

XÂY DỰNG QUY TRÌNH ĐỊNH LƯỢNG AMYGDALIN TRONG CAO HUYẾT PHỦ TRỰC Ứ BẰNG PHƯƠNG PHÁP HPLC - PDA

Trần Khánh Duy*, Hoàng Viêt Nhâm, Võ Thị Bạch Huệ
Khoa Dược, Trường Đại học Lạc Hồng

SUMMARY

Huyet phu truc u (HPTU) is a famous remedy of Chinese traditional medicine used for the treatment of cardiovascular diseases such as thrombosis, angina pectoris, myocardial infarction. To meet treatment needs nowadays, an extract was manufactured from 11 medicinal plants as in HPTU remedy. Amygdalin, a primarily chemical component included in HPTU remedy could significantly decrease plasma viscosity, prolong the activation time of thromboplastin and reduce fibrinogen content, which prevents the condition of blood coagulation increase. Amygdalin is also an ingredient chosen as a marker to control the quality of dosage forms from HPTU remedy. The research was conducted to establish an HPLC method for determination of amygdalin in HPTU extract. The method was optimized as follows: Column - Phenomenex C18 (250 × 4.6 mm; 5 μm), temperature - 25 °C; Mobile phase - a mixture of methanol and water (21.5:78.5), in isocratic mode; Flow rate - 1,0 mL/minute; Injection volume - 20 μL; Detector - photodiode array (210 nm). The method was validated for the suitability of the system, specificity, linearity, repeatability, intermediate precision, accuracy (recovery rate = 98.1 – 101.1%) and quantification range (9.6 – 38.4 μg/mL). The procedure stretches 40 minutes for a run.

Keywords: Amygdalin, traditional medicine, determination, HPLC.

ĐẶT VẤN ĐỀ

Huyết phủ trực ứ (HPTU) là bài thuốc nổi tiếng của nền y học cổ truyền Trung Hoa, được sử dụng trong điều trị các bệnh lý về Tim mạch như huyết khối, đau thắt ngực, nhồi máu cơ tim, đột quỵ... Bài thuốc bao gồm 11 dược liệu: Đào nhân, Hồng hoa, Đương quy,

Xuyên khung, Xích thược, Sài hồ, Sinh địa, Chỉ xác, Cát cánh, Ngưu tất, Cầm thảo, trong đó Đào nhân và Hồng hoa là hai vị quân^[1]. Amygdalin, thành phần chính có trong Đào nhân với hàm lượng tương đối cao, đã được chứng minh có nhiều tác dụng dược lý như: làm giảm độ nhớt của huyết tương, kéo dài thời gian hoạt hóa thromboplastin và giảm lượng fibrinogen giúp khắc phục tình trạng tăng đông máu. Ngoài ra, amygdalin còn có tác dụng bảo vệ tế bào nội mạch và ức chế quá trình kết tập tiểu cầu^[2,3]. Đây cũng là thành phần được chọn làm chất đánh dấu để kiểm

Chịu trách nhiệm: Trần Khánh Duy

Email: duytran@lhu.edu.vn

Ngày nhận: 12/5/2025

Ngày phản biện: 16/5/2025

Ngày duyệt bài: 30/5/2025

tra chất lượng của các chế phẩm từ bài thuốc HPTU [4]. Để đáp ứng nhu cầu điều trị hiện nay, chế phẩm cao HPTU đã được bào chế với thành phần gồm 11 dược liệu như bài thuốc HPTU. Bên cạnh việc bào chế thì công tác kiểm tra đánh giá chất lượng thuốc cũng là một yêu cầu cấp bách. Đề tài “Xây dựng quy trình định lượng amygdalin trong cao Huyết phủ trực ứ bằng phương pháp HPLC - PDA” được tiến hành với mong muốn thiết lập một quy trình dùng để định lượng amygdalin trong cao HPTU đạt các yêu cầu về thẩm định quy trình phân tích theo hướng dẫn của ICH 2005 và Asean 2008 góp phần vào công tác kiểm tra đánh giá chất lượng của chế phẩm này.

NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Đối tượng nghiên cứu: Cao Huyết phủ trực ứ được sản xuất vào tháng 01 năm 2018.

