

XÂY DỰNG PHƯƠNG PHÁP ĐỊNH LƯỢNG TANSHINON IIA TRONG DƯỢC LIỆU ĐAN SÂM TRỒNG Ở VIỆT NAM BẰNG HPLC-DAD

Đỗ Thị Hà^{1,*}, Lê Thị Loan¹, Nguyễn Minh Khởi¹, Trần Thị Hồng Phương²

¹*Viện Dược liệu; ²Cục Quản lý Y Dược cổ truyền, Bộ Y tế*

*Email: hado.nimms@gmail.com

(Nhận bài ngày 20 tháng 2 năm 2016)

Tóm tắt

Phương pháp định lượng dược liệu đan sâm sử dụng chất đánh dấu tanshinon IIA đã được xây dựng nhằm áp dụng trong công tác nghiên cứu chọn giống, nhân giống và lựa chọn nguồn nguyên liệu. Quy trình phân tích được phát triển sử dụng cột sắc ký pha đảo Agilent XDB C18 kết nối bộ phận bảo vệ cột Agilent XDB C18 và rửa giải bằng dung dịch gradient 0,1% phosphoric acid trong nước (A) và acetonitril (B). Tốc độ dòng 1,0 mL/phút và bước sóng phát hiện ở 268 nm. Khoảng nồng độ tuyến tính 1–80 µg/mL. Giới hạn phát hiện LOD = 0,02 µg/ml và giới hạn định lượng LOQ = 0,07 (µg/ml), độ thu hồi nằm trong khoảng 98–102% và độ lệch chuẩn tương đối < 2%. Phương pháp định lượng được phát triển và thẩm định cho thấy tính chọn lọc, đặc hiệu, chính xác phù hợp để định lượng tanshinon IIA trong dược liệu đan sâm. Kết quả định lượng một số mẫu đan sâm trồng ở Việt Nam cho thấy có sự khác biệt khá lớn về hàm lượng tanshinon IIA, dao động từ 0,107% đến 0,497% tính theo dược liệu khô kiệt, sự khác biệt về hàm lượng tanshinon IIA phụ thuộc vào điều kiện sinh trưởng và phát triển.

Từ khóa: *Đan sâm, Salvia miltiorrhiza, Tanshinone IIA, Phương pháp phân tích định lượng.*

Summary

Establishing the Method for Quantitative Determination of Tanshinone IIA in Roots of *Salvia miltiorrhiza* Cultivated in Vietnam by HPLC/DAD

A HPLC/DAD method was developed for the quantitative determination of tanshinone IIA in Danshen (*Salvia miltiorrhiza* Bunge) using an Agilent XDB C18 reversed-phase column coupled with an Agilent XDB C18 guard column and a gradient solution of 0.1% phosphoric acid in water (A) and acetonitrile (B). The flow rate was 1.0 mL/min and the detection wavelength were set at 268 nm. The standard curves were linear over the concentration range of 1–80 µg/mL. The LOD = 0.02 µg/ml and LOQ = 0.07 (µg/ml). The percentage-recovery of each reference compound was found to be from 98% to 100.2%, and the RSD (%) was less than 2%. The method was then applied to determine the quantity of tanshinone IIA in some root samples of *S. miltiorrhiza*, cultivated in difference areas of Vietnam. The contents of tanshinone IIA in the indicated areas were compared. The results revealed that the content of tanshinone IIA varies from 0,107% to 0,497% depending on the growth conditions of the plant.

Keywords: *Salvia miltiorrhiza, Danshen, tanshinone IIA, HPLC quantitative analysis.*

1. Đặt vấn đề

Đan sâm (*Salvia miltiorrhiza* Bunge) là một dược liệu quý, quan trọng và được dùng rất nhiều trong y học cổ truyền. Từ xưa trong Đông y đã lưu truyền câu ngạn ngữ: "Nhất vị Đan sâm âm, công đồng Tứ vật thang", nghĩa là chỉ một vị đan sâm cũng có tác dụng ngang với cả bài thuốc Tứ vật (gồm 4 vị thực địa, đương quy, bạch thược và xuyên khung, là bài thuốc "bổ huyết điều huyết" kinh điển của Đông y). Trong Y học cổ truyền, đan sâm được dùng chữa bệnh tim, tâm hư phiền nhiệt, hồi hộp khó chịu, kinh nguyệt không đều, bế kinh, phong thấp, suy nhược thần kinh, nhức đầu,... [1]. Theo Y học hiện đại, cao rễ đan sâm

