

XÂY DỰNG QUY TRÌNH ĐỊNH LƯỢNG PALMATIN VÀ BERBERIN TRONG BÀI THUỐC TAM HOÀNG THANG BẰNG PHƯƠNG PHÁP HPLC/PDA

Đoàn Thị Ái Nghĩa*, Nguyễn Việt Khấn, Nguyễn Hữu Tiến,
Nguyễn Khánh Thùy Linh, Nguyễn Đình Quỳnh Phú
Trường Đại học Y Dược, Đại học Huế
*Email: dtanghia@huemed-univ.edu.vn

TÓM TẮT

Đặt vấn đề: Tam hoàng thang là phương thuốc kinh điển, nghiên cứu định lượng hoạt chất chính giúp phát triển bài thuốc. **Mục tiêu nghiên cứu:** khảo sát sơ bộ điều kiện chiết; tiến hành xây dựng và thẩm định quy trình định lượng các hoạt chất chính trong cao bài thuốc. **Đối tượng và phương pháp nghiên cứu:** đối tượng nghiên cứu là cao bài thuốc; sử dụng phương pháp sắc ký lỏng pha đảo ghép nối đầu dò dãy diod quang. **Kết quả:** điều kiện sắc ký: pha tĩnh là cột Zorbax Eclipse XDB-C18, pha động gồm ACN – dung dịch đệm (chứa 3,4 g kali dihydrophosphat và 1,7 g natri laurylsulfat trong 1000 mL hỗn hợp dung môi gồm nước – acetonitrile (1:1)) tỉ lệ 48:52; bước sóng phân tích 346 nm, tốc độ dòng: 0,7 mL/phút; nhiệt độ cột 40°C; thể tích tiêm mẫu: 20 µL. Quy trình được thẩm định về tính tương thích hệ thống, tính đặc hiệu, tính tuyến tính (palmatin (2,34 – 75 ppm): $y = 19028x + 60496$ với $R^2 = 0,9999$; berberin (9,38 – 300 ppm): $y = 96282x + 137909$ với $R^2 = 0,9999$), độ chính xác (RSD trong ngày và khác ngày của palmatin và berberin trong khoảng 0,63 – 1,37); độ đúng (tỷ lệ thu hồi trung bình trong khoảng 95,52 – 100,74); LOD và LOQ của palmatin và berberin lần lượt là 0,28 ppm, 0,84 ppm và 1,51 ppm, 4,56 ppm; đạt yêu cầu quy định theo hướng dẫn của AOAC. **Kết luận:** phương pháp đã xây dựng và thẩm định có thể ứng dụng để định lượng đồng thời hàm lượng palmatin và berberin có trong các chế phẩm chứa cao bài thuốc Tam hoàng thang.

Từ khóa: palmatin, berberin, HPLC, cao bài thuốc, Tam Hoàng Thang.

ABSTRACT

METHOD DEVELOPMENT FOR THE DETERMINATION OF PALMATIN AND BERBERIN IN TAM HOANG THANG REMEDY BY HPLC/PDA

Doan Thi Ai Nghia*, Nguyen Viet Khan, Nguyen Huu Tien,
Nguyen Khanh Thuy Linh, Nguyen Dinh Quynh Phu
Hue University of Medicine and Pharmacy, Hue University

Background: Tam Hoang Thang is a classic remedy should quantify main active ingredients to improve value. **Objectives:** Preliminary survey conditions extract; developing and validating the process of quantifying two main ingredients in the remedy. **Materials and methods:** research subjects are extracts of the remedy. Reverse phase liquid chromatography method coupled with photodiode array detector is used. **Results:** Quantitative procedures were successfully developed with suitable chromatographic conditions: stationary phase was column Zorbax Eclipse XDB-C18, mobile phase consisting of ACN – buffer solution (contain 3.4 g potassium dihydrophosphate and 1.7 g of sodium lauryl sulfate in 1000 mL of water – ACN (1:1)) ratio 48:52; analytical wavelength 346 nm; flow rate: 0.7 mL/min; column temperature 40°C; sample injection volume: 20 µL. The procedure was validated for systematic compatibility, specificity, and linearity (palmatin (2,34 – 75 ppm): $y = 19028x + 60496$ với $R^2 = 0,9999$; berberin (9,38 – 300 ppm): $y = 96282x + 137909$ với $R^2 = 0,9999$); accuracy (intraday and inter-day RSD for palmatin and berberine in the range of 0.63 – 1.37); accuracy (average rate of recovery in the range 95.52 – 100.74); the LOD and LOQ of

palmatin and berberin were 0.28 ppm, 0.84 ppm and 1.51 ppm, 4.56 ppm, respectively; required standards in AOAC guidelines. Conclusions: the developed and validated method can be applied to quantify simultaneously palmatin and berberin in products of Tam Hoang Thang remedy.

