

**XÂY DỰNG QUY TRÌNH PHÂN TÍCH ĐỊNH LƯỢNG APAMIN,
PHOSPHOLIPAZA A2 VÀ MELITTIN TRONG NỌC ONG LOÀI
APIS MELIFERA BẰNG PHƯƠNG PHÁP HPLC/UV**

Đến toà soạn 15 - 5 - 2015

**Lê Hữu Thọ, Nguyễn Huy Du, Nguyễn Xuân Hải, Đỗ Văn Nhật Trường
Nguyễn Trung Nhân, Nguyễn Thị Thanh Mai**
Khoa Hóa học, Trường Đại học Khoa Học Tự Nhiên-ĐHQG Tp. HCM

SUMMARY

**ESTABLISHMENT ON PROCEDURE FOR DETERMINATION
OF APAMIN, PHOSPHOLIPAZA A2 AND MELITTIN IN BEE VENOM
FROM APIS MELIFERA BY HPLC/UV**

Bee venom from Apis mellifera is a rich source of pharmacologically active components including various peptites, enzymes, and amines. By using HPLC/UV was separated the major constituents of bee venom including apamin, phospholipaza A2 (PLA₂), and melittin. In the study to develop an HPLC method to assay the venom compounds the following elements were tested: chromatographic column with C18 Phenomenex 110, separation temperature 40 °C, flow rate 0.5 mL/min, condition of gradient elution 0 – 80 % B in 70 min with mobile phase: A – TFA 0.2 % và TEA 0.16 % and B – TFA 0.1 % in mixture Axetonitrile : deionized water (8:2), UV detector at 220 nm wavelength.

Keywords: *bee venom, Apis mellifera, apamine, phospholipaza A2, melittin, HPLC/UV.*

1. MỞ ĐẦU

Nọc ong mật (Apitoxin) được sinh ra từ 2 tuyến liên đới với bộ phận tiêm của ong thợ. Nọc ong là chất lỏng không màu, tan hoàn toàn trong axit loãng, không tan trong etanol, pH khoảng 4,5 – 5,5, dễ bị phân huỷ khi tiếp xúc trực tiếp với ánh nắng mặt trời hoặc nhiệt độ cao và dễ bị phá huỷ bởi các chất oxi hóa.¹ Thành phần chính của nọc ong là các peptide như melittin, apamin,

adolapin và các enzym như phospholipaza A2 (PLA₂), histamin, epinephrin. Dạng tươi và dạng khô nọc ong đều có hoạt tính sinh học giống nhau, chỉ khác nhau về thành phần.^{2, 3} Nọc ong vốn được xem là một loại độc dược, bởi nó có chứa khá nhiều axit formic, nhiều mật khác và từ lâu đã được sử dụng trong các bài thuốc dân gian để trị một số bệnh nhất là bệnh viêm khớp.⁴⁻⁶

Hiện nay, trên thế giới có nhiều nghiên cứu về ứng dụng của nọc ong trong y học và mỹ phẩm. Các nghiên cứu cho thấy nọc ong có nhiều tác dụng sinh học như: kháng viêm khớp, cai nghiện, kháng ung thư, chữa trị các bệnh ngoài da...⁵ Hoạt tính của nọc ong chủ yếu do các peptit như apamin, phospholipaza A2 (PLA₂) và melittin quyết định. Vì vậy, việc xây dựng quy trình phân tích định lượng các các peptit chính như apamin, phospholipaza A2 và melittin là cần thiết để đánh giá chất lượng của nọc ong.

2. THỰC NGHIỆM

2.1. Phương pháp chiết xuất nọc ong

Ong mật *Apis mellifera* được nuôi tại trang trại của ông Lê Minh Điền, Ấp Đồng Nhon, xã Lương Quới, huyện Giồng Trôm, tỉnh Bến Tre. Nọc ong được chiết xuất bằng thiết bị thu thập nọc ong dựa trên cơ chế sốc điện (electric shock) để kích thích ong tiết ra nọc. Thiết bị này được đặt ngay cửa ra vào của thùng ong, khi ong bay ra bám trên dây điện, bị kích điện sẽ tiết ra nọc. Đặt một tấm kính dưới hệ thống lưới điện để hứng lấy nọc ong. Khi khô nọc ong sẽ bám trên tấm kính, dùng dao mỏng cạo lấy phần tinh thể này sẽ thu được nọc ong.