tác dụng tốt trên hệ tim mạch, đặc biệt trong phòng ngừa và điều trị bệnh mạch vành, nhồi máu cơ tim, nhồi máu não. Tanshinon IIA, một trong những thành phần chính của đan sâm, đã được chứng minh có nhiều hoạt tính sinh học như: ổn định màng hồng cầu [1], làm giãn mạch máu; ức chế phì đại tâm thất trái [4]; ngăn chặn sự dày lên của màng động mạch hoặc tĩnh mạch, ngăn chặn sự tăng sinh tế bào và quá trình apoptosis của tế bào cơ trơn [2]; giảm hiện tượng xơ vữa động mạch [7], hạ lipid huyết [6]; chống ngưng tập tiểu cầu, chống huyết khối [5], giảm kích thước vùng nhồi máu cơ tim [8]... do đó thường được dùng làm chất đánh dấu trong

kiểm soát chất lượng dược liệu và các chế phẩm từ đan sâm [3].

Mặc dù đan sâm là dược liệu quý, được sử dụng rất phổ biến trong YHCT, nhưng do chủ yếu được nhập từ Trung Quốc nên chất lượng dược liệu đan sâm ở nước ta còn nhiều vấn đề bất cập. Để đảm bảo chủ động nguồn nguyên liệu, Viện Dược liệu đã nghiên cứu nhân giống cây đan sâm và đang triển khai trồng tại một số địa điểm. Tuy nhiên, để lựa chọn được vùng trồng phù hợp với sự phát triển cũng như chất lượng dược liệu đan sâm, cần có những nghiên cứu đánh giá cụ thể.

Trong phạm vi của bài báo này, chúng tôi xin giới thiệu phương pháp đánh giá chất lượng dược liệu đan sâm sử dụng chất đánh dấu tanshinon IIA và kết quả đánh giá một số mẫu dược liệu đan sâm trồng ở Việt Nam

2. Nguyên liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Nguyên liệu, dung môi hóa chất

Nguyên liệu

Mẫu thử: mẫu dược liệu là rễ đã sấy khô của cây đan sâm (*Salvia miltiorrhiza* Bunge) được trồng tại Hòa Bình, Hà Nội, Mộc Châu, Hưng Yên, Phú Thọ (Việt Nam).

Mẫu chuẩn: Chất chuẩn tanshinon IIA hàm lượng $\geq 97\%$ (Sigma).

Dung môi, hóa chất:

Dung môi dùng cho chiết xuất dược liệu: methanol (TQ). Dung môi dùng cho phân tích: methanol (Merck), acetonitril (Merck), nước cất dùng cho phân tích, acid phosphoric (Merck) dùng để pha dung môi dùng trong phân tích.

Thiết bị dụng cụ:

Cân phân tích 4 chữ số Precisa 262SMA-FR, cân xác định độ ẩm Precisa HA60, bếp đun cách thủy Memmert, máy siêu âm Power sonic 405, hệ thống máy sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC), Shimadzu, Nhật Bản và các thiết bị, dụng cụ cần thiết khác.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Chuẩn bị mẫu

Dung dịch chuẩn: Hòa tan tanshinon IIA trong methanol và pha loãng cùng dung môi để tạo thành dung dịch chuẩn gốc có nồng độ 1 mg/ml. Pha loãng dung dịch chuẩn gốc với

methanol để thu được các dung dịch có nồng độ thích hợp. Lọc qua màng có kích cỡ 0,45 μm được dung dịch dùng để triển khai sắc ký.

Dung dịch thử: Cân chính xác khoảng 1,0 g bột dược liệu, cho vào bình nón. Thêm chính xác 100 ml methanol và cân. Chiết siêu âm ở nhiệt độ phòng trong 1 giờ. Để nguội về nhiệt độ phòng, cân lại và bổ sung lượng methanol bị mất. Lọc dịch chiết qua màng lọc kích cỡ 0,45 μm thu được dung dịch thử dùng để triển khai sắc ký.

