

Định lượng acid salvianolic B trong cao đặc giáng chỉ bằng sắc ký lỏng hiệu năng cao

Bùi Hồng Cường*, Hoàng Mạnh Tuấn
Trường Đại học Dược Hà Nội

Summary

An HPLC method was proposed for quantification of salvianolic acid B in the giang chi viscous extracts (*Extractum spisum*), which is prepared from *Radix et Rhizoma Salviae miltiorrhizae*, *Fructus Lycii*, *Radix Fallopiae multiflorae*, *Fructus Mali*, *Semen Cassiae torae* by hot aqueous extraction. The chromatography was established as: Using the C_{18} (250 x 4.6 mm; 5 μ m) column; The UV detector was set at 286 nm; The mobile phase consisted of acetonitrile - 0.1% phosphoric acid solution (22:78, v/v); Flow rate was 1.2 mL/min; The column temperature was set at 20 °C; Injection volume was 10 μ L. The method was validated for the specificity (RSD of peak area = 0.13; RSD of t_R = 0.29); linearity ranging from 28.69 – 368.95 μ g/mL ($R = 0.9999$), and accuracy (recovery: 99.64% - 101.00 %). As for practical application, the tested samples showed the content of salvianolic acid B ranging at $3.19 \pm 0.44\%$.

Keywords: Giang chi, *extractum spisum*, salvianolic acid B, Sal-B, HPLC.

Đặt vấn đề

Phương thuốc giáng chỉ gồm các vị thuốc: Đan sâm, câu kỷ tử, hà thủ ô đỏ (ché), sơn tra và thảo quyết minh có công năng ích âm, hóa ứ, hạ lipid huyết, chủ trị can thận âm hư, khí trệ, huyết ứ, lipid huyết tăng^[1, 2]. Cao đặc được bào chế từ phương thuốc này là bán thành phẩm để bào chế một số sản phẩm như thuốc cốm, viên nang... Việc nghiên cứu tiêu chuẩn hoá và xác định được hàm lượng hoạt chất trong cao đặc là cần thiết. Acid salvianolic B (Sal-B) là thành phần hoạt chất chính của đan sâm, có tác dụng chống oxy hóa^[3], ức chế kết tập tiểu cầu, chống đông máu và chống huyết khối^[4], ức chế hấp thu lipid và chống xơ vữa động mạch^[5], hạ glucose và cholesterol huyết^[6], chống viêm khớp dạng thấp^[7], bảo vệ thần kinh^[8]... Vì vậy, việc xác định hàm lượng của Sal-B có ý nghĩa quan trọng trong công tác kiểm tra chất lượng phương thuốc giáng chỉ. Một số tài liệu đã công bố phương pháp định lượng Sal-B trong dược liệu

đan sâm^[9, 10, 11] và trong chế phẩm^[12] nhưng chưa có nghiên cứu định lượng chất này trong cao đặc phương thuốc. Nghiên cứu này được thực hiện nhằm xây dựng phương pháp định lượng bằng sắc ký lỏng hiệu năng cao và xác định hàm lượng Sal-B trong cao đặc phương thuốc giáng chỉ làm căn cứ để xây dựng Tiêu chuẩn chất lượng của cao này.

Nguyên liệu và phương pháp nghiên cứu

Nguyên liệu

Các vị thuốc: Được cung cấp bởi Công ty Cổ phần Dược phẩm VCP: Đan sâm, câu kỷ tử đạt Dược điển Trung Quốc 2015^[10], hà thủ ô đỏ, sơn tra và thảo quyết minh đạt Dược điển Việt Nam V^[9].

Cao đặc phương thuốc giáng chỉ: Chế biến các vị thuốc, chiết bằng nước nóng, cô đến thể chất cao đặc (độ ẩm < 20%).

Cao đặc placebo: Chuẩn bị như cao đặc phương thuốc giáng chỉ, bỏ đan sâm.

Hoá chất, chất chuẩn

Chất chuẩn Sal-B ($C_{36}H_{30}O_{16}$): Hàm lượng 99,34% (Xinyang Zhongjian Metrology Biological Technology Co., Ltd., Lot No. 200105).