2.2. Hóa chất và thiết bị

- Chất chuẩn apamin, phospholipaza A2, melittin và nọc ong của hãng Sigma Aldrich.
- Axetonitril, axit trifluoroacetic (TFA), triethylamine (TEA), axit formic của hãng Merck.
- Thiết bị phân tích HPLC-UV 1110 của hãng Agilent.
- Thiết bị thu thập nọc ong BVC 0412 của hãng IGK electronics, Bulgaria.

2.3. Xử lý mẫu nọc ong

- Cân khoảng 1 mg mẫu nọc ong của hãng Sigma Aldrich, cho vào ống ly tâm 10 mL. Thêm 1,00 mL nước deion, đậy kín nắp. Lắc mạnh 30 phút. Ly tâm 3 phút với tốc độ 4000 vòng/phút. Pha loãng phần dung dịch thu được x lần bằng dung dịch TFA 0.1 %. Hệ số pha loãng x có thể lớn hay nhỏ tùy thuộc vào hàm lượng peptide trong nọc ong, x = 10 đối với melittin, x = 2-2,5 đối với phospholipaza A2 và apamin.
- tiến hành hòa tan mẫu nọc ong chiết xuất được tương tự như mẫu nọc ong của hãng Sigma Aldrich nhưng sau khi ly tâm sẽ được lọc qua phễu lọc bằng màng lọc với kích thước lỗ 20 μ m rồi pha loãng bằng dung dịch TFA 0,1 %. Hệ số pha loãng x có thể lớn hay nhỏ tùy thuộc vào hàm lượng peptide trong nọc ong, x = 2-2,5 đối với apamin và phospholipaza A2, x = 10 đối với melittin.

2.4. Điều kiện vận hành máy HPLC/UV

Tham khảo quy trình phân tích của tác giả Szokan (1994)⁷, chúng tôi đã tối ưu hoá các thông số trên nền mẫu nọc ong của hãng Sigma Aldrich với điều kiện vận hành thiết bị HPLC/UV như sau:

- Pha tĩnh: cột sắc ký Phenomenex 110 (150 mm $\times$ 2.00 mm $\times$ 5.0 μ m)
- Nhiệt độ lò cột: 40 °C
- Áp suất cột: 67 bar
- Tốc độ dòng: 0,5 ml phút⁻¹
- Bước sóng hấp thụ của đầu dò UV: 220 nm
- Thể tích tiêm mẫu: 20 μ L
- Pha động: dung dịch A [TFA 0,2 % và TEA 0.16 %] và dung dịch B [TFA 0,1 % trong acetonitril : nước deion (8:2)] với chương trình gradient như sau: 100 % A

trong 30 phút, 80 % A trong 40 phút tiếp theo, 20 % A trong 10 phút tiếp theo, cuối cùng 100 % B.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Đường chuẩn

Vì thành phần của các hợp chất trong nọc ong có sự khác biệt lớn nên đường chuẩn của mỗi chất có khoảng nồng độ khảo sát khác nhau và thu được kết quả trong bảng 1.

Bảng 1. Đường chuẩn của các chất phân tích

Chất phân tích	Khoảng nồng độ (µg/mL)	Phương trình hồi quy*	Hệ số tương quan (R ²)	Thời gian lưu (phút)
Apamin	5-110	y = 21.683x - 7.1088	0.9999	24.6
Phospholipaza A2	10-125	y = 22.1227x + 0.0703	1.0000	45.7
Melittin	10-250	y = 27.186x - 201.67	0.9962	54.9

* y là diện tích và x là nồng độ của chất phân tích (µg/mL)

3.2. Độ đúng và độ lặp lại của phương pháp

các nồng độ khác nhau, mỗi nồng độ được thực hiện 3 lần, sau đó tiến hành xử lý mẫu và xác định tương tự như quy trình trên.

3.2.1. Độ đúng

Kết quả thu được trong bảng 2.