Điều kiện sắc ký:

Tham khảo tài liệu [3] và khảo sát về thành phần pha động, tỷ lệ dung môi, tốc độ dòng, chúng tôi xây dựng được chương trình sắc ký như sau: Pha tĩnh: cột Agilent XDB C18 (250 mm x 4,6 mm, 5 μm), bảo vệ cột Agilent XDB C18. Pha động: Acetonitril (A) - Acid phosphoric 0,1%/nước (B) (80-20). Tốc độ dòng: 1 ml/phút. Thể tích tiêm mẫu 5 μl . Bước sóng phát hiện: 268nm

Thẩm định quy trình định lượng:

Thẩm định các chỉ tiêu: tính đặc hiệu, tính thích hợp của hệ thống, khoảng tuyến tính, độ đúng, độ lặp lại, giới hạn phát hiện (LOD) và giới hạn định lượng (LOQ).

Định lượng tanshinon IIA trong các mẫu dược liệu đan sâm

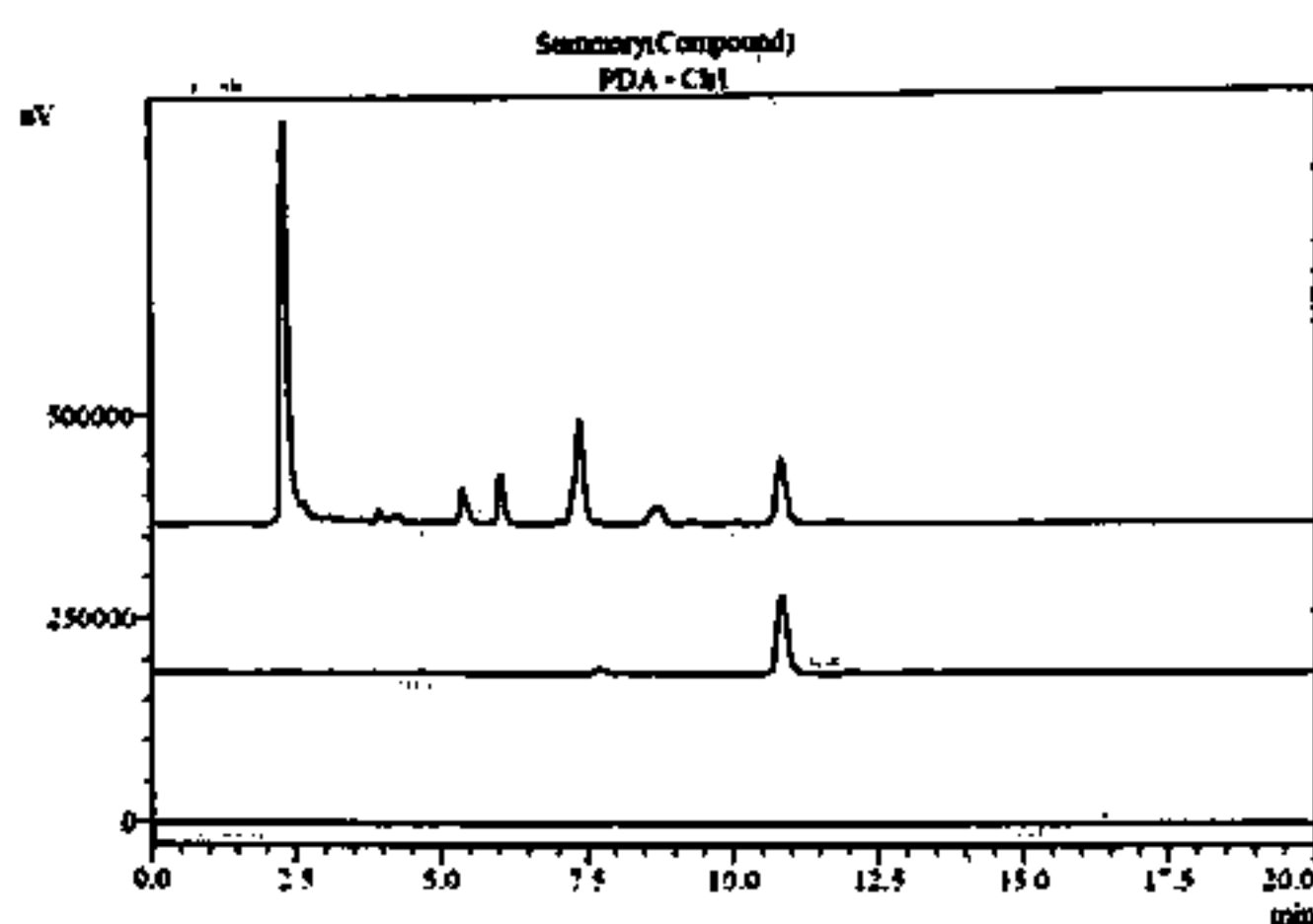
Hàm lượng tanshinon IIA trong các mẫu đan sâm được xác định bằng quy trình đã được xây dựng.