Hoá chất, dung môi: Methanol, acetonitril, acid phosphoric đạt tiêu chuẩn tinh khiết phân tích dùng cho HPLC (Hãng Merck), nước cất 2 lần.

Chịu trách nhiệm: Bùi Hồng Cường

Email: cuongbh@hup.edu.vn

Ngày nhận: 18/01/2021

Ngày phản biện: 28/01/2021

Ngày duyệt bài: 19/02/2021

Thiết bị, dụng cụ

Máy sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) (Shimadzu, Nhật Bản) bao gồm: Bơm LC-30AD, detector mảng diod (DAD) SPD-M20A, hệ thống tiêm mẫu tự động SIL-20A, bộ phận ổn nhiệt CTO-10AS của Shimadzu, cột sắc ký Shim-pack GIST C₁₈; Bể siêu âm WUC-D22H (Daihan Scientific, Hàn Quốc); Cân phân tích AND GR200 (A&D, Nhật Bản) độ chính xác 0,1 mg; Cân phân tích Mettler Toledo XPE105 (Mettler Toledo, Thụy Sĩ) độ chính xác 0,01 mg; Hệ thống lọc chân không, màng lọc 0,45 µm x 47 mm Supelco (Mỹ), màng lọc syringe 0,45 µm Shimadzu (Shimadzu, Nhật Bản), lọ đựng mẫu (vial) 1,5 mL Shimadzu (Shimadzu, Nhật Bản); Tủ sấy Memmert (Mettmert, Đức); Máy đo độ ẩm Precisa XM60 (Precisa, Thụy Sĩ); Các dụng cụ thủy tinh: Bình gạn, bình nón, bình định mức, cốc thủy tinh,... và các dụng cụ khác tại phòng thí nghiệm đạt yêu cầu chính xác dùng trong phân tích.

Phương pháp nghiên cứu

Chuẩn bị mẫu

Dung dịch chuẩn: Cân chính xác 6,19 mg chất chuẩn Sal-B (hàm lượng 99,34%) cho vào bình định mức 10 mL, thêm 5 mL methanol 50%, lắc cho tan hết và thêm vừa đủ đến vạch bằng methanol 50% thu được dung dịch chuẩn gốc có nồng độ 614,92 µg/mL. Từ dung dịch chuẩn gốc này pha dãy chuẩn có nồng độ trong khoảng: 28,69-368,95 µg/mL.

Dung dịch thử: Cân chính xác khoảng 0,1000 g cao vào bình nón có nút mài 50 mL, thêm chính xác 25 mL methanol 50%, cân, siêu âm trong 30 phút. Để nguội. Cân lại, bổ sung khối lượng mất đi bằng methanol 50%. Lắc đều, ly tâm 5000 vòng/phút trong 5 phút. Lọc qua màng lọc syringe 0,45 µm thu được dung dịch tiêm sắc ký.

Điều kiện sắc ký

Tham khảo một số tài liệu [9, 10, 11], chúng tôi đã khảo sát và lựa chọn điều kiện sắc ký như sau:

- Pha tĩnh: Cột sắc ký C₁₈ (250x4,6 mm, 5 µm).
- Pha động: Acetonitril và acid phosphoric

0,1% (22:78).

- Tốc độ dòng: 1,2 mL/phút.
- Nhiệt độ cột: 20 °C.
- Thể tích tiêm mẫu: 10 µL.
- Bước sóng phát hiện: 286 nm.

Tiêm riêng biệt 10 µL các dung dịch chuẩn vào máy sắc ký, ghi nhận sắc ký đồ, diện tích của pic Sal-B. Xây dựng đường hồi quy tuyến tính biểu diễn sự phụ thuộc giữa diện tích pic và nồng độ dung dịch chuẩn (µg/mL) theo phương trình $y = ax + b$.

Tiêm 10 µl dung dịch thử, ghi nhận sắc ký đồ, diện tích của pic Sal-B. Nồng độ Sal-B trong dung dịch thử (µg/mL) được tính theo công thức:

$$C_t = \frac{S_t - b}{a}$$

Hàm lượng Sal-B trong cao khô tuyệt đối được tính theo công thức:

$$X(\%) = C_t \times \frac{25}{100 \times m_{cd} \times (100 - H)}$$

Trong đó:

S_t : Diện tích pic Sal-B trên sắc ký đồ của dung dịch thử.

