ĐỊNH LƯỢNG ĐỒNG THỜI MƯỜI HOẠT CHẤT SINH HỌC TRONG ĐẠI HOÀNG BẰNG SẮC KÝ LỎNG HIỆU NĂNG CAO

Chử Văn Mến*; Nguyễn Văn Long*; Hoàng Văn Lương*;

Trịnh Nam Trung*; Vũ Bình Dương*

TÓM TẮT

Định lượng đồng thời 10 hoạt chất sinh học trong Đại hoàng bao gồm: piceatannol-3′-glucoside, sennoside B, rhaponticin, sennoside A, emodin-8-glucoside, ampelopsin B, deoxyrhaponticin, emodin, chrysophanol và physcion bằng phương pháp HPLC. Các hoạt chất này được xác định trên phổ UV và dữ liệu khối phổ đặc trưng; hàm lượng của các chất trong mẫu Đại hoàng được xác định bằng phương pháp HPLC. Tiến hành phân tách trên cột pha đảo C_{18} với chương trình gradient sử dụng dung môi A (dung dịch 0,05 M axít phosphoric trong nước) và dung môi B (acetonitrile), bước sóng phát hiện 280 nm, tốc độ dòng 1,0 ml/phút, chương trình rửa giải gồm: 0 phút, 4%B; 10 phút, 11%B; 25 phút, 13%B; 50 phút, 15%B; 70 phút; 20%B, 100 phút, 33%B; 115 phút, 60%B; 140 phút, 60%B cho kết quả tách tốt. Thẩm định phương pháp cho kết quả độ tuyến tính cao (R^2 > 0,9992). Giới hạn phát hiện trong khoảng từ 0,27 đến 1,80 µg/ml. Phương pháp trên được áp dụng cho 30 mẫu Đại hoàng gồm các loài khác nhau. Kết quả cho thấy hàm lượng hoạt chất biến động nhiều trong các mẫu Đại hoàng.

* Từ khóa: Đại hoàng; Hoạt chất sinh học; Sắc ký lỏng hiệu năng cao; Đánh giá chất lượng.

SIMULTANEOUS QUANTITATION OF TEN MARKER COMPOUNDS IN RHEI RHIZOMA BY HPLC

SUMMARY

A high performance liquid chromatographic method was developed to evaluate the quality of Rhei Rhizoma based on chromatographic fingerprints that characterize 10 pharmacological compounds: piceatannol-3'-glucoside, sennoside B, rhaponticin, sennoside A, emodin-8-glucoside, ampelopsin B, deoxyrhaponticin, emodin, chrysophanol and physcion. These compounds were identified by their characteristic UV profiles and mass spectroscopy data; their contents in Rhei Rhizoma samples were determined by HPLC. The chromatographic separation was performed on a C_{18} column by gradient elution with 0.05 M phosphoric acid in water and acetonitrile, the wavelength was set at 280 nm, the flow rate was set at 1 ml/min, gradient condition as followed: 0 min, 4% B; 10 min, 11%B; 25 min, 13%B; 50 min, 15%B; 70 min; 20%B, 100 min, 33%B; 115 min, 60%B; 140 min, 60%B gave the satisfied separation. The methodological validation gave acceptable linearities (R^2 > 0.9992). The limits of detection (LOD) of these compounds ranged from 0.27 to 1.80 µg/ml. The developed method was applied to the quantitation of 30 samples of different Rhei Rhizoma species. The results showed that the contents of bioactive compounds were fluctuated among samples.

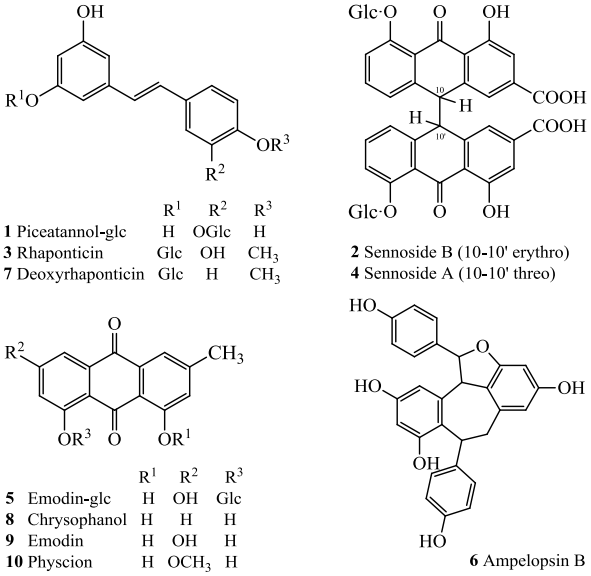
* *Key words: Rhei Rhizoma; Biological compounds; High performance liquid chromatographic; Quality evaluation.*

