

DEVELOPING A METHOD FOR QUANTIFYING SILYBIN IN BG-PT HERBAL EXTRACTS USING HIGH-PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY

Pham Quoc Tuan¹, Nguyen Thi Minh Diep¹, Ha Thi Tam Tien², Pham Thanh Loan^{2*}

¹Centre for Drug Research and Technology Transfer - Phu Tho College of Medicine and Pharmacy

²Institute of Applied Research and Development - Hung Vuong University

ARTICLE INFO

ABSTRACT

Received:

10/3/2025

The BG-PT dry herbal extract is prepared from the seed of *Silybum marianum* and six other medicinal materials, including *Adenosma caeruleum*, *Lactuca indica*, *Chrysanthemum indicum*, *Cynara scolymus*, *Glycyrrhiza* sp., and *Lonicera japonica*. The active ingredient silybin is a mixture of silybin A and silybin B, the main component with high biological activity in the seed of *S. marianum*. Silybin was selected as the marker to perform the quantitative method by High Performance Liquid Chromatography in the BG-PT dry extract. The technique was performed on an Agilent C18 column (250×4.6 mm; $5 \mu\text{m}$), with the mobile phase being a mixture of solvent A (MeOH: water: phosphoric acid = 80:20:0.5, wt/wt/wt) and solvent B (MeOH: water: phosphoric acid = 20:80:0.5, wt/wt/wt) running in gradient elution mode. The injection volume was $10 \mu\text{l}$, and the flow rate was 1 ml/min . The substance was detected at 288 nm . The developed method was validated according to the International Council for Harmonisation and Association of Official Analytical Collaboration International guidelines. The results showed that the process had good system compatibility, specificity, and repeatability, a very close linear correlation ($R^2 = 0.9997$), high recovery (98.2%) and was suitable for quantifying silybin in dry extract. We applied the developed method to determine the silybin content in three lots of tested BG-PT dry extract. This quantitative method can evaluate the silybin content in dosage forms containing BG-PT dry extract.

KEYWORDS

BG-PT dry herbal extract
Silybum marianum
 Quantification
 High Performance Liquid Chromatography
 Silybin

XÂY DỰNG PHƯƠNG PHÁP ĐỊNH LƯỢNG SILYBIN TRONG CAO KHÔ DƯỢC LIỆU BG-PT BẰNG HỆ THỐNG SẮC KÝ LỎNG HIỆU NĂNG CAO

Phạm Quốc Tuấn¹, Nguyễn Thị Minh Diệp¹, Hà Thị Tâm Tiên², Phạm Thành Loan^{2*}

¹Trung tâm Nghiên cứu và Chuyên giao công nghệ Dược - Trường Cao đẳng Y Dược Phú Thọ

²Viện Nghiên cứu Ứng dụng và Phát triển - Trường Đại học Hùng Vương

THÔNG TIN BÀI BÁO

TÓM TẮT

Ngày nhận bài:

10/3/2025

Cao khô dược liệu BG-PT được bào chế từ quả Cúc gai và sáu dược liệu khác bao gồm Nhân trần, Bò công anh, Cúc hoa vàng, Actiso, Cam thảo, Kim ngân hoa. Hoạt chất silybin là một hỗn hợp của silybin A và silybin B, là thành phần chính có hoạt tính sinh học cao trong quả Cúc gai. Để thực hiện phương pháp định lượng bằng sắc ký lỏng hiệu suất cao trong cao khô BG-PT, silybin được lựa chọn làm chất marker. Phương pháp thực hiện trên cột Agilent C18 ($250 \times 4,6$ mm; $5 \mu\text{m}$) với pha động là hỗn hợp dung môi A (MeOH: nước: acid phosphoric = 80:20:0.5, tt/tt/tt) và dung môi B (MeOH: nước: acid phosphoric = 20:80:0.5, tt/tt/tt) chạy theo chế độ rửa giải gradient. Thể tích tiêm $10 \mu\text{l}$ và tốc độ dòng 1 ml/min . Chất phát hiện ở bước sóng 288 nm . Phương pháp xây dựng được thẩm định theo hướng dẫn của Hội đồng quốc tế về hài hòa các yêu cầu kỹ thuật cho dược phẩm dùng cho người và Hiệp hội hợp tác phân tích quốc tế. Kết quả cho thấy phương pháp có tính tương thích hệ thống, độ đặc hiệu và độ lặp lại tốt, tương quan tuyến tính rất chặt ($R^2 = 0,9997$), độ thu hồi cao (98.2%) thích hợp để định lượng silybin trong cao khô. Phương pháp đã xây dựng được ứng dụng trong xác định hàm lượng silybin trong ba lô cao khô BG-PT thử nghiệm. Có thể sử dụng phương pháp định lượng này để xác định hàm lượng silybin trong các dạng bào chế chưa cao khô BG-PT.