Phương pháp xử lý số liệu: Các số liệu nghiên cứu được xử lý thống kê theo phương pháp thống kê sinh học. Tất cả các thí nghiệm được lặp lại ít nhất ba lần. Giá trị trung bình cộng $\pm$ độ lệch chuẩn (SD) được tính toán dựa trên phần mềm microsoft excel 2010. Hàm lượng của mỗi mẫu được thể hiện bởi hàm lượng tanshinon IIA trung bình $\pm$ SD của các giá trị thực nghiệm.

3. Kết quả

3.1. Xây dựng và thẩm định quy trình định lượng

Tính đặc hiệu: Tiến hành sắc ký các loại mẫu trắng, mẫu thử và mẫu chuẩn theo quy trình phân tích. Ghi lại sắc ký đồ, xác định thời gian lưu, phổ UV của pic tanshinon IIA trong sắc ký đồ mẫu thử và mẫu chuẩn. Kết quả thu được được trình bày ở Hình 1 và 2.

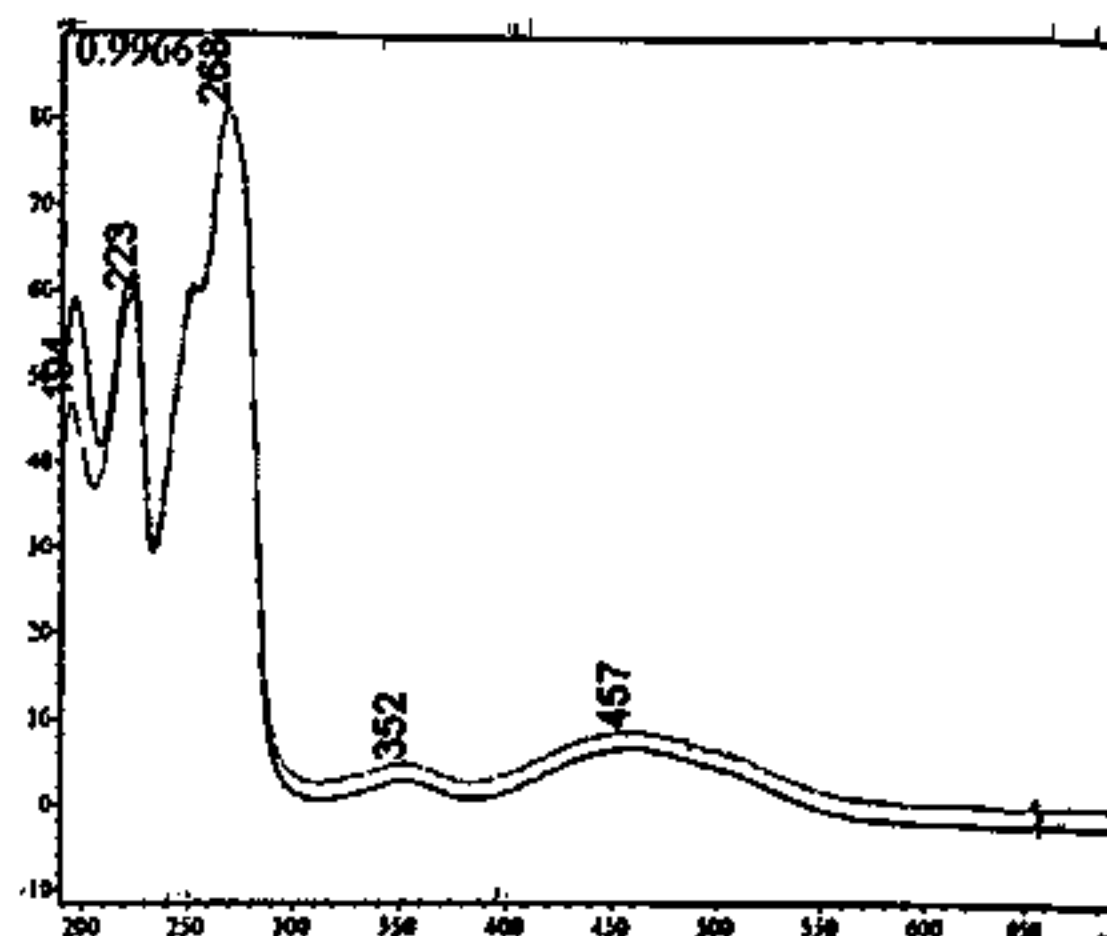


Hình 1. Kết quả khảo sát tính đặc hiệu của hệ thống (A: Dịch chiết đan sâm, B: Tanshinon IIA chuẩn, C: methanol)

Kết quả cho thấy: trên sắc ký đồ của dung môi pha mẫu không xuất hiện pic ở trong khoảng thời gian lưu tương ứng với thời gian lưu của pic trên sắc ký đồ của dung dịch chuẩn. Sắc ký đồ của dung dịch thử cho 1 pic có thời gian lưu khác nhau không có ý nghĩa thống kê so với pic của chất chuẩn tanshinon IIA trong sắc ký