ĐẶT VẤN ĐỀ

Đại hoàng (Rhei Rhizoma) là một nhóm loài trong chi *Rheum,* thuộc họ rau Răm (Polygonaceae). Có ba loài của chi *Rheum* được chính thức công nhận trong Dược điển Việt Nam, Hàn Quốc và Trung Quốc, bao gồm: *R. tanguticum, R. palmatum* và *R. officinale* [1, 3, 4]. Theo Dược điển Nhật Bản, ngoài ba loài trên, người ta còn công nhận thêm *Rheum coreanum* và những loài lai giữa các loài trên là dược liệu Đại hoàng [5]. Ngoài ra, một số loài khác như *Rheum undulatum, Rheum rhaponticum, Rumex crispus, Rumex aquatica* và *Reynoutria elliptica* cũng thường bị sử dụng nhầm như là Đại hoàng. Một số nhà nghiên cứu

và thầy thuốc đông y thường bị nhầm lẫn khi sử dụng dược liệu Đại hoàng. Do vậy, việc đánh giá chất lượng Đại hoàng dựa trên thành phần hoạt chất đóng vai trò rất quan trọng trong kiểm soát chất lượng của dược liệu Đại hoàng.

Dược liệu Đại hoàng được biết đến với nhiều hoạt tính sinh học như nhuận tràng, lợi mật, bảo vệ gan, kháng virut, kháng viêm, chống ung thư...[6, 8]. Các chất đóng vai trò chính trong các dụng sinh học của Đại hoàng gồm anthraquinone như emodin, emodin-8-glucoside, chrysophanol, physcion [9], dianthrone như sennoside A, B [10] hay stilbene như rhaponticin, deoxyrhaponticin, piceatannol-3′-glucoside [11]. Nghiên cứu trước, chúng tôi đã tiến hành định lượng đồng thời 5 hoạt chất là các dẫn chất của anthraquinone [2], nghiên cứu này HPCL cao được ứng dụng để đánh giá chất lượng Đại hoàng dựa trên 10 hoạt chất sinh học là piceatannol-3′-glucoside, sennoside B, rhaponticin, sennoside A, emodin-8-glucoside, ampelopsin B, deoxyrhaponticin, emodin, chrysophanol và physcion *(Hình 1)*.



Hình 1: Cấu trúc hóa học của các hoạt chất chính trong Đại hoàng.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Hóa chất và thiết bị.

** Hóa chất và nguyên liệu:*

-Hóa chất: các chất chuẩn piceatannol-3′-glucoside, sennoside B, rhaponticin, sennoside A, emodin-8-glucoside, ampelopsin B, deoxyrhaponticin, emodin, chrysophanol và physcion do khoa Dược, Trường Đại học Chungnam, Hàn Quốc cung cấp. Độ tinh khiết được xác định bằng HPCL và khẳng định lại bằng sắc ký lỏng khối phổ; acetonitrile, methanol, nước cất, axít phosphoric đạt tiêu chuẩn tinh khiết cho HPCL, các hóa chất khác đạt tiêu chuẩn phân tích.

-Mẫu Đại hoàng được thu hái từ các vùng khác nhau của Trung Quốc và Hàn Quốc *(bảng 1)* thẩm định tại Khoa Y học Cổ truyền, Đại học Dongguk và lưu trữ tại Khoa Dược, Đại học Quốc gia Chungnam, Hàn Quốc.