C_t : Nồng độ của Sal-B trong dung dịch thử (µg/mL).

a : Giá trị hệ số góc của đường hồi quy tuyến tính.

b : Giá trị hệ số chặn của đường hồi quy tuyến tính.

m_{cd} : Khối lượng cao đặc (g).

H : Hàm ẩm của cao đặc (%).

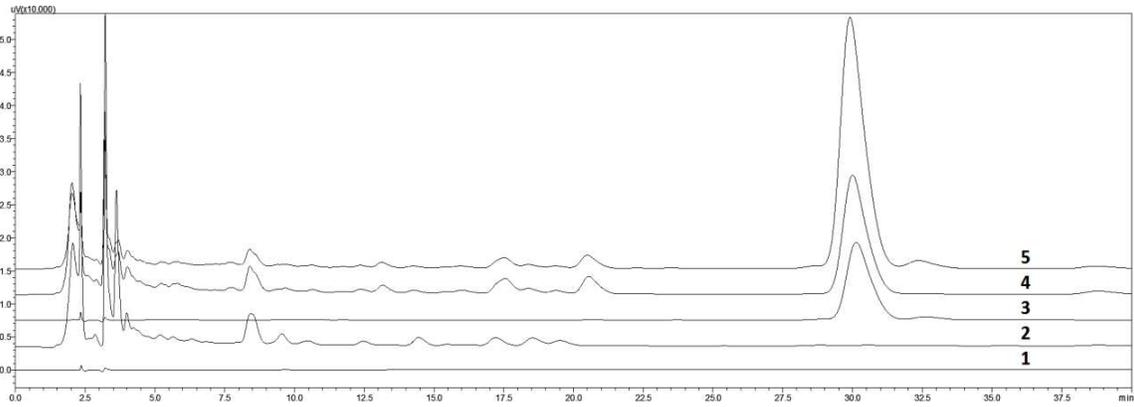
Thẩm định quy trình định lượng

Quy trình định lượng được thẩm định theo hướng dẫn của AOAC [13] và ICH [14] bao gồm tính đặc hiệu, tính tương thích hệ thống, khoảng tuyến tính, độ chính xác (độ lặp lại, độ chính xác trung gian), độ đúng.

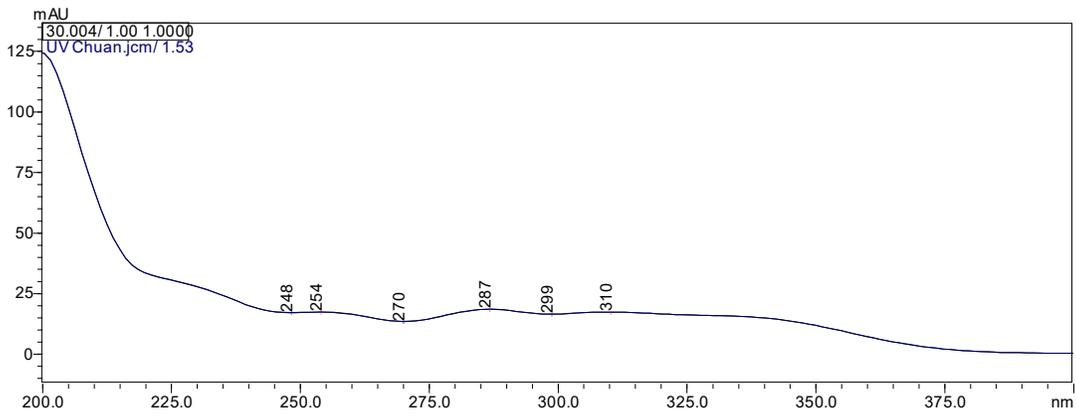
Kết quả và bàn luận

Tính đặc hiệu của phương pháp

Tiến hành phân tích mẫu dung môi, mẫu placebo, dung dịch chuẩn Sal-B, dung dịch mẫu thử và dung dịch thử thêm chuẩn với các điều kiện sắc ký và xử lý mẫu như trên. Kết quả được trình bày ở hình 1 và hình 2.



