

XÂY DỰNG QUY TRÌNH ĐỊNH TÍNH, ĐỊNH LƯỢNG ĐỒNG THỜI TANSINONE-I, TANSINONE-IIA VÀ CRYPTOTANSINONE TRONG DƯỢC LIỆU RỄ ĐAN SÂM

ThS. LÊ QUỐC HÙNG, ThS. NGUYỄN VŨ MINH
 DS. KHUẤT BÁ LINH - Viện KN-NC dược và TTBYT Quân đội
 TS. NGUYỄN HỮU TÙNG - Đại học Quốc gia Hà Nội
 PGS.TS. PHƯƠNG THIÊN THƯƠNG - Viện Dược liệu (Bộ Y tế)

Phản biện khoa học: TS. PHẠM XUÂN CHUNG
 Trưởng phòng Dược, Cục Quân y

TÓM TẮT: Nghiên cứu đã xây dựng được quy trình định tính, định lượng đồng thời tanshinone-I, tanshinone-IIA và cryptotanshinone có trong dược liệu rễ đan sâm bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao. Điều kiện sắc ký: cột sắc ký Phenomenex-C18 (250 mm × 4,6 mm, 5 µm); nhiệt độ 25°C; pha động A: dung dịch K₂PO₄ 0,5 mM (pH 2,6); pha động B: ACN/MeOH (2:1 v/v); theo chương trình gradient (0 đến 7,5 phút: 70-95%B; 7,5 đến 10,0 phút: 95%B; 10,0 đến 11,0 phút: 95-70%B; 11,0 đến 12,0 phút: 70%B); Detector SPD-10AVP với bước sóng 270 nm; tốc độ dòng 1,5 ml/phút; thể tích tiêm 20 µl. Giới hạn phát hiện của tanshinone-I, tanshinone-IIA và cryptotanshinone tương ứng là 3,8 ng/mL; 10,9 ng/mL; 4,7 ng/mL. Giới hạn định lượng của tanshinone-I, tanshinone-IIA và cryptotanshinone tương ứng là 12,8 ng/ml, 36,5 ng/ml, 15,6 ng/ml. Độ đặc hiệu, độ tuyến tính, độ chính xác, độ đúng cao. Kết quả định lượng tanshinone-I, tanshinone-IIA và cryptotanshinone trong dược liệu đan sâm thu hái tại Hà Giang là cao nhất (lần lượt là 1,023 µg/mg, 2,385 µg/mg, 1,199 µg/mg).

Từ khóa: Dược liệu đan sâm, sắc ký lỏng hiệu năng cao, tanshinone, cryptotanshinone.

ABSTRACT: The study had developed the qualitative, quantitative process concurrently of tanshinone-I, tanshinone-IIA and cryptotanshinone in ginseng root by method of High-Performance Liquid Chromatography (HPLC). The chromatographic conditions: Phenomenex-C18 chromatographic column (250 mm x 4,6 mm, 5 µm); temperature 25°C; mobile phase A: K₂PO₄ solution 0.5 mM (pH 2.6); mobile phase B: ACN/MeOH (2: 1 v/v); according to the gradient program (0 to 7.5 minutes: 70-95%B; 7.5 to 10.0 minutes: 95%B; 10.0 to 11.0 minutes: 95-70%B; 11.0 to 12.0 minutes: 70%B); Detector SPD-10AVP with wave length 270 nm; flow speed of 1.5 ml/min; injection volume 20 µl. The detection limits of tanshinone-I, tanshinone-IIA and cryptotanshinone were 3.8 ng/mL, 10.9ng/mL; 4.7 ng/mL respectively. The quantitative limits of tanshinone-I, tanshinone-IIA and cryptotanshinone were 12.8ng/ml, 36.5 ng/ml, 15.6ng/ml, respectively. The specificity, linearity, precision, high accuracy. The quantitative results of tanshinone-I, tanshinone-IIA and cryptotanshinone in pharmaceutical products collected in Ha Giang were highest (1.023 µg/mg, 2.385 µg/mg, 1.199 µg/mg, respectively).

Keywords: Radix Salviae miltiorrhiza, HPLC, tanshinone, cryptotanshinone.