Keywords: *palmatin, berberin, HPLC, extract of remedy, Tam Hoang Thang.*

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Khai thác hiệu quả các bài thuốc cổ phương theo hướng vừa hiện đại hóa vừa giữ gìn nét đặc trưng của y học cổ truyền là một cách hay giúp phát triển được thể mạnh về cây thuốc và hệ thống tri thức bản địa phong phú của dân tộc ta.

Theo Bản thảo cương mục, cổ phương Tam hoàng thang là phương thuốc kinh điển có tác dụng thanh nhiệt, hạ sốt, chống viêm nhiễm; bài thuốc gồm có ba vị thuốc thuộc nhóm thanh nhiệt táo thấp: Hoàng liên, Hoàng bá, Hoàng cầm mỗi vị 12g [10]. Trong đó Hoàng liên đóng vai trò là quân dược, Hoàng bá và Hoàng cầm là thần dược hỗ trợ cho Hoàng liên tạo ra tác dụng cho toàn bài thuốc.

Định lượng được hoạt chất chính của một cây thuốc hoặc một bài thuốc có ý nghĩa quan trọng trong việc tiêu chuẩn hóa và nghiên cứu phát triển sản phẩm có nguồn gốc tự nhiên, góp phần hiện đại hóa y học cổ truyền, giúp đưa những cổ phương kinh điển trở thành sản phẩm được kiểm soát chất lượng; đảm bảo tính an toàn, hiệu quả, kinh tế khi sử dụng phòng chữa bệnh. Bài thuốc Tiêu giao có 8 vị thuốc, sử dụng hoạt chất chính Paeoniflorin để định lượng [4]. Bài thuốc Giáng chỉ có 5 vị thuốc, sử dụng hoạt chất chính acid salvianolic B để định lượng [5]. Bài thuốc Tam hoàng thang, berberin và palmatin được ghi nhận là các alkaloid chính có trong Hoàng liên, Hoàng bá [3]; nên sử dụng 2 hoạt chất này để định lượng.

Đã có nghiên cứu định lượng đồng thời palmatin và berberin trong vị thuốc Hoàng liên [11]. Nghiên cứu này được thực hiện với mục tiêu chính là xây dựng và thẩm định quy trình định lượng đồng thời palmatin và berberin trong cao bài thuốc Tam hoàng thang bằng phương pháp HPLC/PDA. Từ đó, công bố lần đầu tiên quy trình định lượng đồng thời palmatin và berberin trong bài thuốc Tam hoàng thang bằng phương pháp HPLC-PDA được nghiên cứu tại Việt Nam.

II. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1 Đối tượng nghiên cứu

Cao bài thuốc Tam hoàng thang (các dược liệu cấu thành bài thuốc được cung cấp bởi công ty cổ phần dược Sơn Lâm; dược liệu đã được kiểm định đạt tiêu chuẩn theo Dược điển Việt Nam V). Chuẩn bị mẫu cao bài thuốc: Các dược liệu của bài thuốc được sấy khô, xay thành bột đồng nhất. Cân dược liệu Hoàng liên, Hoàng bá, Hoàng cầm mỗi loại 12g cho vào bình cầu 250mL tiến hành chiết hồi lưu cách thủy ở nhiệt độ 80°C, dung môi chiết là nước, thêm nước liên tục để đảm bảo thể tích ban đầu. Dịch chiết thu được lọc qua bông, sau đó cô cách thủy đến khô thành cặn.

Hóa chất: berberin chloride chuẩn (Merck) và palmatin chloride chuẩn (độ tinh khiết 84,48%; viện kiểm nghiệm thuốc Trung ương cung cấp); dung môi Methanol, Acetonitril (HPLC grade), nước cất 2 lần và các dung môi hữu cơ đạt tinh khiết kỹ thuật khác.

Thiết bị: hệ thống sắc ký lỏng hiệu năng cao SHIMADZU SPD-M20A detector PDA (Nhật); bể siêu âm Elmasonic S100H (Đức); tủ giữ nhiệt Memmert; cân phân tích Mettler Toledo (Thụy Sĩ); micropipet Labnet (Mỹ); cột sắc ký Zorbax Eclipse XDB-C8 (150 x 4,6mm, 5µm) (Agilent, Mỹ), cột Zorbax Eclipse XDB-C18 (150 x 4,6mm, 5µm) (Agilent, Mỹ) và các dụng cụ thủy tinh chính xác khác.