Hình 1. Sắc ký đồ các mẫu nghiên cứu
 1: Dung môi; 2: Placebo; 3: Chất chuẩn Sal-B, 4: Mẫu thử, 5: Mẫu thử thêm chuẩn



Hình 2. Phổ của mẫu thử và mẫu chuẩn Sal-B

Nhận xét: Trên sắc ký đồ của dung dịch mẫu thử và mẫu thử thêm chuẩn cho pic có thời gian lưu tương ứng với thời gian lưu của pic trên sắc ký đồ dung dịch chuẩn Sal-B. Các pic trên sắc ký đồ của mẫu thử và mẫu thử thêm chuẩn tách nhau hoàn toàn, Sal-B được phát hiện ở thời gian lưu khoảng 30 phút, tách hoàn toàn khỏi các pic khác, pic cân đối, độ rộng chân pic nhỏ. Trong khi đó, trên sắc ký đồ của mẫu dung môi và mẫu placebo không xuất hiện pic có thời gian lưu tương ứng với thời gian lưu của pic trên sắc ký đồ dung dịch chuẩn Sal-B. Mặt khác, phổ của pic mẫu thử và mẫu chuẩn cho kết quả hệ số chồng phổ đạt 1,0000 (> 0,99). Do đó phương pháp đảm bảo độ chọn lọc, đặc hiệu.

Tính tương thích của hệ thống

Tiến hành lặp lại 6 lần dung dịch chuẩn Sal-B nồng độ 79,69 µg/mL, ghi lại các giá trị về thời gian lưu, diện tích pic. Độ lặp lại của hệ thống được biểu thị bằng độ lệch chuẩn tương đối RSD (bảng 1)

Bảng 1. Kết quả độ thích hợp hệ thống

TT	Thời gian lưu (phút)	Diện tích pic (mAU.s)	Số đĩa lý thuyết
1	30,383	695541	5828
2	30,285	697540	5709
3	30,241	696091	5567
4	30,219	696096	5573
5	30,180	695352	5634
6	30,131	695000	5588
TB	30,240	695937	5650
RSD (%)	0,29	0,13	1,81

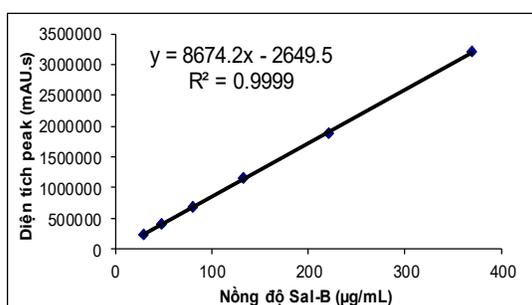
Nhận xét: Kết quả cho thấy độ lệch chuẩn tương đối của diện tích pic (0,13%) và thời gian lưu (0,29%) của Sal-B đều nhỏ hơn 2,7%, số đĩa lý thuyết trung bình 5650 (> 5000) với độ lệch chuẩn tương đối 1,81%. Như vậy, các điều kiện sắc ký đã lựa chọn có độ lặp lại tốt về thời gian lưu và diện tích pic của Sal-B và hệ thống **HPLC** sử dụng là phù hợp và đảm bảo độ ổn định của phép phân tích định lượng Sal-B.

Xác định khoảng tuyến tính giữa nồng độ và diện tích pic

Từ dung dịch chuẩn gốc có nồng độ 614,92 µg/mL, pha một dãy các dung dịch chuẩn Sal-B có nồng độ từ 28,69 – 368,95 µg/mL. Chạy sắc ký với điều kiện pha động như trên, xác định sự phụ thuộc tuyến tính giữa y (diện tích pic) và x (nồng độ). Kết quả độ tuyến tính được trình bày ở bảng 2 và hình 3.