Chịu trách nhiệm nội dung: ThS. Lê Quốc Hùng, Email: baohien.08@gmail.com

Ngày nhận bài: 02/12/2018; mời phản biện khoa học: 20/12/2018; chấp nhận đăng: 10/01/2019.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ.

Đan sâm (tên khoa học *Salvia miltiorrhiza* Bunge., thuộc họ *Lamiaceae*) là cây thuốc có nguồn gốc từ Trung Quốc. Hiện nay, đan sâm được trồng nhiều và sinh trưởng tốt ở vùng Tây Bắc nước ta. Rễ cây đan sâm phơi hoặc sấy khô tạo dược liệu đan sâm (*Radix Salviae miltiorrhiza*), dùng trong điều trị một số bệnh lý, như bệnh tim mạch, kinh nguyệt không đều, phong thấp, suy nhược thần kinh, mất ngủ... Nghiên cứu y học hiện đại cho thấy, đan sâm đặc biệt tốt cho tim mạch, làm giãn mạch và tăng lưu lượng động mạch vành, cải thiện vi tuần hoàn, phòng chống tình trạng thiếu máu, làm chậm việc

hình thành mảng xơ vữa động mạch...

Để góp phần chuẩn hóa dược liệu đan sâm, chúng tôi triển khai đề tài này nhằm xây dựng quy trình định tính, định lượng đồng thời tanshinone-I, tanshinone-IIA và cryptotanshinone trong dược liệu rễ đan sâm bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC); áp dụng quy trình định tính, định lượng đồng thời tanshinone-I, tanshinone-IIA và cryptotanshinone trong một số mẫu dược liệu rễ đan sâm.

2. ĐỐI TƯỢNG, NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU.

2.1. Đối tượng và nguyên liệu nghiên cứu:

- Đối tượng: dược liệu rễ đan sâm, thu hái tại Việt Nam, được giám định tên khoa học là *Salvia miltiorrhiza* Bunge. (họ *Lamiaceae*); mẫu tiêu bản lưu giữ tại Viện Dược liệu Trung ương (Bộ Y tế).

- Nguyên liệu:

+ Chất chuẩn: tanshinone-I (lô: BCBS1432V, hàm lượng: 98,0% HPLC), tanshinone-IIA (lô: BCBT9460, hàm lượng: 98,0% HPLC) và cryptotanshinone (lô: 116M4756V, hàm lượng: 98,0% HPLC), do hãng Sigma Aldrich cung cấp.

+ Hóa chất, dung môi: đạt tiêu chuẩn tinh khiết hoặc dùng cho HPLC.

+ Thiết bị: máy sắc kí lỏng hiệu năng cao với detector UV-Vis đã được hiệu chuẩn, đáp ứng yêu cầu theo GLP và ISO/IEC 17025.

2.2. Phương pháp nghiên cứu:

- Nghiên cứu phương pháp xử lí mẫu:

+ Xay nhỏ dược liệu, rây qua rây 315 để được cỡ bột mịn, đồng nhất. Chiết xuất tanshinone-I, tanshinone-IIA và cryptotanshinone bằng phương pháp lắc trực tiếp kết hợp siêu âm. Khảo sát các điều kiện chiết xuất (dung môi chiết, thời gian, pH...). Sau đó, phân tích mẫu thử bằng HPLC và đánh giá sơ bộ kết quả để chọn phương pháp chiết tối ưu.

- Phương pháp xử lí mẫu:

+ Dung dịch mẫu thử (qua thử nghiệm với nhiều biện pháp xử lí mẫu khác nhau): cân chính xác 80,0 mg bột dược liệu đã xác định hàm ẩm, cho vào bình định mức 10 ml, thêm 7 ml methanol, chiết siêu âm ở 40°C trong 30 phút. Để nguội, thêm methanol vừa đủ đến vạch, lắc đều, lọc dịch chiết qua màng lọc 0,45 µm, được dung dịch mẫu thử đan sâm.

+ Dung dịch đối chiếu: cân chính xác các chất chuẩn, pha thành các dung dịch đối chiếu trong methanol có nồng độ tanshinone-I, tanshinone-IIA, cryptotanshinone xác định. Lọc qua màng lọc 0,45 µm để được dung dịch tiêm sắc kí.

- Xây dựng phương pháp phân tích:

+ Điều kiện sắc kí: khảo sát về loại và kích thước cột sắc kí, pha động và các yếu tố khác để

chọn được điều kiện sắc kí cho phép tách các chất nghiên cứu trong mẫu thử.