Chất đối chiếu: Amygdalin (Sigma - Aldrich), hàm lượng 98,10%.

Trang thiết bị: Hệ thống HPLC Agilent 1260 kết nối đầu dò PDA, cột sắc ký pha đảo Phenomenex C18 (250 x 4,6 mm; 5 µm), cân phân tích Sartorius Practum 224-1S (độ nhạy 0,1 mg), bể siêu âm Elma, các dụng cụ thủy tinh chính xác dùng cho phân tích.

Dung môi - hóa chất: Methanol (Merck), nước cất 2 lần dùng cho HPLC.

Phương pháp nghiên cứu

Khảo sát các điều kiện sắc ký để tách được pic amygdalin trong mẫu thử cao HPTU

- Khảo sát các điều kiện bao gồm: Cột sắc ký, nhiệt độ cột; tốc độ dòng; thể tích tiêm mẫu; bước sóng phát hiện; pha động.

- Trên sắc ký đồ mẫu thử kiểm tra sự hiện diện của pic amygdalin bằng cách so sánh thời gian lưu và phổ UV của pic tương ứng với pic amygdalin trên sắc ký đồ mẫu đối chiếu, lựa chọn điều kiện sắc ký tách được pic amygdalin trong mẫu thử đạt yêu cầu về các thông số như hệ số đối xứng, độ phân

giải, độ tinh khiết pic.

Thẩm định quy trình định lượng amygdalin trong cao HPTU

Quy trình được thẩm định các yếu tố: Tính phù hợp hệ thống, tính đặc hiệu, tính tuyến tính, độ lặp lại, độ chính xác trung gian, độ đúng và khoảng xác định [5-7].

KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN

Kết quả khảo sát điều kiện sắc ký

Điều kiện sắc ký được chọn như sau: Cột sắc ký pha đảo Phenomenex C18 (250 x 4,6 mm; 5 µm), nhiệt độ cột 25 °C; pha động: methanol - H₂O (21,5:78,5) rửa giải đẳng dòng; tốc độ dòng 1 mL/phút; thể tích tiêm mẫu 20 µL; bước sóng phát hiện 210 nm.

Dung dịch đối chiếu: Hòa tan một lượng amygdalin đối chiếu trong pha động để được dung dịch có nồng độ chính xác khoảng 24 µg/mL, lọc qua màng lọc 0,45 µm.

Dung dịch mẫu thử: Cân chính xác khoảng 300,0 mg cao HPTU, cho vào bình định mức 50 ml, thêm khoảng 30 ml methanol, siêu âm 30 phút, để nguội, thêm methanol đến vạch, lắc đều. Lọc qua giấy lọc, hút chính xác 10 ml dịch lọc cho vào bình định mức 25 ml, thêm pha động đến vạch, lắc đều, lọc qua màng lọc 0,45 µm.

Hàm lượng (%) amygdalin trong cao HPTU được tính theo công thức:

$$C (\%) = \frac{S_T \times m_C \times C_C \times D_T \times 100\%}{S_C \times D_C \times m_T}$$

Trong đó:

S_T, S_C : Lần lượt là diện tích pic amygdalin của mẫu thử và mẫu đối chiếu.

m_C : Khối lượng amygdalin đối chiếu (mg).

C_C : Hàm lượng của amygdalin đối chiếu (% , tính trên nguyên trạng).

D_T, D_C : Lần lượt là độ pha loãng của mẫu thử và mẫu đối chiếu.

m_T : Khối lượng cao HPTU đã cân để định lượng (mg).

Kết quả khảo sát tính phù hợp hệ thống

Tiêm 6 lần liên tiếp mẫu đối chiếu theo điều kiện sắc ký đã chọn. Ghi nhận thời gian lưu, diện tích pic, hệ số đối xứng, số đĩa lý thuyết, tính giá trị trung bình, giá trị RSD. Kết quả:

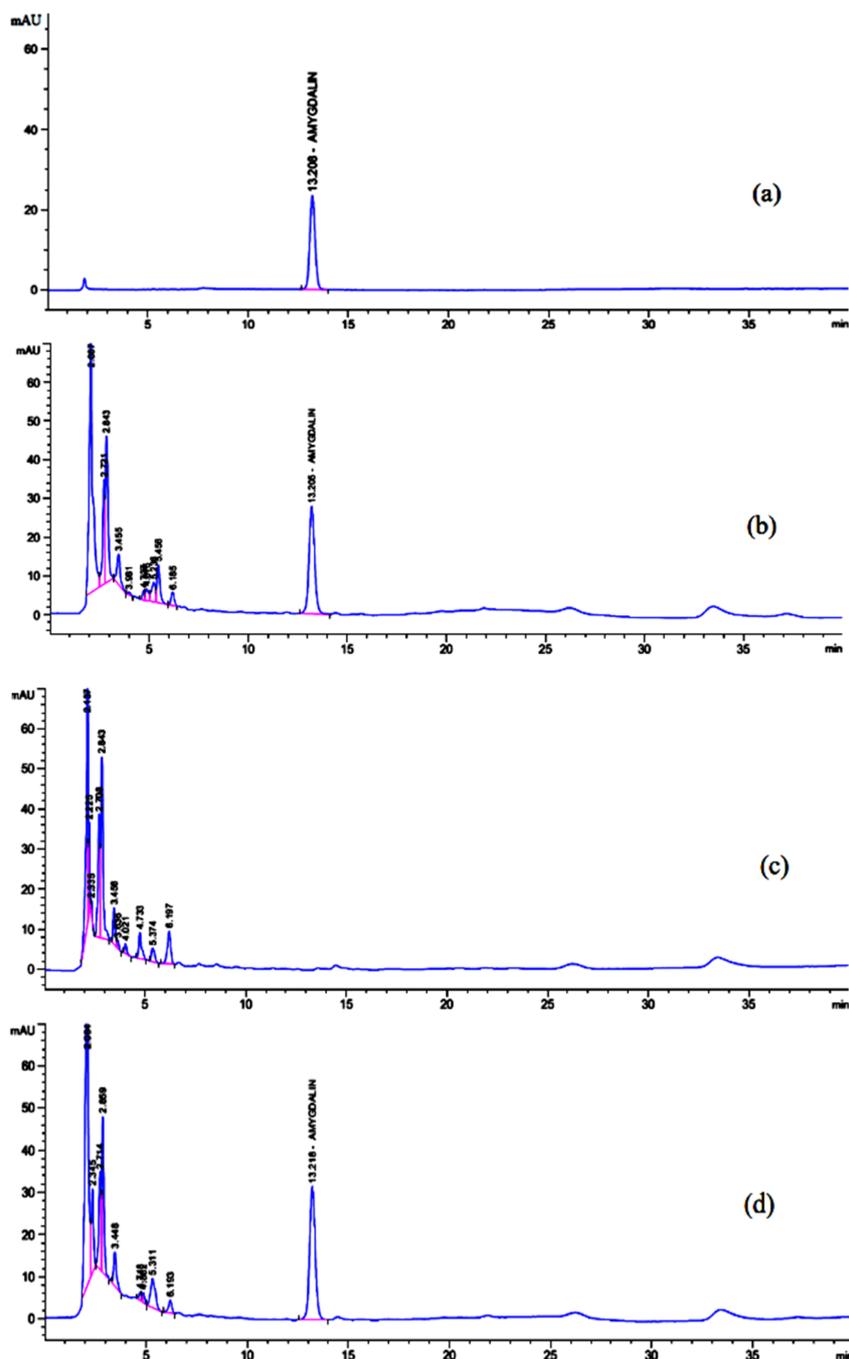
- RSD của thời gian lưu: 0,2%, RSD của

diện tích pic: 0,2%.