2.2 Phương pháp nghiên cứu

Chuẩn bị mẫu

Dung dịch hỗn hợp chuẩn: Cân chính xác khoảng 7,5mg palmatin chlorid vào bình định mức 5mL, thêm 2mL methanol, siêu âm trong 15 phút, định mức đến vạch bằng methanol, thu được dung dịch chuẩn gốc palmatine chloride nồng độ 1,5mg/ml. Cân chính xác khoảng 30mg berberin chlorid vào bình định mức 5mL, thêm 2mL methanol, siêu âm trong 15 phút, định mức đến vạch bằng methanol, thu được dung dịch chuẩn gốc berberin chlorid nồng độ 6,0mg/mL. Lấy 100 μ L dung dịch chuẩn gốc palmatin chlorid và 100 μ L dung dịch chuẩn gốc berberin chlorid vào bình định mức 10mL, định mức đến vạch bằng methanol, thu được dung dịch chuẩn hỗn hợp chứa palmatin chlorid 0,015mg/mL và berberin chlorid 0,060mg/mL.

Dung dịch thử: Lấy 0,1 g cao bài thuốc vào bình nút mài dung tích 100mL. Thêm 25mL hỗn hợp dung môi gồm methanol – acid hydrochloric (100:1) và đun hồi lưu trên cách thủy 30 phút, để nguội, gạn lấy dịch chiết.

Tiến hành chiết tương tự thêm 2 lần nữa. Gộp các dịch chiết, làm bốc hơi trong cách thủy tới cạn. Lắc cạn với nước nóng 5 lần, mỗi lần 15mL, lọc và gộp các dịch lọc lại, làm bốc hơi trong cách thủy tới cạn khô. Cặn được hoà tan trong methanol và chuyển vào bình định mức 50mL, thêm methanol đến vạch, lắc đều, lọc qua giấy lọc có kích thước lỗ lọc 0,45 μ m, thu được dung dịch thử.

Pha động sắc ký: hoà tan 3,4g kali dihydrophosphat và 1,7g natri laurylsulfat trong 1000mL hỗn hợp dung môi gồm nước – acetonitril (1:1), pH 6.

Khảo sát quy trình chiết xuất bài thuốc: khảo sát điều kiện chiết cao bài thuốc thay đổi lần lượt các giá trị tỷ lệ bột thuốc/dung môi nước, thời gian chiết, số lần chiết. Khảo sát 1, mẫu A1-A3 tương ứng với các tỷ lệ bột thuốc/dung môi nước là 1/4, 1/8, 1/10. Tiếp theo, khảo sát 2, mẫu B1-B4 được chiết với tỷ lệ bột thuốc/dung môi nước được lựa chọn từ khảo sát 1, thay đổi thời gian chiết lần lượt là 1 giờ, 2 giờ, 3 giờ, 4 giờ. Khảo sát 3, mẫu C1-C3 được chiết với tỷ lệ bột thuốc/dung môi nước và thời gian chiết được lựa chọn từ khảo sát 2, thay đổi số lần chiết lần lượt là gộp 1 lần, gộp 2 lần, gộp 3 lần. Chuẩn bị lặp lại 3 lần cho mỗi loại mẫu cao. So sánh thống kê các giá trị hàm lượng palmatin và berberin có trong lượng bột thuốc khô kiệt tương đương khối lượng một bài thuốc.

Công thức tính hàm lượng palmatin và berberin có trong lượng bột thuốc khô kiệt:

$$X\% = \frac{S_{thử}}{S_{chuẩn}} \cdot C_{chuẩn} \cdot \frac{50 \cdot a}{M \cdot b \cdot (100 - x)(100 - y)}$$

Trong đó:

X%: hàm lượng hoạt chất (palmatin hoặc berberin) có trong lượng bột thuốc khô kiệt tương đương khối lượng một bài thuốc; $S_{chuẩn}$, $S_{thử}$, $C_{chuẩn}$ lần lượt là diện tích Pic và nồng độ của dung dịch chuẩn và dung dịch thử tương ứng; M, a, b (g) lần lượt là khối lượng bột thuốc ban đầu, khối lượng cao chiết được, khối lượng cao pha dung dịch thử phân tích; x và y lần lượt là độ ẩm của bột thuốc ban đầu và độ ẩm của cao chiết được.

Khảo sát điều kiện HPLC: lựa chọn cột, hệ dung môi pha động với các chế độ gradient khác nhau thu được sắc ký đồ có pic của palmatin hoặc berberin tách tốt; pic gọn, cân đối, thời gian phân tích không quá dài.

Thẩm định phương pháp phân tích: thực hiện theo hướng dẫn của AOAC [1] với các tiêu chí được thẩm định trong nghiên cứu gồm: tính tương thích hệ thống, tính chọn lọc,

khoảng nồng độ tuyến tính, độ đúng, độ chính xác, giới hạn phát hiện (LOD) và giới hạn định lượng (LOQ).

Xử lý thống kê: các số liệu thí nghiệm khảo sát quy trình chiết xuất bài thuốc được xử lý thống kê bằng thuật toán ANOVA trên phần mềm SPSS 20 với mức ý nghĩa thống kê $p < 0,05$.

III. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. Khảo sát quy trình chiết xuất bài thuốc

Kết quả so sánh thống kê các giá trị hàm lượng palmatin và berberin có trong lượng bột thuốc khô kiệt tương đương khối lượng một bài thuốc thu được ở các điều kiện khảo sát khác nhau được trình bày trong bảng 1.

Bảng 1. Hàm lượng palmatin và berberin (ppm) khi khảo sát các điều kiện chiết xuất bài thuốc khác nhau (n=3)

Khảo sát tỷ lệ bột thuốc và dung môi	A1	A2	A3	
Palmatin	0,082 ^b ± 0,011	0,128 ^a ± 0,013	0,094 ^b ± 0,012	
Berberin	0,285 ^B ± 0,032	0,373 ^A ± 0,033	0,094 ^C ± 0,011	
Khảo sát thời gian chiết	B1	B2	B3	B4
Palmatin	0,127 ^c ± 0,008	0,149 ^b ± 0,013	0,209 ^a ± 0,013	0,073 ^d ± 0,005
Berberin	0,133 ^C ± 0,009	0,194 ^B ± 0,017	0,308 ^A ± 0,019	0,118 ^D ± 0,008
Khảo sát số lần chiết	C1	C2	C3	
Palmatin	0,169 ^b ± 0,009	0,153 ^b ± 0,012	0,283 ^a ± 0,012	
Berberin	0,379 ^A ± 0,022	0,180 ^C ± 0,022	0,329 ^B ± 0,014	

Nhận xét: Trong đó, số liệu được trình bày dưới dạng giá trị trung bình X% ± độ lệch chuẩn. Trên cùng một hàng ngang, các chữ cái khác nhau thể hiện sự khác nhau có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$) của các giá trị trung bình.

Mẫu A2 (ứng với tỷ lệ bột thuốc/dung môi nước 1/8) đo được nồng độ palmatin và berberin cao nhất, khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$) với các mẫu còn lại nên chọn tỷ lệ bột thuốc/dung môi nước 1/8 cho khảo sát kế tiếp. Mẫu B3 (ứng với thời gian chiết 3 giờ) đo được nồng độ palmatin và berberin cao nhất, khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$) với các mẫu còn lại nên chọn mốc 3 giờ cho khảo sát tiếp theo. Trong khảo sát số lần chiết, mẫu C3 đo được nồng độ palmatin cao nhất, khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$) với các mẫu còn lại; nhưng mẫu C1 đo được nồng độ berberin cao nhất, khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$) với các mẫu còn lại. Trong 2 alkaloid, berberin là thành phần chủ yếu trong vị quân Hoàng liên [9] nên được ưu tiên lựa chọn điều kiện chiết để thu được hàm lượng cao nhất. Do đó, chọn điều kiện chiết của mẫu C1 là điều kiện chiết tối ưu.

Sau quá trình khảo sát, điều kiện tối ưu được lựa chọn để chiết xuất cao bài thuốc là 80°C, tỷ lệ bột thuốc/dung môi nước 1/8, thời gian chiết 3 giờ, chiết 1 lần.

3.2. Lựa chọn điều kiện sắc ký

Chuẩn palmatin cho các cực đại hấp thụ ở bước sóng 226, 265 và 346nm. Chuẩn Berberin cho các cực đại hấp thụ ở bước sóng 229, 264 và 347nm. Chọn bước sóng 346 nm để cài đặt detector PDA.

Qua khảo sát hai cột C₁₈ và C₈, cột Zorbax Eclipse XDB-C18 (150 x 4,6mm, 5µm) được lựa chọn trong nghiên cứu này.

Sau các thực nghiệm bằng nhiều hệ dung môi pha động với các tỷ lệ khác nhau, hệ pha động tối ưu gồm ACN – dung dịch đệm tỉ lệ 48:52 cho pic các hoạt chất chính tách ra khỏi nhau và tách khỏi các tạp khác và pic cân đối.

Các điều kiện khác bao gồm: tốc độ dòng: 0,7mL/phút; nhiệt độ cột 40°C; thể tích tiêm mẫu: 20μL.

3.3. Thẩm định quy trình định lượng đồng thời palmatin và berberin trong cao đặc bài thuốc

Tính phù hợp hệ thống sắc ký

Tính phù hợp của hệ thống sắc ký được xác định bằng cách tiến hành tiêm lặp lại liên tiếp 6 lần dung dịch chuẩn palmatin và berberin. Xác định diện tích pic, số đĩa lý thuyết, hệ số đối xứng, hệ số rửa giải để xác định tính tương thích của hệ thống. Kết quả khảo sát tính phù hợp hệ thống sắc ký được trình bày ở bảng 2.