** Thiết bị:*

- Máy HPLC Water, bao gồm bơm Water-510, detector Water-486, hệ thống tiêm mẫu tự động Water-717, bộ phận ổn nhiệt CTO (Waters, MA, U.S.A.). Thực hiện phân tích trên cột C_{18} (4,6 x 250 mm, 5 µm, Optimapak, RStech Corp, Hàn Quốc).

2. Phương pháp nghiên cứu.

** Điều kiện sắc ký:*

Cột phân tích pha đảo Optimapak C_{18} (250 x 4,6; 5 µm) của công ty RS Tech, Hàn Quốc; bước sóng phát hiện 280 nm; pha động: dung môi A: dung dịch axít phosphoric 0,05 M trong nước; dung môi B: acetonitrile; tốc độ dòng 1 ml/phút, thể tích tiêm 10 µl. Chương trình rửa giải: 0 phút, 4%B; 10 phút, 11%B; 25 phút, 13%B; 50 phút, 15%B; 70 phút; 20%B, 100 phút, 33%B; 115 phút, 60% B; 140 phút, 60%B.

** Chuẩn bị dung dịch chuẩn và thử:*

- Mẫu chuẩn: nồng độ khác nhau, thay đổi từ 9,61- 76,92 µg/ml đối với piceatannol-3′-glucoside, sennoside A, B và rhaponticin; 4,81 µg/ml đến 38,47 µg/ml đối với emodin-8-glucoside, ampelopsin B, deoxyrhaponticin, emodin, chrysophanol, physcion trong methanol.

- Mẫu thử: cân chính xác khoảng 100,0 mg bột dược liệu Đại hoàng, cho vào bình định mức 10 ml. Thêm ethanol 70% vừa đủ tới vạch, cân, lắc siêu âm 60 phút. Cân lại, bổ sung khối lượng mất bằng ethanol 70%, ly tâm, gạn lấy lớp trên, lọc qua màng lọc 0,45 µm.

Bảng 1: Danh mục mẫu sử dụng trong nghiên cứu.

Ký hiệu mẫu	Tên khoa học	Ký hiệu mẫu	Tên khoa học
09B1001	*R. tanguticum*	09B1016	*R. undulatum*
09B1002	*R. palmatum*	09B1017	*R. undulatum*
09B1003	*R. palmatum*	09B1018	*Rumex crispus*
09B1004	*R. palmatum*	09B1019	*Rumex crispus*
09B1005	*R. palmatum*	09B1020	*Reynoutria elliptica*
09B1006	*R. tanguticum*	09B1021	*R. palmatum*
09B1007	*R. tanguticum*	09B1022	*R. tanguticum*
09B1008	*R. tanguticum*	09B1023	*R. tanguticum*
09B1009	*R. officinale*	09B1024	*R. tanguticum*
09B1010	*R. officinale*	09B1025	*R. tanguticum*
09B1011	*R. officinale*	09B1026	*R. tanguticum*
09B1012	*R. officinale*	09B1027	*R. tanguticum*
09B1013	*R. palmatum*	09B1028	*R. palmatum*
09B1014	*R. undulatum*	09B1029	*R. officinale*
09B1015	*R. undulatum*	09B1030	*R. undulatum*

KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ BÀN LUẬN

Với điều kiện sắc ký và phương pháp xử lý mẫu đã lựa chọn, sắc ký đồ thu được cho các pic tách rõ ràng. Nhiễu nền thấp thể hiện qua sắc ký đồ của mẫu thử Đại hoàng và hỗn hợp chuẩn. Trên sắc ký đồ, mẫu thử có thời gian lưu trùng với thời gian lưu của pic piceatannol-3′-glucoside, sennoside B, rhaponticin, sennoside A, emodin-8-glucoside, ampelopsin B,