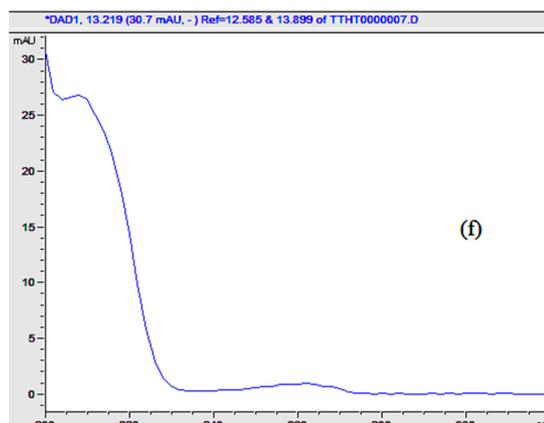
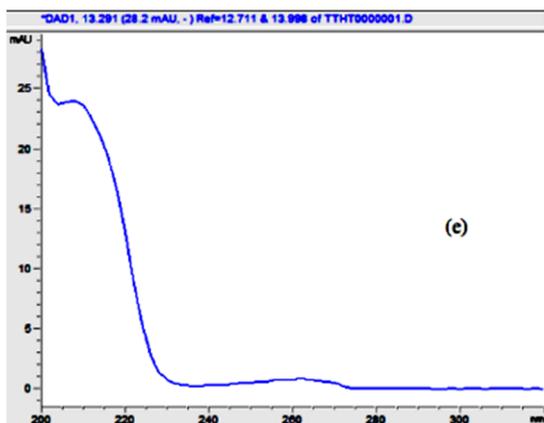
- Hệ số đối xứng của pic amygdalin: 0,92.

- Số đĩa lý thuyết: 12323.

Quy trình đạt yêu cầu về tính phù hợp của hệ thống.

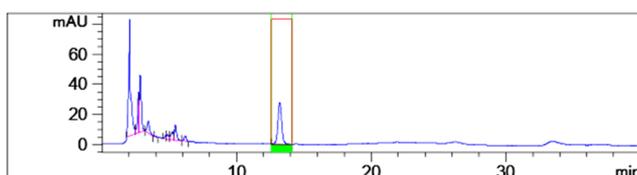


Hình 1. Sắc ký đồ mẫu amygdalin đối chiếu (a), mẫu thử (b), mẫu placebo (c) và mẫu thử thêm đối chiếu (d).

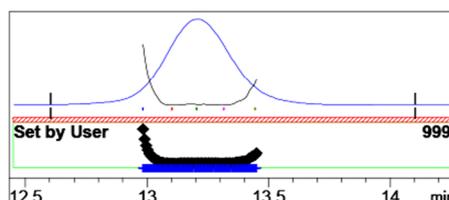
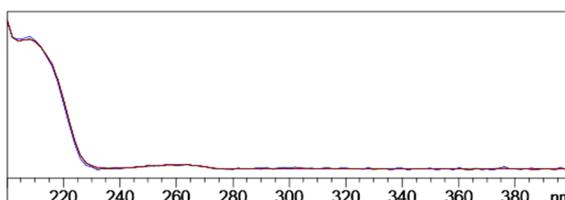


Hình 2. Phổ UV của amygdalin (e) và của pic trên sắc ký đồ mẫu thử (f)

Purity results peak 11 at 13.205 min. name :



Data : TTHT0000001.D
Signal : DAD1 A
Peak : 11 at 13.205 min
Date : 26-Jan-18, 06:23:08



-> The purity factor is within the threshold limit. <-

Purity factor : 999.920 (71 of 71 spectra are within the threshold limit.)
Threshold : 999.000 (Set by user)
Reference : Peak start and end spectra (integrated) (12.603 / 14.103)
Spectra : 5 (Selection automatic, 5)

Hình 3. Độ tinh khiết của pic amygdalin trên sắc ký đồ mẫu thử

Tính đặc hiệu

- Sắc ký đồ mẫu thử cho pic có thời gian lưu và phổ UV tương ứng với pic amygdalin trên sắc ký đồ mẫu đối chiếu (Hình 1 và 2).
 - Sắc ký đồ mẫu placebo không xuất hiện pic tại thời gian lưu của amygdalin (Hình 1c).
 - Sắc ký đồ mẫu thử thêm đối chiếu cho pic amygdalin có diện tích pic tăng lên so với trước khi thêm đối chiếu (Hình 1d).
 - Độ tinh khiết của pic amygdalin là 999,920 > 999,000 (Hình 3).
- Quy trình đạt yêu cầu về tính đặc hiệu.

Tính tuyến tính

Dung dịch đối chiếu gốc: Cân chính xác 60,0 mg amygdalin đối chiếu cho vào bình định mức 100 ml, hòa tan bằng pha động để được dung dịch có nồng độ amygdalin chính xác khoảng 600 µg/ml (lượng amygdalin đối chiếu thực tế đã cân là 61,2 mg).