Bảng 2. Khảo sát tính phù hợp hệ thống sắc ký (n=6)

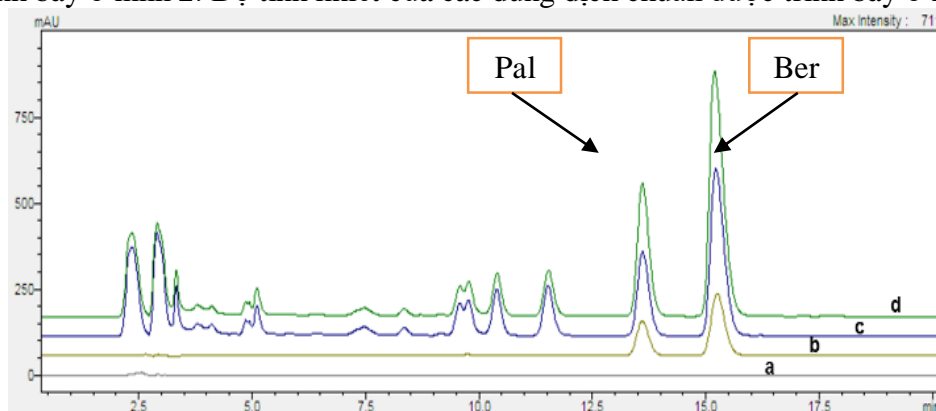
	Thời gian lưu (phút)		Diện tích pic (mAU.s)		Số đĩa lý thuyết N		Tf		Rs	
	Pal	Ber	Pal	Ber	Pal	Ber	Pal	Ber	Pal	Ber
Trung bình	13,32	14,99	1872459	3790031	11268	11227	1,140	1,194	3,150	3,150
RSD (%)	0,75	0,95	1,11	0,48	1,39	1,17	0,26	0,25	1,65	1,65

Nhận xét: Trong đó Pal, Ber lần lượt là viết tắt của palmatin và berberin.

Các thông số sắc ký đều có giá trị % RSD < 2% với số đĩa lý thuyết (N > 2000), hệ số kéo đuôi (0,8 < Tf < 1,2) và hệ số phân giải thể hiện khả năng tách 2 pic kế cạnh (Rs > 1,5) cho thấy hệ thống sắc ký chọn lựa là tương thích cho việc phân tích định lượng palmatin và berberin.

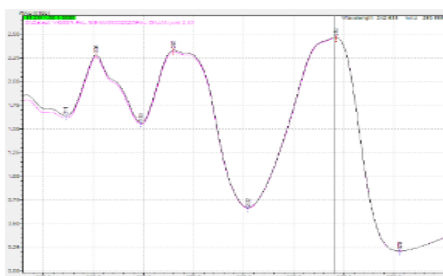
Tính chọn lọc

Tiến hành phân tích đồng thời các dung dịch mẫu trắng, mẫu chuẩn, mẫu thử, mẫu thử thêm chuẩn. Sắc ký đồ được trình bày ở hình 1, phổ UV của pic palmatin và berberin được trình bày ở hình 2. Độ tinh khiết của các dung dịch chuẩn được trình bày ở hình 3.

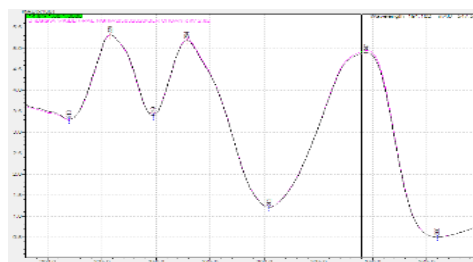


Hình 1. Sắc ký đồ thể hiện tính chọn lọc của phương pháp

(a): mẫu trắng; (b): mẫu chuẩn; (c): mẫu thử cao bài thuốc; (d): mẫu cao thêm chuẩn