đồ mẫu chuẩn. Trên sắc ký đồ dung dịch thử không xuất hiện thêm các pic khác (pic tạp) ảnh hưởng đến pic chuẩn tanshinon IIA. Pic của tanshinon IIA trong sắc ký đồ dung dịch chuẩn và thử có hệ số tinh khiết xấp xỉ 1,0. Hệ số chồng phổ UV của pic tanshinon IIA thu được trong sắc ký đồ dung dịch thử và phổ UV của pic tương ứng trong sắc ký đồ dung dịch chuẩn là 0,9966, xấp xỉ 1,0.

Như vậy, phương pháp đã chọn có tính đặc hiệu cao với tanshinon IIA và có thể dùng để phân tích thành phần hợp chất tanshinon IIA trong dược liệu đan sâm.

Tính thích hợp của hệ thống: tiến hành phân tích 01 dung dịch chuẩn lặp lại 06 lần. Tiến hành sắc ký, ghi lại các sắc ký đồ và xác định giá trị thời gian lưu, diện tích pic, hệ số đối xứng. Kết quả cho thấy độ lệch chuẩn tương đối về thời gian lưu và diện tích pic là 0,50% và 0,09% đều thấp hơn 2% (Bảng 1). Điều đó cho thấy các điều kiện sắc ký đã lựa chọn và hệ thống sắc ký HPLC sử dụng là ổn định, phù hợp cho phép phân tích tanshinon IIA trong dược liệu đan sâm.



Hình 2. Phổ hấp thụ UV của Tanshinon IIA chuẩn và trong SKD dịch chiết

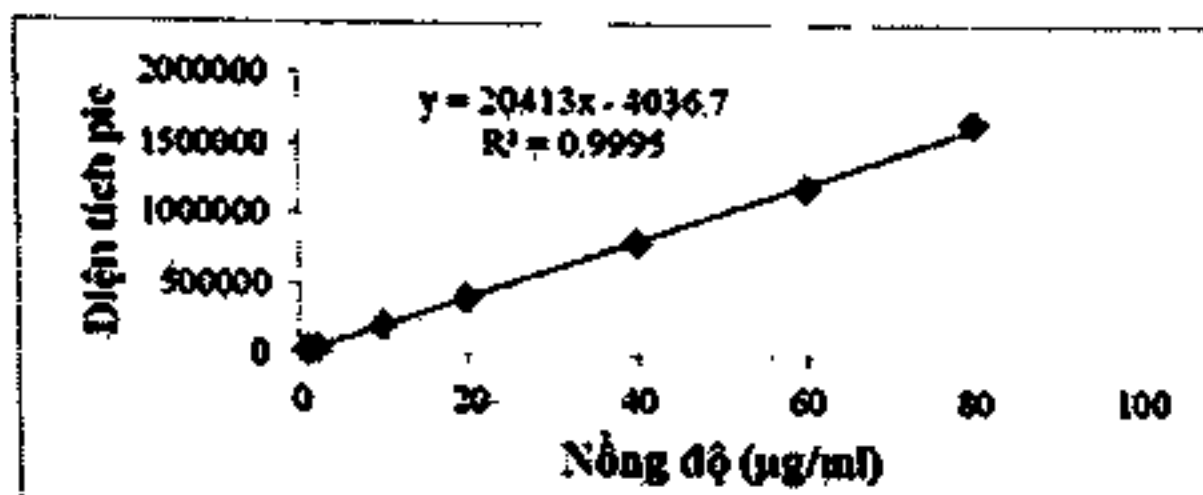
Bảng 1. Tính thích hợp của hệ thống sắc ký