+ Thẩm định phương pháp phân tích: quy trình phân tích được thẩm định tuần tự với các tiêu chí cơ bản: độ thích hợp hệ thống, tính đặc hiệu, khoảng tuyến tính, độ đúng, độ chính xác.

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ BÀN LUẬN.

3.1. Xây dựng phương pháp phân tích:

Phân tích bằng HPLC với detector UV-VIS, sử dụng cột C18. Thành phần pha động và chương trình dung môi được khảo sát và lựa chọn điều kiện sắc kí phù hợp như sau:

- Cột sắc kí là phenomenex-C18 (150 mm × 4,6 mm, 5 µm) được bảo vệ bởi cột C18.

- Pha động A: dung dịch K₂PO₄ 0,5 mM (pH 2,6); pha động B: ACN/MeOH (2:1 v/v).

Thời gian (phút)	Pha động A (%)	Pha động B (%)
0	30	70
7,5	5	95
10,0	5	95
11,0	30	70
12,0	30	70

- Bước sóng: 270 nm.

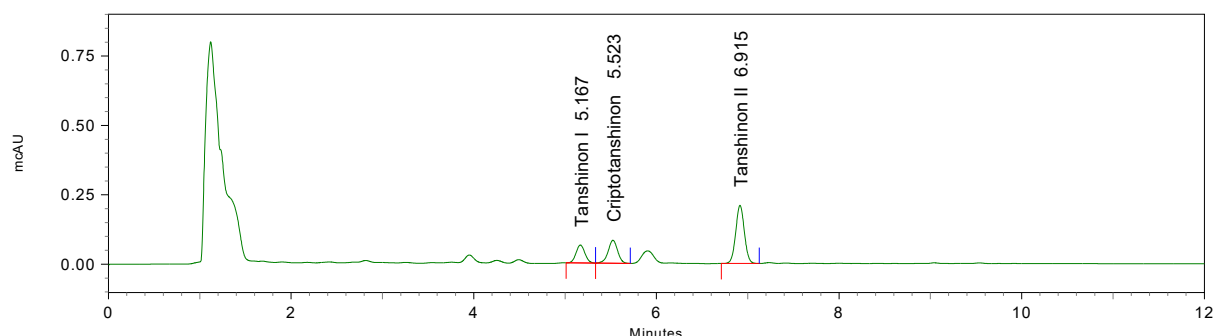
- Tốc độ dòng: 1,5 mL/phút.

- Thể tích tiêm mẫu: 20 µL.

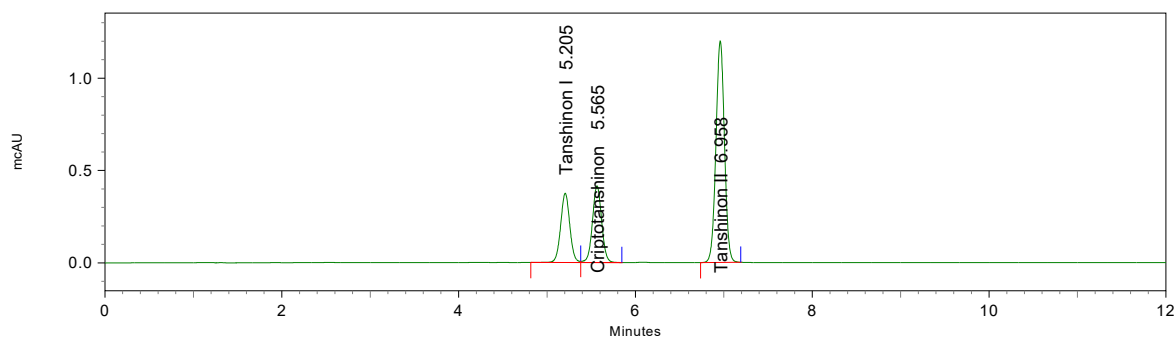
Với điều kiện sắc kí này, hỗn hợp các chất nghiên cứu đã tách khỏi nhau và tách với các thành phần khác trong mẫu thử (với $R_s \geq 1,5$).