deoxyrhaponticin, emodin, chrysophanol và physcion trong sắc ký đồ của mẫu chuẩn lần lượt là 49,41; 66,26; 70,80; 78,25; 84,49; 94,53; 98,26; 124,21; 137,21 và 146,53 phút *(hình 2)*. Tại thời gian lưu của piceatannol-3′-glucoside, sennoside B, rhaponticin, sennoside A, emodin-glucoside, ampelopsin B, deoxyrhaponticin, emodin, chrysophanol và physcion trên các sắc đồ mẫu thử và mẫu chuẩn, chúng tôi so sánh phổ hấp thụ UV thu được của pic. Kết quả cho thấy: phổ mẫu thử và mẫu chuẩn trùng khít lên nhau với hệ số phù hợp lần lượt là 0,9997; 0,9996; 0,9998; 0,9992; 0.9999; 0,9996; 0,9997; 0,9995; 0,9994 và 0,9994. Điều này chứng tỏ: pic thu được trên sắc ký đồ của mẫu thử tinh khiết và các thành phần khác có trong mẫu thử không ảnh hưởng đến quá trình phân tích 10 chất đối chiếu piceatannol-3′-glucoside, sennoside B, rhaponticin, sennoside A, emodin-8-glucoside, ampelopsin B, deoxyrhaponticin, emodin, chrysophanol và physcion. Kết quả trên cho phép tiến hành định tính, định lượng các chất này trong Đại hoàng bằng HPLC.

** Tính thích hợp của hệ thống sắc ký:*

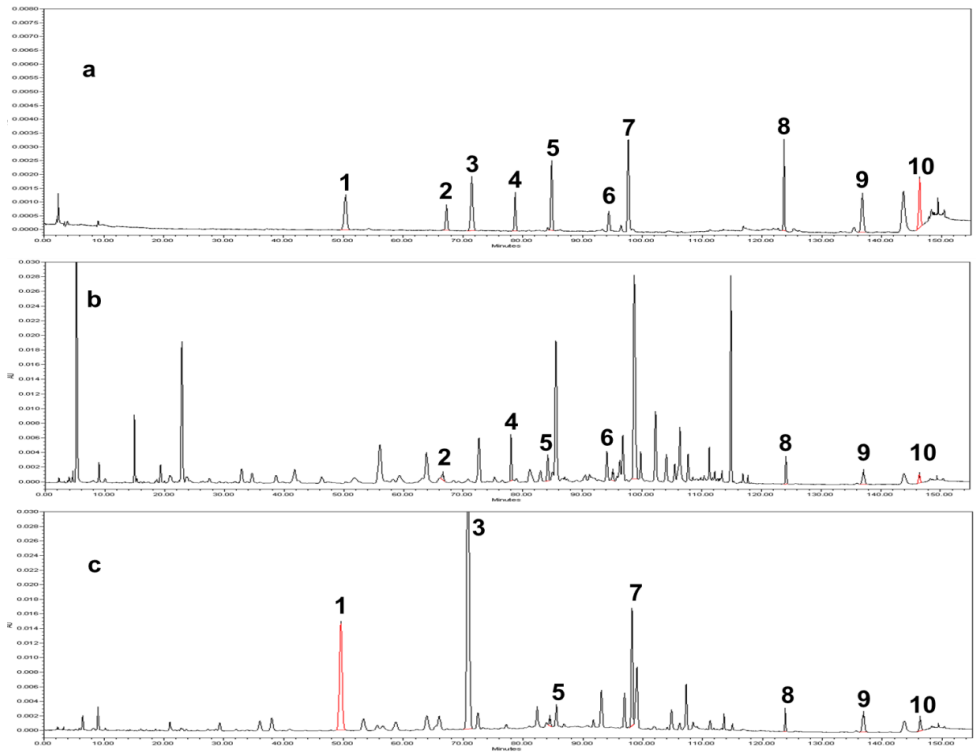
Để đánh giá tính thích hợp của hệ thống sắc ký, pha mẫu chuẩn. Tiêm 6 lần mẫu chuẩn vào hệ thống HPLC, tiến hành sắc ký với điều kiện đã chọn.

Bảng 2: Kết quả khảo sát tính thích hợp của hệ thống.