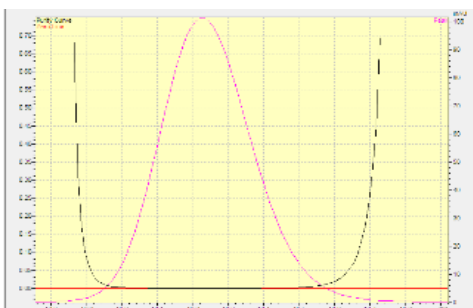


(a) Sự tương đồng phổ UV pic palmatin trong mẫu chuẩn và trong mẫu thử

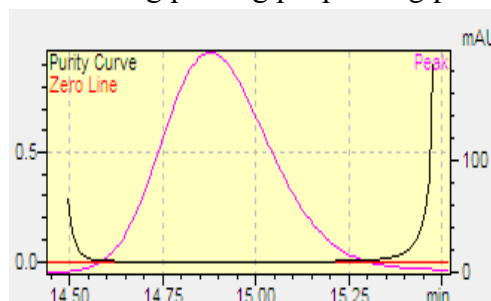


(b) Sự tương đồng phổ UV pic berberin trong mẫu chuẩn và trong mẫu thử

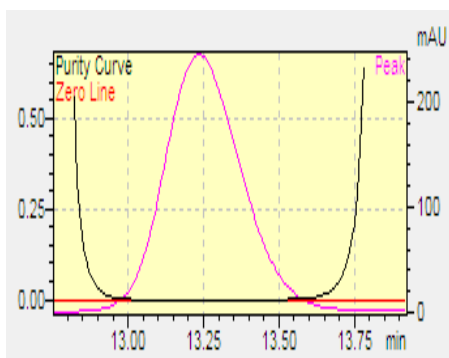
Hình 2. Phổ UV của mẫu chuẩn và mẫu thử bằng phương pháp chồng phổ



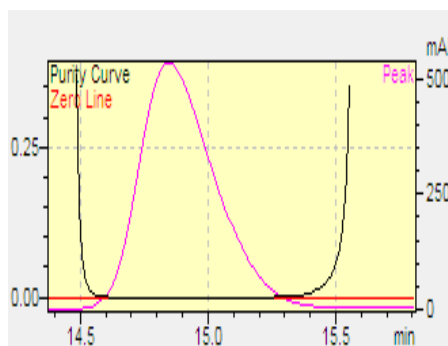
(a) Độ tinh khiết pic palmatin chuẩn



(b) Độ tinh khiết pic berberin chuẩn



(c) Độ tinh khiết pic palmatin thử



(d) Độ tinh khiết pic berberin thử

Hình 3. Kiểm tra độ tinh khiết pic các dung dịch chuẩn và thử

Phương pháp có tính chọn lọc tốt với thời gian lưu, phổ UV của pic palmatin và berberin trong các dung dịch đo hoàn toàn tương đồng. Trên mẫu trắng không có tín hiệu palmatin và berberin; độ tinh khiết pic đều trên 99,9 %.

Khoảng nồng độ tuyến tính

Chuẩn bị ít nhất dãy 5 nồng độ dung dịch chuẩn chứa đồng thời palmatin và berberin; tiến hành sắc ký như các điều kiện đã chọn. Đánh giá mối tương quan giữa nồng độ và diện tích pic thông qua đồ thị và hệ số R^2 . Kết quả cho thấy, chất chuẩn palmatin trong khoảng nồng độ từ 2,34 – 75ppm có sự tương quan tuyến tính giữa diện tích pic và nồng độ thể hiện thông qua đường thẳng hồi quy $y = 19028x + 60496$ với $R^2 = 0,9999$; chất chuẩn berberin trong khoảng nồng độ 9,38 – 300 ppm thể hiện sự tuyến tính thông qua đường thẳng hồi quy $y = 96282x + 137909$ với $R^2 = 0,9999$.

Độ chính xác

Lặp lại thí nghiệm 6 lần song song trong cùng 1 ngày. Xác định hàm lượng hoạt chất trong mẫu thử C1 ($\mu\text{g/L}$) dựa vào đường chuẩn (độ chính xác trong ngày). Lặp lại cả quy trình trên vào ngày tiếp theo trên cùng mẫu (độ chính xác khác ngày). Tính RSD (%) của hàm lượng trong ngày và khác ngày. Dựa vào giá trị RSD để kết luận độ chính xác. Kết quả được trình bày ở bảng 3.

Bảng 3. Kết quả thẩm định độ chính xác (n=6)

	Trong ngày		Khác ngày	
	Pal	Ber	Pal	Ber
$\bar{X} \pm \text{SD}$ (ppm)	22,80 \pm 0,25	103,90 \pm 0,77	22,70 \pm 0,31	103,50 \pm 0,65
RSD	1,10	0,74	1,37	0,63

Nhận xét: Trong đó Pal, Ber lần lượt là viết tắt của palmatin và berberin.

Theo AOAC, độ chính xác yêu cầu cho một quy trình định lượng với hàm lượng hoạt chất $\leq 10\%$ là $\text{RSD} < 1,5\%$. Như vậy độ chính xác đạt yêu cầu theo AOAC.

Độ đúng

Được xác định bằng kỹ thuật thêm chuẩn, lượng chuẩn thêm vào bằng 10%, 20%, 100% lượng dược chất có trong 0,1 g mẫu cao bài thuốc. Xử lý mẫu và tiến hành sắc ký mẫu thử không thêm chuẩn và mẫu thử có thêm chuẩn, mỗi mẫu làm 3 lần. Tính tỷ lệ thu hồi (%), kết quả được trình bày trong bảng 4.