Thực hiện chương trình sắc kí đã chọn với các hợp chất để xác định thời gian lưu tương ứng với từng chất nghiên cứu. Trong điều kiện sắc kí trên, thời gian lưu của tanshinone-I, tanshinone-IIA và cryptotanshinone lần lượt xấp xỉ 5,2 phút; 5,6 phút và 6,9 phút (hình 1).

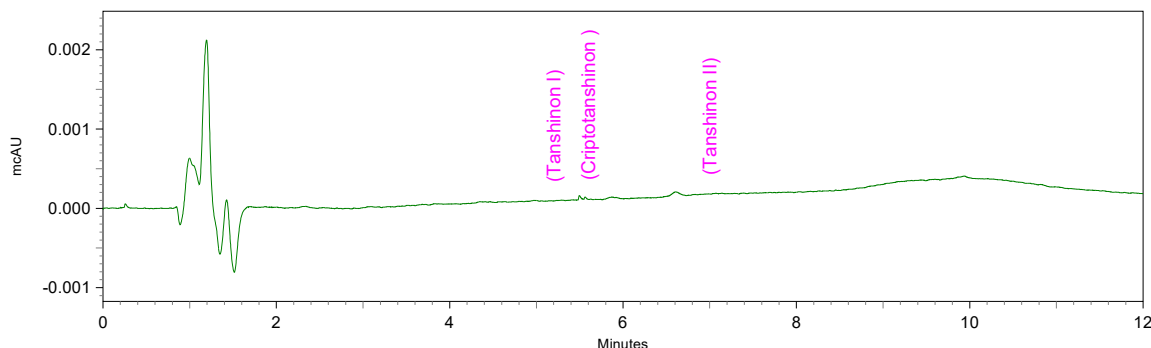
Theo kết quả quét phổ UV-Vis, pic của tanshinone-I, tanshinone-IIA và cryptotanshinone ở bước sóng khoảng 270 nm có sự hấp thụ cao của cả 3 chất, nên chúng tôi lựa chọn bước sóng 270 nm làm bước sóng định lượng.



Hình 1. Sắc kí đồ của mẫu chuẩn tanshinone-I, tanshinone-IIA và cryptotanshinone.



Hình 2. Sắc kí đồ của mẫu thử tanshinone-I, tanshinone-IIA và cryptotanshinone.



Hình 3. Sắc kí đồ mẫu dung môi.

Các sắc kí đồ thu được của dung dịch đối chiếu và dung dịch mẫu thử cho thấy pic của tanshinone-I, tanshinone-IIA và cryptotanshinone tách hẳn nhau và tách riêng biệt so với các pic của các chất có trong mẫu thử (hình 2).

3.2. Thẩm định phương pháp:

3.2.1. Tính đặc hiệu:

Sắc kí lần lượt dung môi pha mẫu, dung dịch đối chiếu, dung dịch mẫu thử đan sẫm với điều kiện HPLC đã chọn, thấy kết quả sắc kí đồ dung môi pha mẫu không có pic của các chất nghiên cứu tại thời gian lưu tương ứng (hình 3). Sắc kí đồ của tanshinone-I, tanshinone-IIA, cryptotanshinone trong mẫu đối chiếu và các mẫu thử tách riêng biệt, với độ phân giải $R \geq 1,5$ (hình 1 và hình 2).

3.2.2. Độ thích hợp:

Tiến hành sắc kí lặp lại 6 lần dung dịch đối chiếu đã chuẩn bị ở trên, ghi lại các giá trị về thời gian lưu, diện tích pic, kết quả (bảng 1) cho thấy, hệ thống sắc kí có độ lặp lại tốt với thời gian lưu và diện tích pic của các chất ($RSD < 2\%$).

Bảng 1. Kết quả kiểm tra độ thích hợp.