Hoạt chất	RSD của thời gian lưu	RSD của diện tích pic	Số đĩa lý thuyết trung bình (n)	Hệ số bất đối trung bình (T)
Piceatannol-glc	0,11	0,12	22320	1,11
SennosideB	0,13	0,14	23230	1,05
Rhaponticin	0,12	0,15	24550	1,10
Sennoside A	0,14	0,21	34660	1,07
Emodin-glc	0,16	0,20	35140	1,04
Ampelopsin B	0,15	0,14	32340	1,12
Deoxyrhaponticin	0,14	0,11	43260	1,07
Emodin	0,16	0,17	44580	1,14
Chrysophanol	0,18	0,21	44620	1,08
Physcion	0,19	0,23	45146	1,06

Các điều kiện sắc ký đã lựa chọn và hệ thống HPLC sử dụng phù hợp và đảm bảo ổn định của phép phân tích định lượng các hoạt chất trên.

mV



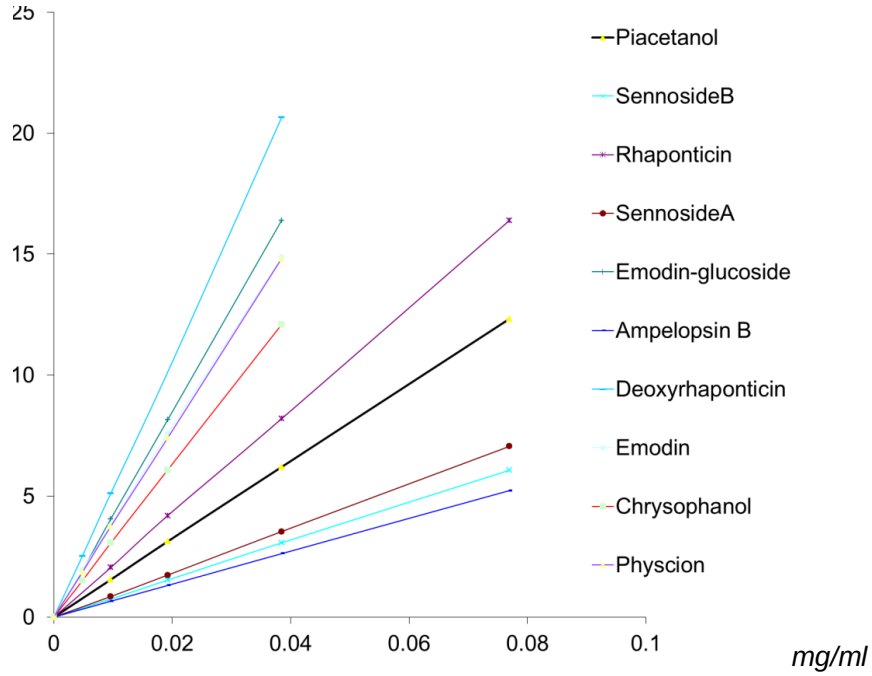
phút

Hình 2: Sắc ký đồ của hỗn hợp chuẩn (a) và mẫu Đại hoàng (b,c); **1**: piceatannol-3′-glucoside, **2**: sennoside B, **3**: rhaponticin, **4**: sennoside A, **5**: emodin-8-glucoside, **6**: ampelopsin B, **7**: deoxyrhaponticin, **8**: emodin, **9**: chrysophanol, **10**: physcion.

** Khoảng tuyến tính, giới hạn phát hiện và giới hạn định lượng:*

Pha 4 dung dịch mẫu chuẩn có nồng độ khác nhau (từ 9,61 - 76,92 µg/ml đối với piceatannol-3′-glucoside, sennoside A, B và rhaponticin; 4,81 - 38,47 µg/ml đối với emodin-8-glucoside, ampelopsin B, deoxyrhaponticin, emodin, chrysophanol, physcion). Tiến hành sắc ký như điều kiện đã mô tả.

A



Hình 3: Đường chuẩn của các chất định lượng.

Bảng 2: Kết quả khảo sát khoảng tuyến tính, giới hiện phát hiện, giới hạn định lượng.