Bảng 4. Kết quả khảo sát độ đúng trên mẫu cao bài thuốc (n=3)

Palmatin	Lượng thêm vào ban đầu (%)	10	20	100
	Tỷ lệ thu hồi trung bình (%)	95,52	97,99	99,21
	RSD (%)	0,4	1,41	0,78
Berberin	Lượng thêm vào ban đầu (%)	10	20	100
	Tỷ lệ thu hồi trung bình (%)	96,98	100,74	97,27
	RSD (%)	0,41	0,97	1,02

Độ đúng đạt yêu cầu cho một quy trình định lượng với hàm lượng hoạt chất trong cao bài thuốc $\leq 10\%$ với tỷ lệ thu hồi trung bình cho phép là 95 – 102%.

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

Giới hạn định lượng được tính dựa trên đường chuẩn. Giá trị LOD và LOQ của palmatin lần lượt là 0,28 ppm và 0,84 ppm; của berberin lần lượt là 1,51 ppm và 4,56 ppm.

IV. BÀN LUẬN

Một bài thuốc cổ truyền khi sử dụng trên thực tế thường được sắc với dung môi nước, thời gian sắc phụ thuộc vào phương thang là lấy khí hay lấy vị, sau khi sắc các dịch chiết 1 lần, 2 lần hoặc 3 lần thường được gộp lại cô đặc để uống [12]. Tam hoàng thang là một bài thuốc lấy vị nên có thể sắc ở thời gian dài. Mô phỏng quá trình chiết xuất này để thiết kế nghiên cứu, phương pháp chiết xuất được sử dụng là phương pháp chiết nóng, chỉ khảo sát dung môi là nước.

Bài thuốc Tiêu giao chiết với nước, sử dụng chất chỉ điểm định lượng Paeoniflori, có điều kiện chiết tối ưu là tỷ lệ dung môi/dược liệu trong khoảng 6,5-7,5mL/g, thời gian chiết trong khoảng 1 – 1,5 giờ và số lần chiết 3 lần [4]. Bài thuốc Giáng chỉ chiết với nước, sử dụng chất chỉ điểm định lượng acid salvianolic B, có điều kiện chiết tối ưu là tỷ lệ dung môi/dược liệu là 12mL/g, thời gian chiết là 2 giờ, nhiệt độ chiết là 67°C và số lần chiết là 2

[5]. Trong nghiên cứu này, điều kiện chiết mẫu tối ưu là tỷ lệ dung môi/dược liệu là 8mL/g, thời gian chiết 3 giờ, chiết 1 lần. Như vậy, cùng là cao bài thuốc chiết trong nước nhưng tùy thuộc đặc điểm của hoạt chất chính, các vị thuốc cấu thành và cách bố trí thí nghiệm mà điều kiện chiết xuất tối ưu khác nhau. Trong nghiên cứu này, thiết kế sắc 3 giờ như cách sử dụng trên thực tế và sắc 1 lần, hai nghiên cứu minh họa thiết kế sắc mỗi lần ngắn hơn và sắc nhiều lần để đạt giá trị hàm lượng hoạt chất cao; tỷ lệ dung môi gấp 6,5 – 12 lần lượng dược liệu là khoảng tối ưu trong 3 nghiên cứu này.

Sau khi khảo sát các cực đại hấp thụ của palmatin chuẩn và berberin chuẩn lần lượt ở bước sóng 226, 265, 346nm và 229, 264, 347nm; nghiên cứu chọn bước sóng 346nm; trong một số nghiên cứu định lượng đồng thời 2 hoạt chất này sử dụng bước sóng 346nm [8], một số nghiên cứu khác lựa chọn bước sóng thấp hơn ở mức khoảng 230nm [2], [7]. Khảo sát hai cột sắc ký C₁₈ và C₈, cột C₁₈ được lựa chọn, đây là loại cột được sử dụng trong nhiều nghiên cứu định lượng đồng thời palmatin và berberin [8-10], [7].

Sau các thí nghiệm bằng nhiều hệ dung môi pha động với các tỷ lệ khác nhau, hệ pha động tối ưu gồm ACN – dung dịch đệm (chứa 3,4 g kali dihydrophosphat và 1,7g natri laurylsulfat trong 1000mL hỗn hợp dung môi gồm nước – acetonitril (1:1) tỉ lệ 48:52. Hệ dung môi này có thành phần giống với hệ phân tách palmatin và berberin của dược liệu Hoàng liên công bố trong Dược điển Việt Nam nhưng tỷ lệ được điều chỉnh phù hợp với thực nghiệm cụ thể [3]. Với loại cột và hệ pha động này, thời gian lưu palmatin và berberin xuất hiện lần lượt ở khoảng 13,32 và 14,99 phút. Trong một số nghiên cứu được bố trí tương tự; khi hệ pha động là acid formic 0,05% - methanol, thu được berberin ra trước với thời gian lưu là 20,2 phút, sau đó palmatin xuất hiện ở khoảng 21,07 phút [2]; khi hệ pha động là ACN - 0,1 % trifluoroacetic thời gian lưu của palmatin và berberin thu được lần lượt khoảng 59 và 61 phút [8]. Như vậy, hệ pha động chọn lựa cho pic palmatin và berberin xuất hiện khá sớm trong các hệ pha động tham khảo.