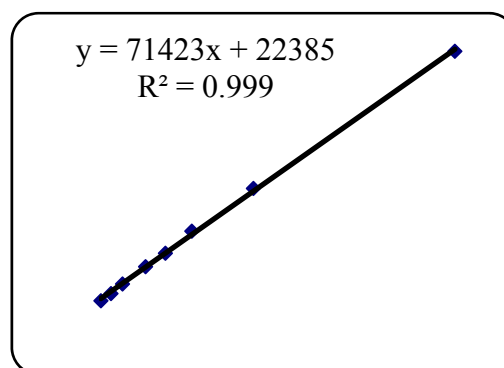
Hợp chất	Thời gian lưu (phút)		Diện tích pic (mAU.s)	
	Trung bình	RSD %	Trung bình	RSD %
Tanshinone-I	5,206	0,05	522.463,7	0,28
Tanshinone-IIA	6,956	0,058	1.592.337	0,24
Cryptotanshinone	5,566	0,066	605.159,3	0,26

3.2.3. Khoảng nồng độ tuyến tính:

Từ các dung dịch gốc chất đối chiếu, pha các dãy dung dịch chuẩn gồm 6 mẫu có nồng độ tăng dần trong khoảng thích hợp, tiến hành sắc kí để khảo sát khoảng nồng độ tuyến tính, kết quả:

- Phương trình hồi quy với tanshinone-I được xác định là: $S = 71.423C + 22.385$.

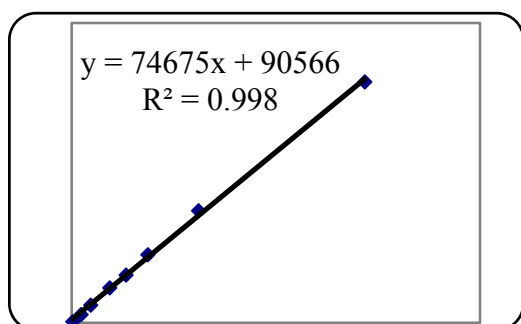
Phương trình đường chuẩn tuyến tính trong khoảng nồng độ khảo sát là 1,22-16,33 $\mu\text{g/mL}$ (với hệ số tương quan r là 0,9993).



Hình 4. Phương trình hồi quy tuyến tính của tanshinone-I.

- Phương trình hồi quy với tanshinone-IIA được xác định là: $S = 74.675C + 90.566$.

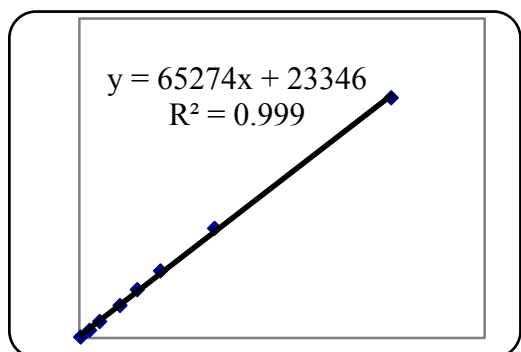
Phương trình đường chuẩn tuyến tính trong khoảng nồng độ khảo sát là 3,50-46,66 $\mu\text{g/mL}$ (với hệ số tương quan r là 0,9988).



Hình 5. Phương trình hồi quy tuyến tính của tanshinone-IIA.

Phương trình hồi quy với cryptotanshinone được xác định là: $S = 65.274C + 23.346$.

Phương trình đường chuẩn tuyến tính trong khoảng nồng độ khảo sát là 1,50-20,0 $\mu\text{g/mL}$ (với hệ số tương quan r là 0,9992).



Hình 6. Phương trình hồi quy tuyến tính của cryptotanshinone.

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

Bảng 2. Kết quả khảo sát LOD, LOQ ($\mu\text{g/mL}$).

Chỉ tiêu	LOD (ng/ml)	LOQ (ng/ml)
Tanshinone-I	3,8	12,8
Tanshinone-IIA	10,9	36,5
Cryptotanshinone	4,7	15,6

3.2.5. Độ đúng:

Thêm vào mẫu thử một lượng chính xác chất đối chiếu sao cho tổng lượng hoạt chất có trong mẫu nằm trong khoảng tuyến tính, kết quả khảo sát độ đúng của các chất (bảng 3).

Bảng 3. Kết quả độ đúng của các chất.

Tên chất	Tỉ lệ thu hồi (%)		RSD %
	Min-max	Trung bình	
Tanshinone-I	81,77 -118,19	102,37	13,39
Tanshinone-IIA	83,97 -119,14	98,71	14,38
Cryptotanshinone	81,18 -104,73	93,62	10,41

3.2.6. Độ lặp lại:

Sắc kí 6 mẫu thử đã chuẩn bị với các khối lượng 80,0 mg, kết quả khảo sát độ lặp lại (ở bảng 4).

Bảng 4. Kết quả khảo sát độ lặp lại.