Mẫu trắng (nước deion) được thêm chuẩn apamin, phospholipaza A2 và melittin với

Bảng 2. Kết quả khảo sát độ đúng của phương pháp

Apamin			Phospholipaza A2			Melittin		
C _{thêm} (µg/mL)	C _{xđịnh} (µg/mL)	Hiệu suất (%)	C _{thêm} (µg/mL)	C _{xđịnh} (µg/mL)	Hiệu suất (%)	C _{thêm} (µg/mL)	C _{xđịnh} (µg/mL)	Hiệu suất (%)
15,00	14,90	14.90	35,00	35,01	100.02	45,00	44,15	98.11
15,00	15,13	15.13	35,00	34,82	99.47	45,00	45,20	100.44
15,00	14,92	14.92	35,00	34,35	98.15	45,00	44,15	98.11
20,00	20,11	20.11	40,00	40,07	100.18	50,00	49,39	98.79
20,00	20,39	20.39	40,00	40,01	100.03	50,00	49,62	99.25
20,00	20,11	20.11	40,00	39,55	98.89	50,00	49,36	98.73
25,00	25,23	25.23	45,00	44,99	99.97	55,00	54,30	98.73
25,00	25,23	25.23	45,00	44,17	98.15	55,00	56,14	102.08
25,00	24,40	24.40	45,00	45,16	100.37	55,00	53,19	96.71
RSD (%)		1,28			0.087			1.54
HS _{tb} (%)	100.25 ± 0.81			99.47 ± 0.54			98.99 ± 0.95	

3.2.2. Độ lặp lại

Tiến hành thí nghiệm độ lặp lại trên 6 mẫu thử có cùng nồng độ tương ứng với mỗi chất phân tích và kết quả thu được trong bảng 3.

Bảng 3. Kết quả khảo sát độ lặp lại của phương pháp

Số thí nghiệm	Apamin		Phospholipaza A2		Melittin	
	C _m	C _A	C _m	C _P	C _m	C _M
1	400	9.289	100	19.700	100	56.601
2	400	9.316	100	19.804	100	56.737
3	400	9.326	100	19.610	100	56.649
4	400	9.340	100	19.592	100	56.608
5	400	9.353	100	19.650	100	56.619
6	400	9.326	100	19.741	100	56.634
RSD (%)		0.23		0.50		0.081
Nồng độ trung bình (µg/mL)		9.325 ± 0.018		19.68 ± 0.41		56.641 ± 0.041

C_m, và C_{A, P, M}: nồng độ mẫu nọc ong của hãng Sigma Aldrich và chất phân tích (µg/mL)

3.3. Giới hạn phát hiện và định lượng của phương pháp

Tiến hành phân tích mẫu nọc ong của hãng Sigma Aldrich với nồng độ của apamin là 2,5 µg/mL, còn phospholipaza A2 và melittin ở nồng độ 5,0 µg/mL, từ đó xác định giới hạn phát hiện (LOD) và giới hạn định lượng LOQ của phương pháp cho mỗi chất phân tích, kết quả thu được trong bảng

4. Giá trị LOD được tính theo công thức:

$LOD = 3 \times \frac{C}{S/N}$ và giá trị LOQ được tính

theo công thức: $LOQ = \frac{10}{3} \times LOD$, trong đó:

C là nồng độ mẫu nọc ong Sigma Aldrich (µg/mL), S là chiều cao mũi sắc ký của chất phân tích, N là chiều cao mũi sắc ký của nền được lấy 3 lần xung quanh mũi sắc ký của chất phân tích.

Bảng 4. Giá trị LOD và LOQ của phương pháp

Chất phân tích	Apamin			Phospholipaza A2			Melittin		
C (µg/mL)	2.5			5.0			5.0		
S	3.0			5.3			6.8		
N	0.46	0.50	0.58	0.9	1.0	1.2	0.97	0.98	1.0
LOD (µg/mL)	1.3			2.9			2.2		
LOQ (µg/mL)	4.3			9.7			7.2		