V. KẾT LUẬN

Nghiên cứu đã sơ bộ khảo sát được điều kiện chiết mẫu cao bài thuốc là 80°C, tỷ lệ bột thuốc/dung môi nước 1/8, thời gian chiết 3 giờ, chiết 1 lần. Quy trình định lượng bằng HPLC/PDA sử dụng pha tĩnh là cột Zorbax Eclipse XDB-C18, pha động gồm ACN – dung dịch đệm (chứa 3,4 g kali dihydrophosphat và 1,7 g natri laurylsulfat trong 1000 mL hỗn hợp dung môi gồm nước – acetonitril (1:1)) tỉ lệ 48:52; bước sóng phân tích 346 nm, tốc độ dòng: 0,7 mL/phút; nhiệt độ cột 40°C; thể tích tiêm mẫu: 20 µL; đã được thẩm định đạt các tiêu chí về tính phù hợp hệ thống sắc ký, tính chọn lọc, khoảng nồng độ tuyến tính, độ chính xác, độ đúng và giới hạn phát hiện theo yêu cầu AOAC.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. AOAC Official Methods Of Analysis (2013), *AOAC Guidelines for Single-Laboratory Validation of Chemical Methods for Dietary Supplements and Botanicals*.
2. Beom-Geun Jo, Kyung-Hwa Kang and Min Hye Yang (2020), Development and Validation of a HPLC–PDA Method for the Simultaneous Determination of Berberine, Palmatine, Geniposide, and Paeoniflorin in Haedoksamul-tang, *Applied sciences*, 10, pp. 5482.
3. Bộ Y Tế (2018), *Dược điển Việt Nam V*, nhà xuất bản Y học.
4. Bùi Hồng Cường, Nguyễn Trần Linh, Lưu Công Bình (2020), Tối ưu hóa quy trình chiết xuất bào chế cao đặc phương thuốc Tiêu giao, *Tạp chí Nghiên cứu dược và thông tin thuốc*, 11 (1+2), tr. 23-28.

5. Bùi Hồng Cường, Nguyễn Trần Linh, Hoàng Mạnh Tuấn (2021), Tối ưu hóa quy trình chiết xuất để bào chế cao đặc phương thuốc Giáng chỉ, *Tạp chí Nghiên cứu dược và thông tin thuốc*, 12 (3), tr. 27-34.
6. Chang-Seob Seo and Hyeun-Kyoo Shin (2015), HPLC–PDA Method for Simultaneous Determination of Nine Marker Components in Banhasasim-Tang, *Journal of Chromatographic Science*, pp. 1–6.
7. Gill-Woong Jang, Sun-Il Choi, Xionggao Han, Xiao Men, Hee-Yeon Kwon, Ye-Eun Choi, Byung-Woo Park, Jeong-Jin Kim, Ok-Hwan Lee (2020), Development and Validation of Analytical Method and Antioxidant Effect for Berberine and Palmatine in *P. amurense*, *Journal of Food Hygiene and Safety*, 35 (6), pp. 544-551.
8. Jin Wang, Hai-rong Zeng, Guan-hua Lou, Chang-jiang Hu, Qin-wan Huang, Xiang-bo Yang (2019), Fingerprint and multi-component quantitative analyses for quality evaluation of Rhizoma coptidis steamed with rice wine, *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*; 18 (6), pp. 1297-1303.
9. Jin Wang, Lin Wang, Guan-Hua Lou, Hai-Rong Zeng, Ju Hu, Qin-Wan Huang, Wei Peng & Xiang-Bo Yang (2019), Coptidis Rhizoma: a comprehensive review of its traditional uses, botany, phytochemistry, pharmacology and toxicology, *Pharmaceutical Biology*, 57:1, pp. 193-225.
10. Lý Thời Trân (Biên dịch Lý Ngọc Đường) (2008), *Bản thảo cương mục*, Nhà xuất bản Y học, tr. 261.
11. Phạm Thanh Kỳ, Nguyễn Thị Phương Thảo, Trịnh Văn Lầu (2002), Nghiên cứu định tính và định lượng đồng thời berberin và palmatin trong dược liệu hoàng liên bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC), *Tạp chí Kiểm nghiệm*, 3, tr. 4-7.
12. Phạm Xuân Sinh (2000), *Phương pháp chế biến thuốc cổ truyền*, Nhà xuất bản y học, tr. 115-120.

(Ngày nhận bài: 14/1/2022 – Ngày duyệt đăng: 6/1/2022)