Chất phân tích	Hệ số F	RSD %
Tanshinone-I	5.099,2	1,04
Tanshinone-IIA	15.830,4	1,50
Cryptotanshinone	70.63,3	1,19

Xác định được hàm lượng tanshinone-I, tanshinone-IIA và cryptotanshinone trong dược liệu rễ đan sâm.

3.3. Định lượng tanshinone-I, tanshinone-IIA và cryptotanshinone trong dược liệu rễ đan sâm:

Áp dụng phương pháp HPLC đã xây dựng được, từ đó, định hàm lượng tanshinone-I, tanshinone-IIA và cryptotanshinone trong một số mẫu dược liệu rễ đan sâm, kết quả:

Bảng 5. Kết quả xác định hàm lượng tanshinone-I, tanshinone-IIA và cryptotanshinone trong dược liệu rễ đan sâm.

Mẫu dược liệu rễ đan sâm	Tanshinone-I ($\mu\text{g/mg}$)	Tanshinone-IIA ($\mu\text{g/mg}$)	Cryptotanshinone ($\mu\text{g/mg}$)
Sapa	0,677	1,978	1,040
Hà Giang	1,023	2,385	1,199
Trung Quốc	0,545	0,881	0,626
Lâm Đồng	0,578	2,116	0,708
Lai Châu	0,735	1,871	0,884

Tiến hành phân tích với các điều kiện sắc kí đã xây dựng, thấy hàm lượng tanshinone-I từ 0,545-1,023 $\mu\text{g/mg}$, tanshinone-IIA từ 0,881-2,385 $\mu\text{g/mg}$ và cryptotanshinone 0,626-1,119 $\mu\text{g/mg}$.

4. KẾT LUẬN.

- Xây dựng được quy trình định tính, định lượng đồng thời tanshinone-I, tanshinone-IIA và cryptotanshinone có trong dược liệu rễ đan sâm bằng phương pháp HPLC. Điều kiện sắc kí: cột sắc kí phenomenex-C18 (250 mm $\times$ 4,6 mm, 5 μm); nhiệt độ 25°C; pha động A: dung dịch K_2PO_4 0,5 mM (pH 2,6), pha động B: ACN/MeOH (2:1 v/v); theo chương trình gradient (0 đến 7,5 phút: 70-95%B; 7,5 đến 10,0 phút: 95%B; 10,0 đến 11,0 phút: 95-70%B; 11,0 đến 12,0 phút: 70%B); Detector SPD-10AVP với bước sóng 270 nm; tốc độ dòng: 1,5 ml/phút; thể tích tiêm: 20 μL .

- Giới hạn phát hiện của tanshinone-I, tanshinone-IIA và cryptotanshinone tương ứng là 3,8 ng/mL; 10,9 ng/mL và 4,7 ng/mL. Giới hạn định lượng của tanshinone-I, tanshinone-IIA và

cryptotanshinone tương ứng là 12,8 ng/mL, 36,5 ng/mL và 15,6 ng/mL.

- Phương pháp này có độ đặc hiệu, độ tuyến tính, độ chính xác, độ đúng cao. Kết quả định lượng tanshinone-I, tanshinone-IIA và cryptotanshinone trong dược liệu rễ đan sâm thu hái tại Hà Giang là cao nhất, cụ thể: 1,023 µg/mg; 2,385 µg/mg và 1,199 µg/mg.

TÀI LIỆU THAM KHẢO:

1. Bộ Y tế (2009), *Dược điển Việt Nam IV*, Nhà xuất bản Y học Hà Nội, tr. 751-752, PL 129, PL 131, PL-239.
2. Đỗ Tất Lợi (2005), *Những cây thuốc và vị thuốc Việt Nam*, Nhà xuất bản Y học Hà Nội, tr. 818-820.
3. Đỗ Thu Hà và CS (2016), "Xây dựng phương pháp định lượng tanshinone IIA trong dược liệu đan sâm trồng ở Việt Nam bằng HPLC-DAD", *Tạp chí Dược liệu*, tập 1, số 1+2/2016.
4. Xianchun Chen, Akia Kotani, Hideki Hakamata, Shouying Du, Jie Wang, Fumiyo Kusu (2012), *Determination of cryptotanshinone, tanshinone-I, tanshinone-IIA in Salvia miltiorrhiza by Micro HPLC with Amperometric Detection*, pp. 605-614 | Received 29 Jul 2012, Accepted 10 Sep 2012, Accepted author version posted online: 20 Sep 2012, Published online: 20 Sep 2012.
5. Ewa Skala, Halina Wysokinska (2005), *Tanshinone Production in Roots of Micropropagated Salvia przewalskii Maxim*, Department of Biology - Pharmaceutical Botany, Medical Uni. of Tódz, Muszyńskiego 1, 90-151 Tódz, Poland. Fax: (48-42) 678-83-48. □