Thí nghiệm	Thời gian lưu (phút)	Diện tích (pic)	T
1	11,026	568926	1,169
2	10,994	567949	1,168
3	10,972	567424	1,168
4	10,918	568367	1,170
5	10,904	567952	1,170
6	10,891	567772	1,171
Trung bình	10,9508	568065,0	
SD	0,0544	520,7	
RSD (%)	0,50	0,09	

Độ tuyến tính: Chuẩn bị các dung dịch chuẩn có nồng độ 1-80 $\mu\text{g/ml}$ bằng cách pha loãng từ một dung dịch chuẩn gốc ban đầu với các hệ số pha loãng khác nhau. Tiến hành sắc ký các dung dịch chuẩn (mỗi dung dịch tiêm 03 lần) ghi lại sắc ký đồ và xác định đáp ứng của pic. Xác định phương trình hồi quy tuyến tính, hệ số tương quan tuyến tính giữa nồng độ chất chuẩn có trong mẫu và đáp ứng pic thu được trên sắc ký đồ bằng phương pháp bình phương tối thiểu. Kết quả cho thấy có tương quan tuyến tính giữa diện tích pic trên sắc ký đồ và nồng độ tanshinon IIA trong dung dịch theo phương trình $y = 20413x - 4036,7$ với hệ số tương quan $r^2 = 0,9995$ (Bảng 2 và Hình 3).

Bảng 2. Kết quả khảo sát khoảng tuyến tính của tanshinon IIA

Nồng độ ($\mu\text{g/ml}$)	Diện tích pic
1	20270
2	40748
10	209969
20	396132
40	801964
60	1200573
80	1649971



Hình 3. Đồ thị biểu diễn đường chuẩn của tanshinon IIA

Bảng 3. Kết quả khảo sát độ đúng

Thí nghiệm	Lượng thêm vào (µg)	Lượng thu hồi (µg)	Độ thu hồi (%)	M±SD (%)
1	196	193,73	98,8	99,9 ± 1,38
2	196	198,84	101,5	
3	196	194,80	99,4	
4	490	495,27	101,1	99,9 ± 1,65
5	490	493,60	100,7	
6	490	480,52	98,1	
7	980	994,06	101,4	99,9 ± 1,42
8	980	977,91	99,8	
9	980	966,30	98,6	

Độ lặp lại

Tiến hành định lượng 06 mẫu thử độc lập, mỗi mẫu tiêm 03 lần. Xác định hàm lượng hoạt chất có trong các mẫu thử bằng cách sử dụng đường chuẩn ở phần xác định khoảng tuyến tính. Độ lặp lại của phương pháp được xác định bằng giá trị RSD (%), kết quả định lượng hàm lượng tanshinon IIA trong mẫu. Độ lệch chuẩn tương đối RSD < 2%. Như vậy, phương pháp có độ lặp lại tốt và có thể ứng dụng trong phân tích tanshinon IIA trong đan sâm (Bảng 4).