3.4. Xác định apamin, phospholipaza A2, melittin trong mẫu nọc ong

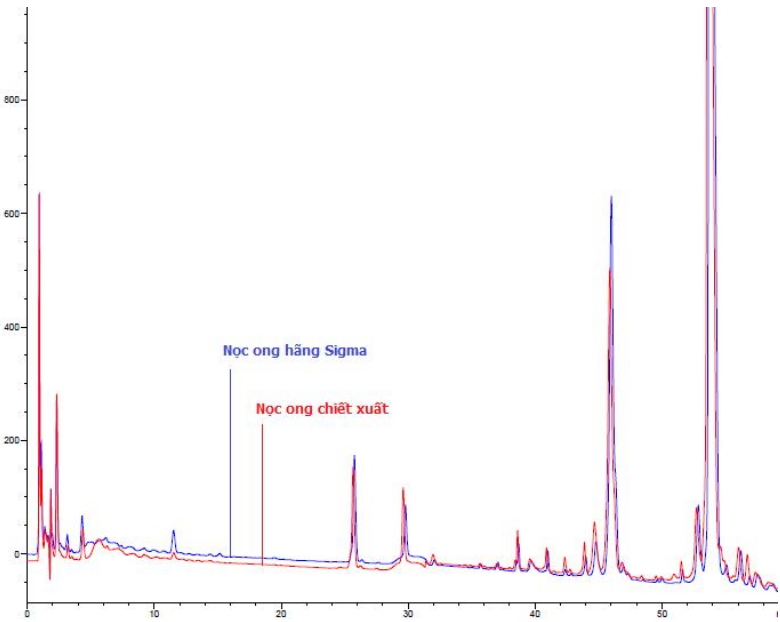
Tiến hành phân tích hàm lượng các peptide có trong mẫu nọc ong của hãng Sigma

Aldrich và mẫu nọc ong chiết xuất được trong cùng điều kiện đã tối ưu hóa, kết quả phân tích được trình bày trong bảng 5.

Bảng 5. Kết quả phân tích apamin, phospholipaza A2, melittin trong mẫu nọc ong

Peptide	Thành phần (%)	
	Nọc ong Sigma Aldrich	Nọc ong chiết xuất
Apamin	2.53 ± 0.10	2.86 ± 0.12
Phospholipaza A2	11.0281 ± 0.0037	13.2888 ± 0.0051
Melittin	52.7 ± 1.2	54.0 ± 1.3

Bên cạnh đó, từ sắc ký đồ ở hình 1 cho thấy thành phần các peptide của mẫu nọc ong chiết xuất được có kết quả tương tự với hãng Sigma Aldrich. Điều này cũng chứng minh rằng, nọc ong chiết xuất được có chất lượng giống với nọc ong của hãng Sigma Aldrich.



Hình 1. Sắc ký đồ so sánh giữa mẫu nọc ong của hãng Sigma Aldrich và mẫu nọc ong chiết xuất được

Ngoài ra, chúng tôi tiến hành tham khảo hàm lượng của 3 peptide chính của nọc ong, bao gồm apamin, phospholipaza A2 và melittin có trong các mẫu nọc ong ở các nước (Bảng 6) cho thấy hàm lượng của 3

peptide chính trong nọc ong chiết xuất được tương đương với nọc ong ở một số quốc gia như như Latvia, Hungaria, Ba Lan, Czech, Russian cùng với hãng Sigma Aldrich, và nằm trong khoảng thành phần đã được

thống kê. Như vậy, chất lượng của nọc ong chiết xuất từ ong mật *Apis mellifera* nuôi ở Việt Nam có thành phần tương tự như nọc ong ở các nước khác trên thế giới. Đây sẽ là cơ sở chính để tiến hành các nghiên cứu về dược lý và định hướng ứng dụng ở nước ta trong thời gian tới.

Bảng 6. Tổng hợp thành phần apamin, phospholipaza A2 và melittin có trong một số mẫu nọc ong

Mẫu nọc ong	Apamin (%)	Phospholipaza A2 (%)	Melittin (%)
Latvia ⁷	2,6	12,6	52,0
Tokol (Hungari) ⁷	4,3	-	45,5
Kengyel (Hungari) ⁷	4,5	13,8	61,0
Szolnok (Hungari) ⁷	3,5	12,5	57,1
Ba Lan ⁸	2,6	13,0	54,1
Czech ⁹	-	15,4	41,6
Russian ⁹	-	17,1	42,9
Tổng hợp chung ¹⁰	1 - 3	12 - 15	40 - 50
Nọc ong Sigma Aldrich	2,5	11,0	52,7
Nọc ong chiết xuất	2,9	13.3	54.0

4. KẾT LUẬN

Từ kết quả tối ưu hóa quy trình bằng phương pháp HPLC/UV trên pha tĩnh của cột sắc ký Phenomenex 110 (150 mm × 2.00 mm × 5.0 µm), nhiệt độ: 40 °C, áp suất: 67 bar, tốc độ dòng: 0.5 ml phút⁻¹ và bước sóng: 220 nm; pha động chương trình gradient với hỗn hợp dung dịch A [TFA 0,2