Chất chuẩn	Nồng độ (µl/ml)	Phương trình hồi quy	R	LOD (□g/ml)	LOQ (□g /ml)
Piceatannol-glc	9,61-76,92	Y = 1603,389X - 0,117	0,9 992	0,83	2,94
Sennoside B	9,61-76,93	Y = 790,571X - 0,028	0,9 994	1,80	6,07
Rhaponticin	9,61-76,95	Y = 2130,575X - 0,153	0,9 995	0,61	2,19
Sennoside A	9,61-76,94	Y = 918,239X + 0,085	0,9 997	1,67	5,35
Emodin-glc	4,81-38,47	Y = 4266,421X + 0,335	0,9 993	0,42	1,21
Ampelopsin B	4,81-38,47	Y = 1359,937X – 0,019	1,0 000	1,05	3,54
Deoxyrhaponticin	4,81-38,47	Y = 5357,460X + 0,306	0,9 998	0,33	0,96
Emodin	4,81-38,47	Y = 3872,976X – 0,407	0,9 999	0,27	1,14
Chrysophanol	4,81-38,47	Y = 3146,946X – 0,076	0,9 996	0,44	1,51
Physcion	4,81-38,47	Y = 3852,418X – 0,068	0,9 999	0,36	1,24

Kết quả khảo sát cho thấy: với khoảng nồng độ của piceatannol-3′-glucoside, sennoside A, B và rhaponticin từ 9,61 - 76,92 µg/ml, emodin-8-glucoside, ampelopsin B, deoxyrhaponticin, emodin, chrysophanol, physcion từ 4,81 - 38,47 µg/ml, có tương quan tuyến tính giữa nồng độ và diện tích pic (A) tương ứng.

Từ phương trình tuyến tính của các chất định lượng: piceatannol-3′-glucoside, sennoside B, rhaponticin, sennoside A, emodin-8-glucoside, ampelopsin B, deoxyrhaponticin, emodin, chrysophanol và physcion cho phép xác định giới hạn phát hiện của các chất lần lượt là 0,83;

1,80; 0,61; 1,67; 0,42; 1,05; 0,33; 0,27; 0,44 và 0,36 µg/ml. Giới hạn định lượng của từng chất tương ứng lần lượt là 2,94; 6,07; 2,19; 5,35; 1,21; 3,54; 0,96; 1,14; 1,51 và 1,24 µg/ml.

** Kết quả phân tích định lượng các hoạt chất trong mẫu dược liệu Đại hoàng:*

Bảng 3: Kết quả phân tích hàm lượng hoạt chất trong các mẫu Đại hoàng.

N$_0$	Hàm lượng (mg/g)									
	1	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**9**	**10**
1001	0	0,82	0	15,64	1,56	0,90	0	0,85	0,71	0,14
1002	0	0,23	0	1,83	0,24	0,53	0	1,91	1,88	0,48
1003	0	0,19	0	0,44	0	0,01	0	0,85	0,43	0
1004	0	0,19	0	0,53	0,22	0,20	0	0,92	0,56	0
1005	0	0,14	0	0,22	0,11	0,20	0	1,69	1,10	0,11
1006	0	0,60	0	2,83	0,20	0,17	0	0,10	0,01	0
1007	0	1,32	0	15,45	0,53	0,52	0	0,79	0,65	0,22
1008	0	1,09	0	6,44	0,24	0,45	0	0,88	0,58	0
1009	0	1,48	0	5,85	0,75	1,01	0	0,10	0,76	0,34
1010	0	1,87	0	9,05	0,75	0,19	0	0,45	0,35	0,06
1011	0	1,19	0	10,31	0,58	0,07	0	0,63	0,26	0,06
1012	0	0,46	0	6,04	0,59	0,37	0	0,66	1,78	0,45
1013	0	1,33	0	3,72	0,21	0,03	0	0,68	0,57	0,01
1014	22,83	0	30,83	0	0,89	0,01	1,39	0,72	1,73	0,60
1015	43,13	0	35,33	0	1,33	0,42	1,52	0,05	0,16	0
1016	13,85	0	9,98	0	0,63	0,11	0,30	0,17	0,44	0,09
1017	63,47	0	43,20	0	1,26	0,25	2,10	0,27	0,83	0,13
1018	0	0	0	0	0	1,02	0	0,74	0,87	0,23
1019	0	0	0	0	0	0,25	0	1,31	1,62	0,60
1020	16,49	0	0	0	0	0	0	2,33	0	0,29
1021	0	1,47	0	2,12	0,13	0,87	0	0,18	0,07	0
1022	0	0,78	0	0,42	0,22	0,22	0	0,10	0,01	0
1	0	0	0	1,	0	0	0	0	0	0