Bảng 2. Kết quả khảo sát khoảng tuyến tính định lượng Sal-B

Nồng độ (µg/mL)	28,69	47,81	79,69	132,82	221,37	368,95
Diện tích pic (mAU.s)	234236	412677	696430	1157487	1894678	3206984
Hệ số a	8674,2					
Hệ số b	2649,5					
Hệ số tương quan (R)	0,9999					



Hình 3. Đồ thị biểu diễn mối tương quan giữa nồng độ và diện tích pic của Sal-B

Nhận xét: Trong khoảng nồng độ khảo sát từ 28,69 µg/mL đến 368,95 µg/mL có sự phụ thuộc tuyến tính giữa diện tích pic và nồng độ Sal-B với hệ số tương quan R = 0,9999 cho thấy đường chuẩn được xây dựng có độ tuyến tính cao đảm bảo để thực hiện phép phân tích định lượng Sal-B.

Khảo sát độ chính xác của phương pháp

Phân tích mẫu thử, so sánh kết quả 6 lần phân tích đánh giá độ lặp lại trong ngày và khác ngày (độ chính xác trung gian). Kết quả được trình bày ở bảng 3.

Bảng 3. Độ lặp lại và độ chính xác trung gian

Ngày 1			Ngày 2		
Khối lượng cao (g)	Diện tích pic (mAU.s)	Hàm lượng (%)	Khối lượng cao (g)	Diện tích pic (mAU.s)	Hàm lượng (%)
0,1204	1169012	3,43	0,1220	1213190	3,51
0,1210	1208203	3,52	0,1239	1229018	3,50
0,1185	1171207	3,49	0,1291	1307545	3,57
0,1112	1060263	3,36	0,1204	1195918	3,50
0,1221	1233878	3,56	0,1202	1204582	3,54
0,1185	1164692	3,47	0,1266	1253034	3,49
Trung bình (n = 6)		3,47	Trung bình (n = 6)		3,52
RSD (%)		2,02	RSD (%)		0,87
Hàm lượng Sal-B trung bình từ 12 lần định lượng của 2 ngày = 3,50; RSD = 1,63					

Nhận xét: Giá trị RSD của mỗi ngày định lượng và của cả 2 ngày đều < 2,7%. Sử dụng phân tích Anova cho thấy kết quả định lượng giữa 2 ngày khác nhau không có ý nghĩa thống kê ($P\text{-value} = 0,17 > 0,05$). Như vậy, phương pháp có độ lặp lại cao, ổn định, đạt yêu cầu về độ lặp lại và độ chính xác trung gian.

Khảo sát độ đúng của phương pháp

Mẫu placebo thêm chuẩn: Cân chính xác khoảng 0,1000 g cao placebo vào bình nón nút mài dung tích 50 mL. Pha dung dịch chuẩn Sal-B

có nồng độ khoảng 1500 µg/mL trong methanol 50%, thêm chuẩn ở 3 mức khoảng 50%, 100% và 150% so với hàm lượng của Sal-B trong mẫu cao bằng cách thêm chính xác tương ứng 1 mL, 2 mL và 3 mL vào mẫu placebo.

Tiến hành xử lý mẫu như đối với mẫu thử. Định lượng mẫu placebo thêm chuẩn bằng **HPLC**, mỗi mức thêm chuẩn được làm lặp lại 3 lần và lấy kết quả trung bình. Kết quả độ đúng được trình bày ở bảng 4.

Bảng 4. Kết quả độ đúng của phương pháp

TT	Mức thêm chuẩn	Lượng hoạt chất thêm vào (µg)	Lượng hoạt chất thêm tìm lại (µg)	Tỷ lệ thu hồi (%)	Trung bình (%)	RSD (%)
1		1825	1841	100,86		
2	50%	1825	1860	101,89	101,00	0,82
3		1825	1829	100,25		
4		3650	3641	99,77		
5	100%	3650	3643	99,82	99,64	0,27
6		3650	3626	99,33		
7		5475	5486	100,21		
8	150%	5475	5493	100,32	100,28	0,06
9		5475	5491	100,30		

Nhận xét: Tỷ lệ thu hồi ở mỗi mức nồng độ đều nằm trong khoảng 97-103% với độ lệch chuẩn tương đối ở mỗi mức đều < 2,7% chứng tỏ phương pháp **HPLC** đã chọn đảm bảo độ đúng để định lượng Sal-B. Tỷ lệ thu hồi thấp nhất là 99,33%, cao nhất 101,89%.