Bảng 4. Kết quả khảo sát độ lặp lại của phương pháp

Thí nghiệm	Khối lượng (g)	Diện tích pic	Hàm lượng (%)
1	0,9831	956555	0,490
2	0,9682	960476	0,499
3	0,9695	969029	0,503
4	0,9790	972311	0,500
5	0,9712	960214	0,498
6	0,9648	960542	0,501
Trung bình			0,498
SD			0,005
RSD (%)			0,930

Giới hạn phát hiện và giới hạn định lượng

Giới hạn phát hiện (LOD): Tiến hành pha loãng dung dịch hỗn hợp chuẩn và phân tích HPLC đến khi tín hiệu của chất định phân tích trên sắc ký đồ thu được có tỷ lệ S/N (tín hiệu/nhiều) = 2 H/h đạt khoảng từ 2 – 3; trong đó

Độ đúng: Khi thêm các lượng tanshinon IIA chuẩn khác nhau, phương pháp đều cho độ thu hồi nằm trong khoảng 98-102% và độ lệch chuẩn tương đối < 2%. Kết quả này chứng tỏ phương pháp đã xây dựng có độ thu hồi tốt, phù hợp để định lượng tanshinon IIA trong dược liệu đan sâm. Kết quả được trình bày ở Bảng 3.

H là chiều cao pic định phân tích, h là chiều cao tín hiệu nhiễu nền lớn nhất. Nồng độ xác định được là giới hạn phát hiện (LOD) của phương pháp ứng với từng chất định phân tích.

Giới hạn định lượng (LOQ): Giới hạn định lượng của phương pháp được xác định dựa trên giới hạn phát hiện: $LOQ = 3,3 \times LOD$.

Kết quả thẩm định cho thấy phương pháp có giới hạn phát hiện là $LOD = 0,02 \mu\text{g/ml}$, giới hạn định lượng $LOQ = 3,3 \times LOD = 0,02 \times 3,3 = 0,07 (\mu\text{g/ml})$.

Kết quả cho thấy phương pháp đã xây dựng có giới hạn phát hiện và giới hạn định lượng tương đối thấp, phù hợp để xác định hàm lượng tanshinon IIA trong dược liệu đan sâm.

3.2. Định lượng tanshinon IIA trong các mẫu dược liệu đan sâm

Kết quả định lượng các mẫu dược liệu đan sâm được trình bày ở Bảng 5:

Bảng 5. Kết quả định lượng tanshinon IIA trong một số mẫu đan sâm

Mẫu số	Vùng trồng	Độ ẩm (%)	Hàm lượng tanshinon IIA (M±SD, %)
1	Hòa Bình	4,22	0,497 ± 0,007
2	Hà Nội-1	4,75	0,255 ± 0,002
3	Hà Nội-2	4,81	0,107 ± 0,001
4	Mộc Châu	4,59	0,437 ± 0,001
5	Hung Yên	4,62	0,334 ± 0,003
6	Phú Thọ	4,48	0,337 ± 0,002

Kết quả cho thấy hàm lượng tanshinon IIA trong các mẫu đan sâm dao động từ $0,107 \pm 0,001\%$ đến $0,497 \pm 0,007\%$ tính theo dược liệu khô kiệt. Trong đó 2 mẫu có hàm lượng cao nhất là mẫu được trồng tại Hòa Bình và Mộc Châu với hàm lượng tanshinon IIA tương ứng là $0,497 \pm 0,007\%$ và $0,437 \pm 0,001\%$. Hai mẫu có hàm lượng tanshinon IIA thấp nhất là 2 mẫu được trồng ở Hà Nội với hàm lượng là $0,255 \pm 0,002\%$ và $0,107 \pm 0,001\%$.

4. Bàn luận

Trong bối cảnh các bệnh lý về tim mạch trở nên phổ biến và trở thành mối quan tâm của toàn xã hội, với các tác dụng dược lý đáng chú ý, dược liệu đan sâm được sử dụng ngày càng nhiều, không chỉ trong y học cổ truyền mà còn được phát triển thành nhiều dạng chế phẩm hiện đại. Do đó, nghiên cứu nhân giống và triển khai trồng dược liệu đan sâm đang là vấn đề cần thiết hiện nay. Để lựa chọn được các điều kiện trồng và chăm sóc phù hợp với cây đan sâm, cần có nghiên cứu cụ thể. Trong đó, yếu tố quan trọng nhất cần quan tâm là hàm lượng hoạt chất trong dược liệu. Chính vì vậy, chúng tôi đã xây dựng phương pháp định lượng dược liệu đan sâm sử dụng chất đánh dấu tanshinon IIA nhằm áp dụng trong công tác nghiên cứu chọn giống, nhân giống và lựa chọn nguồn nguyên liệu. Phương pháp đã được khảo sát và chỉnh lý dựa theo Dược điển Trung Quốc năm 2010 và có điều chỉnh theo điều kiện thực tế. Quy trình phân tích đã được

thẩm định cho thấy tính chọn lọc, đặc hiệu, chính xác phù hợp để định lượng tanshinon IIA trong dược liệu đan sâm.