023		,12		28	,45	,05		,06	,05	
1024	0	0,05	0	1,37	0,18	0,11	0	0,04	0,02	0
1025	0	0,11	0	0,09	0,04	2,06	0	1,88	1,92	0,48
1026	0	0,25	0	0,82	0,28	0,53	0	0	0	0
1027	0	1,09	0	14,71	1,25	2,82	0	0,05	0,08	0,04
1028	0	0,31	0	2,43	0,05	0,48	0	0,02	0	0
1029	0	0,67	0	3,43	0,38	0,38	0	0	0,11	0
1030	72,99	0,82	50,63	0	1,42	0	4,57	0,25	1,10	0,22

Ghi chú: **1**: piceatannol-3′-glucoside, **2**: sennoside B, **3**: rhaponticin, **4**: sennoside A, **5**: emodin-8-glucoside, **6**: ampelopsin B, **7**: deoxyrhaponticin, **8**: emodin, **9**: chrysophanol, **10**: physcion.

Hàm lượng cao nhất của piceatannol-3′-glucoside, sennoside B, rhaponticin, sennoside A, emodin-8-glucoside, ampelopsin B, deoxyrhaponticin, emodin, chrysophanol và physcion lần lượt là 72,99; 1,87; 50,63; 15,64; 1,56; 2,82; 4,57; 2,33; 1,92 và 0,60 mg/g trong dược liệu khô. Sennoside A, B chỉ phát hiện được trong các mẫu Đại hoàng thật, gồm có 3 loài *R. tanguticum, R. palamtum and R. Officinale*. Rhaponticin chỉ phát hiện được trong mẫu *R. undulatum*. Hàm lượng hoạt chất chính trong các mẫu Đại hoàng biến động nhiều trong tất cả các mẫu.

KẾT LUẬN

Phương pháp HPCL đơn giản, hiệu quả, được ứng dụng để định lượng đồng thời 10 hoạt chất trong dược liệu Đại hoàng. Kết quả định lượng các mẫu Đại hoàng cho thấy hàm lượng hoạt chất biến đổi nhiều trong các mẫu.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Dược điển Việt Nam IV. 2010.

2. Chử Văn Mến, Trương Ngọc Dương, Nguyễn Văn Long, Hoàng Văn Lương, Trịnh Nam Trung, Jong Seong Kang. Thẩm định các loài đại hoàng bằng định lượng đồng thời các hoạt chất sinh học và phân tích tổng thể sắc đồ. Tạp chí Y-Dược học Quân sự. 2011, số 4, tr.12-19.

3. Pharmacopoeia of the People's Republic of China. 2005.

4. Korean Pharmacopoeia. 2007.

5. The Japanese Pharmacopoeia. 2001.

6*. Li Z, Li L.J, Sun Y, Li J*. Identification of natural compounds with anti-hepatitis B virus activity from *Rheum palmatum* L. ethanol extract, Chemotherapy. 53, pp.320-6.

7*. Chang C.H, Lin C.C, Yang J.J, Namba T., Hattori M*. Anti-inflammatory effects of emodin from *Ventilago leiocarpa*. The American journal of Chinese medicine. 1996, 24, pp.139-42.

8. Kang S.C., Lee C.M., Choung E.S., Bak J.P., Bae J.J., Yoo H.S., Kwak J.H., Zee O.P. Anti-proliferative effects of estrogen receptor modulating compounds isolated from *Rheum palmatum,* Archives pharmaceutical researches. 2008, 31, pp.722-6.

9. Kashiwada, Y, Nonaka, G.I, Nishioka, I. Studies on Rhubarb (Rhei Rhizoma). XV. Simultaneous determination of phenolic constituents by high-performance liquid chromatography, Chemical & Pharmaceutical Bulletin. 1989, 37, pp.999-1004.

10. Komatsu K, Nagayama Y, Tanaka K, Ling Y, Cai S.., Omote T, Meselhy M.R, 2006. Comparative study of chemical constituents of Rhubarb from different origins, Chemical & Pharmaceutical Bulletin .54, pp.1491-1499.