Định lượng Sal-B trong các mẫu cao đặc

Chuẩn bị dung dịch mẫu thử và tiến hành sắc ký trong điều kiện như đã mô tả trên 42 mẫu cao. Kết quả hàm lượng Sal-B trong cao đặc giáng chỉ là $3,19 \pm 0,44\%$.

Kết luận

Phương pháp định lượng Sal-B trong cao đặc giáng chỉ bằng **HPLC** đã được xây dựng: Cột phân tích C₁₈ (250 x 4,6 mm, 5 µm), tốc độ dòng: 1,2 mL/phút, nhiệt độ cột: 20 °C, pha động acetonitril: acid phosphoric 0,1% (22:78). Phương pháp phân tích có độ nhạy cao, có tính đặc hiệu, khoảng tuyến tính từ 28,69 đến

368,95 µg/mL ($r = 0,9999$), độ lặp lại và độ chính xác trung gian tốt (RSD < 2,7%), độ đúng cao (tỷ lệ phục hồi 99,64 – 101,00%, RSD < 2,7%). Hàm lượng Sal-B trong cao đặc giáng chỉ là $3,19 \pm 0,44\%$.

Tài liệu tham khảo

1. Võ Văn Bình, Nguyễn Tuấn Khoa, Phạm Đình Sửu (dịch từ bản tiếng Trung) (1989), "Thiên gia diệu phương", Viện Thông tin Thư viện Y học cổ truyền Trung ương, Hà Nội, tr. 59.
2. Hoàng Duy Tân, Trần Văn Nhủ (1995), *Tuyển tập phương thang Đông y*, NXB. Đồng Nai, Đồng Nai, tr. 438.
3. Zhao G. R. et al. (2008), "Characterization of the radical scavenging and antioxidant activities of danshensu and salvianolic acid B", *Food and Chemical Toxicology*, 46 (1), pp. 73–81.

4. Neves M. et al. (2019), "Two birds one stone: Salvianolic acid B inhibits coagulation and platelet aggregation", *Circulation*, 140 (1), A17159.
5. Bao Y. et al. (2012), "Salvianolic acid B inhibits macrophage uptake of modified low density lipoprotein (mLDL) in a scavenger receptor CD36-dependent manner", *Atherosclerosis*, 223 (1), pp. 152–159.
6. Huang M. Q. et al. (2015), "Biological activities of salvianolic acid B from *Salvia miltiorrhiza* on type 2 diabetes induced by high-fat diet and streptozotocin", *Pharm. Biol.*, 53 (7), pp. 1058-1065.
7. Xia Z. B. et al. (2018), "Salvianolic acid B suppresses inflammatory mediator levels by downregulating NF- κ B in a rat model of rheumatoid arthritis", *Med. Sci. Monit.*, 24, pp. 2524–2532.
8. Wang S. X. et al. (2010), "Anti-inflammatory activity of salvianolic acid B in microglia contributes to its neuroprotective effect", *Neurochem. Res.*, 35 (7), pp. 1029-1037.
9. Bộ Y tế (2017), *Dược điển Việt Nam V*, NXB. Y học, Hà Nội.
10. Chinese Pharmacopoeia Commission (2015), "Pharmacopoeia of the people's republic of China", Vol. I, China Medical Science Press.
11. Cheng H. T. et al. (2012), "Simultaneous quantification of selected compounds from *Salvia* herbs by HPLC method and their application", *Food Chemistry*, 130 (4), pp. 1031-1035.
12. Lu Y. L. et al. (2010), "Simultaneous determination of six components in the 'Jiang-Zhi' granule by UPLC-MS analysis", *Chinese Journal of Natural Medicines*, 8 (6), pp. 449-455.
13. AOAC (2016), *Appendix F: Guidelines for standard method performance requirements*, AOAC International, Rockville, MD, USA.
14. ICH (2005), ICH harmonised tripartite guideline. Validation of analytical procedures: Text and methodology Q2(R1), International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use.