Phương pháp này cũng đã được dùng để định lượng một số mẫu đan sâm trồng ở một số vùng ở Việt Nam. Kết quả cho thấy có sự khác biệt khá lớn về hàm lượng tanshinon IIA giữa các vùng, dao động từ $0,107\%$ đến $0,497\%$ tính theo dược liệu khô kiệt. Trong đó, các mẫu đan sâm trồng ở Hòa Bình và Mộc Châu cho hàm lượng cao nhất, tương ứng $0,437\%$ và $0,497\%$. Hàm lượng tanshinon IIA thấp nhất ở các mẫu trồng ở Hà Nội.

Những kết quả này là những gợi ý quan trọng trong việc lựa chọn vùng trồng. Tuy nhiên, số lượng mẫu khảo sát còn rất hạn chế, cần phân tích trên nhiều mẫu hơn, kết hợp đánh giá các điều kiện khác để có thể lựa chọn điều kiện nhân giống, trồng trọt, chăm sóc và thu hái tối ưu.

5. Kết luận

Chúng tôi đã xây dựng được phương pháp định lượng tanshinon IIA trong dược liệu đan sâm bằng HPLC và đã định lượng hàm lượng tanshinon IIA trong một số mẫu dược liệu đan sâm trồng ở Việt Nam. Kết quả cho thấy các mẫu đan sâm trồng ở Hòa Bình và Mộc Châu có hàm lượng tanshinon IIA cao nhất, tương ứng $0,437\%$ và $0,497\%$.

Lời cảm ơn: Bài báo là sản phẩm của đề tài cấp Nhà nước "Xây dựng cơ sở dữ liệu nguồn cây thuốc Việt Nam phục vụ ngành Hóa dược" thuộc Chương trình Hóa dược, mã số CNHD.ĐT.050/13-15.

Tài liệu tham khảo

1. Viện Dược liệu (2006), *Cây thuốc và động vật làm thuốc ở Việt Nam, Tập II*, Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật, 732-738.
2. Chen H. S., Chen Y. C., Z. Zeng (2003), Effect of Tanshinone IIA on vascular smooth muscle cell proliferation in post-injury artery: status and trend, *West China Medical Journal*, 18(4), 602.
3. China Pharmacopoeia (2010), 383-384.
4. Fang J., Xu S. W., Wang P., Tang F. T., Zhou S. G., Gao J., Chen J. W., Huang H. Q., Q. Liu P. (2010), Tanshinone II-A attenuates cardiac fibrosis and modulates collagen metabolism in rats with renovascular hypertension, *Phytomedicine*, 18(1), 58-64.
5. G Liu, A Friggeri, Y Yang, YJ Park, Y Tsuruta, E. Abraham (2009), miR-147, a microRNA that is induced upon Toll-like receptor stimulation, regulates murine macrophage inflammatory responses, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 15819-15824.
6. Kang Y. J., Jin U. H., Chang H. W., Son J. K., Lee S. H., Son K. H., Chang Y. C., Lee Y. C., H. Kim C. (2008), Inhibition of microsomal triglyceride transfer protein expression and atherogenic risk factor apolipoprotein B100 secretion by tanshinone IIA in HepG2 cells, *Phytotherapy Research*, 22(12), 1640-5.
7. Li Y. S., Liang Q. S., J. Wang (2007), Effect of tanshinone II A on angiotensin II induced nitric oxide production and endothelial nitric oxide synthase gene expression in cultured porcine aortic endothelial cells, *Chinese Journal of Integrated Traditional and Western Medicine*, 27(7), 637-639.
8. Zhang Y., Wei L., Sun D., Cao F., Gao H., Zhao L., Du J., Li Y., Wang H. (2010), Tanshinone IIA pretreatment protects myocardium against ischaemia/reperfusion injury through the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt-dependent pathway in diabetic rats, *Diabetes Obesity and Metabolism*, 12(4), 316-322.