Từ dung dịch đối chiếu gốc, pha 7 dung dịch đối chiếu với nồng độ từ 2,4 - 48,0 µg/ml (tương đương 10 - 200% nồng độ định lượng) theo mô tả trong bảng 1. Tiến hành sắc ký theo điều kiện đã mô tả, ghi nhận diện tích pic amygdalin.

Bảng 1. Diện tích pic của các dung dịch chuẩn

Nồng độ (µg/ml)	Diện tích pic (mAu.s)
2,4	42,10751
9,6	172,29639
16,8	299,43295
24,0	430,44778
31,2	561,75134
38,4	690,97693
48,0	867,44128

Sử dụng chức năng phân tích hồi quy "Regression" trong MS - Excel 2013 với trắc nghiệm F để kiểm tra tính thích hợp của phương trình hồi quy $y = ax + b$ và trắc nghiệm t để kiểm tra ý nghĩa của các hệ số a, b cho kết quả:

Significance F = $9,21 \times 10^{-13} < \alpha = 0,05$: Phương trình hồi quy tương thích.

P-value (b) = $0,078 > \alpha = 0,05$: Hệ số b không có ý nghĩa thống kê.

Độ chính xác trung gian

Bảng 2. Kết quả khảo sát độ chính xác trung gian

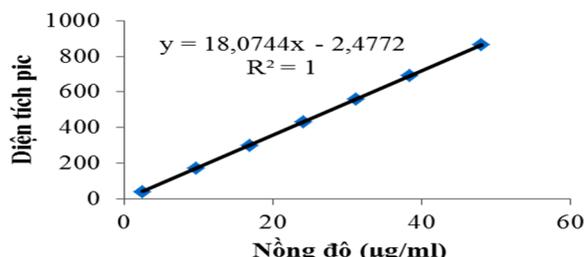
Kiểm nghiệm viên 1 Trần Khánh Duy Ngày phân tích 26-01-2018 Hệ thống HPLC Agilent 1260			Kiểm nghiệm viên 2 Võ Thị Bạch Huệ Ngày phân tích 04-02-2018 Hệ thống HPLC Agilent 1260		
Cao HPTU (mg)	Diện tích pic (mAU.s)	Hàm lượng Amygdalin (%)	Cao HPTU (mg)	Diện tích pic (mAU.s)	Hàm lượng Amygdalin (%)
300,5	527,15961	1,22	300,2	524,50543	1,23
299,4	531,86029	1,24	299,8	532,70233	1,25
300,0	531,35516	1,23	300,6	531,96716	1,24
299,6	529,57056	1,23	299,6	527,72162	1,24
300,1	527,98724	1,22	299,4	526,76117	1,23
300,2	529,46576	1,23	300,3	524,13000	1,22
Trung bình		1,23	Trung bình		1,23
RSD		0,5%	RSD		0,7%

Hàm lượng amygdalin trung bình trong cao HPTU từ 12 lần định lượng của cả 2 kiểm nghiệm viên là 1,23%; RSD = 0,6%.

Giá trị RSD kết quả định lượng của mỗi kiểm nghiệm viên và của cả hai kiểm nghiệm viên đều nhỏ hơn 2,0%. Sử dụng phân tích Anova cho thấy kết quả định lượng giữa 2 kiểm nghiệm viên khác nhau không có ý nghĩa thống kê ($P\text{-value} = 0,22 > 0,05$).

P-value (a) = $9,21 \times 10^{-13} < \alpha = 0,05$: Hệ số a có ý nghĩa thống kê.

Phương trình hồi quy $\hat{y} = 18,0744x$, hệ số tương quan R = 1.



Hình 4. Đường biểu diễn mối tương quan giữa diện tích pic và nồng độ amygdalin

Độ lặp lại

Hàm lượng amygdalin trung bình trong cao HPTU là 1,23%. RSD của hàm lượng qua 6 lần thử nghiệm là 0,5% không vượt quá 2,0%. Quy trình đạt yêu cầu về độ lặp lại.

Quy trình đạt yêu cầu về độ chính xác trung gian.