ƯỚC TÍNH MỨC ĐỘ BÁO CÁO THIẾU CÁC CA BỆNH LAO...

(Tiếp theo trang 49)

Từ kết luận trên chúng tôi đưa ra khuyến nghị:

- CTCLQG cần mở rộng và tăng cường hơn nữa hoạt động phối hợp y tế công - tư, bảo đảm tất cả BN lao có chẩn đoán, phát hiện, điều trị cần được báo cáo đến CTCLQG.

- Cần tăng cường chất lượng chẩn đoán lao ở các CSYT ngoài CTCLQG, tăng cường chẩn đoán lao có bằng chứng vi khuẩn học bằng chuyển gửi hoặc đặt máy Xpert; tăng cường chẩn đoán lao không có bằng chứng vi khuẩn học bằng đào tạo liên tục, hội chẩn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO:

1. Bassili A, Grant A.D, El-Mohgazy E, Galal A, Glaziou P, Seita A, Abubakar I, Bierrenbach AL, Crofts J.P, Van Hest N.A (2010), "Estimating tuberculosis case detection rate in resource-limited countries: a capture-recapture study in Egypt", *Int J Tuberc Lung Dis* 2010, 14:727-732.
2. Dunbar R, Van Hest R, Lawrence K, Verver S, Enarson D.A, Lombard C, Beyers N, Barnes J.M (2011), "Capture-recapture to estimate completeness of tuberculosis surveillance in two communities in South Africa", *Int J Tuberc Lung Dis* 2011, 15:1038-1043.
3. Fatima R, Harris R.J, Enarson D.A, Hinderaker S.G, Qadeer E, Ali K, Bassilli A (2014), "Estimating tuberculosis burden and case detection in Pakistan", [Erratum appears in: *Int J Tuberc Lung Dis* 2014;18:754], *Int J Tuberc Lung Dis* 2014, 18:55-60.
4. Gimenez-Duran J, Galmes-Truyols A, Gonzalez-Cortijo T, Portell-Arbona M, Bosch-Isabel C, Vanrell-Berga J.M, Nicolau-Riutort A, Cayla J.A (2018), "Capture-recapture and anti-tuberculosis prescriptions, Balearic Islands, Spain, 2010-2012", *Int J Tuberc Lung Dis* 2018, 22:754-759.
5. Hoa N.B, Cobelens F.G.J, Sy D.N, Nhung N.V, Borgdorff M.W, Tiersma E.W (2011), "Diagnosis and treatment of tuberculosis in the private sector, Vietnam (Correspondence)", *Emerg Infect Dis* 2011, 17:562-564.
6. Huseynova S, Hashim D.S, Tbeni M.R, Harris R, Bassili A, Abubakar I, Glaziou P, Floyd K, Van Hest N.A (2013), "Estimating tuberculosis burden and reporting in resource-limited countries: a capture-recapture study in Iraq", *Int J Tuberc Lung Dis* 2013, 17:462-467.
7. Mancuso J.D, Tobler S.K, Eick A.A, Olsen C.H (2010), "An evaluation of the completeness and accuracy of active tuberculosis reporting in the United States military", *Int J Tuberc Lung Dis* 2010, 14:1310-1315.
8. Van der Werf M.J, Borgdorff M.W (2007), "Targets for tuberculosis control: how confident can we be about the data?", *Bull World Health Organ* 2007, 85:370-376.
9. WHO (2018), *Global tuberculosis report 2018*, World Health Organization Document 2018, WHO/CDS/TB/2018.20:1-231.
10. WHO (2013), *Assessing tuberculosis under-reporting through inventory studies*, World Health Organization Document 2013, WHO/HTM/TB/2012.12:1-113. □