếu thêm vào (mcg/ml)	Spic (mAU*s)	Lượng đối chiếu tìm thấy (mcg/ml)	Tỷ lệ hồi phục (%)
80%	5,645	519,638	5,709	101,13
	5,645	518,975	5,692	100,84
	5,645	517,667	5,660	100,27
TB				100,745
RSD%				0,435
100%	7,056	576,627	7,116	100,84
	7,056	574,405	7,061	100,07
	7,056	574,569	7,065	100,12
TB				100,345
RSD%				0,432
120%	8,467	636,203	8,586	101,41
	8,467	636,001	8,581	101,35
	8,467	636,102	8,584	101,38
TB				101,379
RSD%				0,029

4. KẾT LUẬN

Đề tài đã xây dựng và thẩm định quy trình định lượng berberin trong HPTR berberin-Eudragit L100 bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao. Quy trình được thẩm định theo hướng dẫn của ICH cho kết quả phù hợp với yêu cầu. Quy trình được ứng dụng để kiểm tra chất lượng của bán thành phẩm và thành phẩm bào chế từ nguyên liệu HPTR berberin-Eudragit L100, góp phần phát triển các chế phẩm dạng lỏng chứa berberin nhằm cải thiện vị đắng, sinh khả dụng của berberin và phù hợp hơn với đối tượng trẻ em.

5. TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Tillhon, M., Guaman Ortiz, L. M., Lombardi, P., & Scovassi, A. I. (2012). "Berberine: New perspectives for old remedies", *Biochemical Pharmacology*, 84(10), 1260–1267.
- [2] Battu et al. (2010), "Physicochemical Characterization of Berberine Chloride: A Perspective in the Development of a Solution Dosage Form for Oral Delivery", *AAPS PharmSciTech*, 11(3), 1466–1475.
- [3] Maniruzzaman, M., Bonnefille, M., Aranyos, A., Snowden, M. J., & Douroumis, D. (2013). An in-vivo and in-vitro taste masking evaluation of bitter melt-extruded drugs. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 66(2), 323–337.
- [4] Patra, C. N., Priya, R., Swain, S., Kumar Jena, G., Panigrahi, K. C., & Ghose, D. (2017). Pharmaceutical significance of Eudragit: A review. *Future Journal of Pharmaceutical Sciences*, 3(1), 33–45.
- [5] ICH harmonised tripartite guideline, Validation of analytical procedures: Text and methodology, 2005.