Độ đúng

Thực hiện phương pháp thêm amygdalin đối chiếu vào mẫu placebo, lượng amygdalin thêm vào tương ứng với 5 mức nồng độ 40%, 70%, 100%, 130%, 160% so với nồng độ định lượng. Mỗi mức nồng độ chuẩn bị 3 mẫu.

Bảng 3. Kết quả thẩm định độ đúng

Cao placebo (mg)	Nồng độ amygdalin thêm vào (µg/ml)	Diện tích pic (mAU.s)	Nồng độ amygdalin tìm thấy (µg/ml)	Tỷ lệ phục hồi (%)	TB (%)	RSD (%)
299,8	9,6	169,91658	9,46	98,7	98,1	0,9
300,1	9,6	169,54968	9,44	98,5		
300,3	9,6	167,11562	9,31	97,0		
300,4	16,8	294,15439	16,38	97,6	98,2	0,5
300,0	16,8	296,57980	16,52	98,4		
300,2	16,8	297,09915	16,54	98,6		
300,2	24,0	430,16757	23,96	99,9	100,4	0,5
299,7	24,0	432,30319	24,07	100,4		
300,3	24,0	434,75848	24,21	101,0		
300,2	31,2	569,08887	31,69	101,7	101,1	0,6
300,1	31,2	562,28662	31,31	100,5		
300,3	31,2	566,92065	31,57	101,3		
300,1	38,4	693,53693	38,62	100,8	100,9	0,2
299,8	38,4	694,42615	38,67	100,8		
300,3	38,4	696,67456	38,80	101,1		

Tỷ lệ phục hồi ở tất cả các nồng độ đều nằm trong khoảng 98,0 - 102,0%. Quy trình đạt yêu cầu về độ đúng.

Khoảng xác định

Dựa vào kết quả tính tuyến tính, độ chính xác và độ đúng, suy ra quy trình có khoảng xác định là 9,6 - 38,4 µg/ml (tương ứng 40 - 160% nồng độ định lượng).

KẾT LUẬN

Bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao với đầu dò dây diod quang, chúng tôi đã xây dựng được quy trình định lượng amygdalin trong cao HPTU. Quy trình định lượng đã được thẩm định tính tương thích hệ thống, tính đặc hiệu, tính tuyến tính ($y = 18,0744x$ $R = 1$), độ lặp lại (RSD = 0,5%), độ chính xác trung gian (RSD = 0,7%), độ đúng (tỷ lệ phục hồi 98,1 - 101,1%), khoảng xác định 9,6 - 38,4 µg/ml. Đề tài đã góp phần vào công tác xây dựng tiêu chuẩn chất lượng cho chế phẩm cao Huyết phủ trực ú.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Lei Zhang, Zhenzuo Jiang, Jing Yang, Yuanyuan Li, Yuefei Wang, Xin Chai (2015), "Chemical material basis study of Xuefu Zhuyu decoction by ultraperformance liquid chromatography coupled with quadrupole time-of-flight mass spectrometry", *Journal of*

Food and Drug Analysis, 248, pp. 1-10.

2. Li Liu, Jin-ao Duan, Yuping Tang, Nianyun Yang, Hongyue Ma, Xuqin Shi (2012), "Taoren-Honghua herb pair and its main components promoting blood circulation through influencing on hemorheology, plasma coagulation and platelet aggregation", *Journal of Ethnopharmacology*, 139, pp. 381 - 387.

3. Muhammad Qadir, Kiran Fatima (2017), "Review on Pharmacological Activity of Amygdalin", *Archives in Cancer Research*, 5 (4), pp. 1-3.

4. Chinese Pharmacopoeia Commission (2010), *Pharmacopoeia of the people's republic of China*, Vol. 1, People's Medical Publishing House, China, pp.1425.

5. Bộ Y tế (2013), Quyết định số 07/QĐ-QLD ngày 11 tháng 01 năm 2013 về việc ban hành Sổ tay hướng dẫn đăng ký thuốc, Phụ lục 8 - Thẩm định quy trình phân tích, Thẩm định quy trình phân tích bằng sắc ký lỏng hiệu năng cao, tr. 30 - 35.

6. Asean guideline for validation of analytical procedures (2008), pp. 1-17.

7. ICH Harmonised tripartite guideline (2005), *Validation of analytical procedures: text and methodology*, pp. 1-13.