% và TEA 0,16 %] và dung dịch B [TFA 0,1 % trong acetonitril : nước deion (8:2)], tiến hành dựng đường chuẩn của các peptide apamin, phospholipaza A2 (PLA₂) và melittin trên điều kiện đã tối ưu hóa để xác định thành phần của nọc ong. Từ kết quả định lượng thành phần các peptide của mẫu nọc ong chiết xuất được và hãng Sigma Aldrich cho thấy chúng có hàm lượng tương tự nhau. Đây sẽ là cơ sở để tiến hành các nghiên cứu về dược lý và định hướng ứng dụng ở nước ta trong thời gian tới.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Schumacher M.J., Schmidt J.O., Egen N.B., Lethality of 'killer' bee stings, *Nature*, 337, 413-417 (1989).
- Amdam G.V., Aase A.L., Seehuus S.C., Kim Fondrk M., Norberg K., Hartfelder K., Social reversal of immunosenescence in honey bee workers, *Experimental Gerontology*, 40, 939-947 (2005).
- Chen J., Lariviere W.R., The nociceptive and anti-nociceptive effects of bee venom injection and therapy: A double-edged sword, *Progress in Neurobiology*, 92, 151-183 (2010).
- Nguyen T.T., Thuý châm chữa một số bệnh bằng sản phẩm ong, *Tạp chí Dược học*, 3, 315-320 (1970).
- Son D.J., Lee J.W., Lee Y.H., Song H.S., Lee C.K., Hong J.T., Therapeutic application of anti-arthritis, pain-releasing, and anti-cancer effects of bee venom and its constituent compounds, *Pharmacology & Therapeutics*, 115, 246-270 (2007).
- Oršolić N., Bee venom in cancer therapy, *Cancer and Metastasis Reviews*, 31, 173-94 (2012).

7. Szókán GY., Horváth J., Almás M., Saftics GY., Palócz A., Liquid chromatography analysis and separation of polypeptide components from honey bee venom, *Journal of Liquid Chromatography*, 17, 3333-3349 (1994).

8. Kokot Z.J., Matysiak J., Simultaneous determination of major constituents of honeybee venom by LC-DAD, *Chromatographia*, 69, 1401-1405 (2009).

9. Pacáková V., Štulík K., Pham T.H., Jelínek I., Vinš I., Sýkora D., Comparison of high-performance liquid chromatography and capillary electrophoresis for the

determination of some bee venom components, *Journal of Chromatography A*, 700, 187-193 (1995).

10. Ali M.A., Studies on bee venom and its medical uses, *International Journal of Advanced Science and Technology*, 1, 1-15 (2012).

NGHIÊN CỨU ĐIỀU CHẾ PHÓT PHO P-32 ĐỂ SẢN XUẤT.....(tiếp theo tr. 6)

4. KẾT LUẬN

Phương pháp điều chế dung dịch P-32 từ bìa P_2O_5 chiếu xạ trên lò phản ứng hạt nhân Đà Lạt cho hiệu suất tương đối cao: 510mCi/4,3gam P (10 gam P_2O_5); P-32 trong dung dịch ở dạng PO_4^{3-} , pH =6-8, độ sạch hóa phóng xạ $\geq 99\%$; độ sạch hạt nhân đạt 100%.

Dùng P-32 từ bìa P_2O_5 làm tấp áp để chữa u máu và sẹo lồi an toàn hơn so với chiếu xạ photpho đỏ để chế tạo tấp áp. Dùng dung dịch P-32 ở dạng Na_2HPO_4 sử dụng theo đường uống để điều trị giảm đau di căn ung thư xương hoàn toàn đáp ứng được các tiêu chí của dược điển Việt Nam.

Các dược chất phóng xạ trên đã được Bộ y tế cấp phép sử dụng.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Ellis, Bobby D.; MacDonald, Charles L. B. (2006) "Phosphorus(I) Iodide: A Versatile Metathesis Reagent for the Synthesis of Low Oxidation State Phosphorus Compounds". *Inorganic Chemistry* 45 (17), 6864.
2. Manual for reactor produced radioisotopes, IAEA-TECDOC-1340, January (2003).
3. E.Bujdosó, I. Feher, G.Kardos. Activation and decay Tables of Radioisotopes. Akademia, Kiado, Budapest (1973).
4. Dược điển Việt Nam, xuất bản lần thứ tư, Nhà xuất bản y học, Hà Nội năm (2009).
5. US Pharmacopoeia 26-NF 21; By the United States Pharmacopoeial Convention, Inc. (2003).