TỪ KHÓA

Cao khô dược liệu BG-PT
 Cúc gai
 Định lượng
 Sắc ký lỏng hiệu suất cao
 Silybin

DOI: <https://doi.org/10.34238/tnu-jst.12257>

* Corresponding author. Email: Loandhhv@gmail.com

1. Giới thiệu

Bài thuốc nhóm thuốc thanh nhiệt, giải độc, tiêu ban, lợi thủy (bài số 38) gồm 06 dược liệu: Nhân trần, Bồ công anh, Cúc hoa, Actiso, Cam thảo, Kim ngân hoa được Bộ Y tế công nhận theo Thông tư số 13/VBHN-BYT ngày 15/10/2021 và được sử dụng nhiều trong các bệnh viện, nhà thuốc để dùng điều trị bệnh về gan, mật [1]. Dược liệu hạt cây Cúc gai (*Silybum marianum*) có tác dụng trị viêm gan, viêm túi mật, bệnh đau gan, vàng da [2]. Thành phần hóa học chính của hạt Cúc gai là flavonoid, trong đó silymarin là hỗn hợp các flavonolignan như silychristin, silydianin, silybin (A, B), isosilybin (A, B), dehydrosilybin chiếm từ 1,5 - 3,0% tính theo dược liệu đã sấy khô [2], [3]. Silybin gồm silybin A và một đồng phân trans không đổi quang là silybin B, là thành phần chính có hoạt tính sinh học của silymarin, chiếm 60 - 70% [4]. Các nghiên cứu về tác dụng sinh học chỉ ra rằng silymarin, silybin có tác dụng bảo vệ gan [5], chống oxy hóa mạnh [6]; chống viêm, chống ung thư, ức chế các yếu tố đông máu [7]. Do vậy dược liệu hạt Cúc gai được lựa chọn bổ sung cho bài thuốc trên nhằm nâng cao hiệu quả tác dụng giải độc gan của sản phẩm BG-PT.

Để phát triển các bài thuốc y học cổ truyền và hiện đại hóa dạng bào chế, nhóm nghiên cứu đã bào chế dạng cao khô BG-PT từ 07 dược liệu: hạt Cúc gai (*S. marianum*), Nhân trần (*Adenosma caeruleum*), Bồ công anh (*Lactuca indica*), Actiso (*Cynara scolymus*), Kim ngân hoa (*Lonicera japonica*), Cúc hoa (*Chrysanthemum indicum*), Cam thảo (*Glycyrrhiza sp.*), tạo sản phẩm viên nang cứng. Để làm căn cứ đánh giá chất lượng sản phẩm thuốc hoặc thực phẩm bảo vệ sức khỏe có chứa Cúc gai hoặc silymarin, nhiều nghiên cứu đã lựa chọn hoạt chất silybin làm chất đánh dấu trong định lượng bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) [8], [9]. Nghiên cứu này nhằm xây dựng phương pháp định lượng silybin trong cao khô BG-PT bằng phương pháp HPLC, làm cơ sở đánh giá chất lượng sản phẩm bào chế.

2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Vật liệu, thiết bị nghiên cứu

* Vật liệu nghiên cứu:

Cao khô dược liệu BG-PT (03 lô: CK01, CK02, CK03) được bào chế bằng công nghệ phun sấy từ cao lỏng của 07 dược liệu: hạt Cúc gai 2000 mg, Nhân trần 1000 mg, Bồ công anh 670 mg, Actiso 670 mg, Kim ngân hoa 340 mg, Cúc hoa 340 mg, Cam thảo 125 mg; các dược liệu đạt tiêu chuẩn Dược điển Việt Nam V (ĐDVN V) [2]; và các tá dược: aerosil, maltodextrin đạt tiêu chuẩn USP 42-NF 37. Cao khô BG-PT được đóng trong viên nang cứng trọng lượng 500 mg có tác dụng hỗ trợ bảo vệ gan, chứa 450 mg cao khô/viên. Quy trình bào chế như sau:

- Bước 1: Chiết xuất dược liệu

+ Chiết xuất hạt Cúc gai: Bột Cúc gai (≤ 1 mm) được loại dầu béo bằng dung môi *n*-hexane tỷ lệ 1:10 trong 24 giờ, lọc lấy bã cúc gai. Chiết lần 1: tỷ lệ ethanol 65%/Cúc gai = 10/1, chiết hồi lưu trong 3 giờ ở 70°C - 75°C; thu dịch chiết lần 1. Chiết lần 2: tỷ lệ ethanol 65%/Cúc gai = 7/1, chiết hồi lưu trong 3 giờ ở 70°C - 75°C; thu dịch chiết lần 2. Gộp dịch chiết lần 1 và lần 2.

+ Chiết tinh dầu Nhân trần bằng phương pháp cát kéo hơi nước: gia nhiệt khoảng 70-75°C (trong 1,0 giờ); tiếp theo tăng nhiệt độ lên 80-85°C (trong 2,5 giờ) để thu hồi tinh dầu; cuối cùng tăng nhiệt độ lên 90-95°C (trong 0,5 giờ) để thu hồi hết tinh dầu còn lại; loại bỏ nước để thu tinh dầu; bã Nhân trần sau đó phơi trộn với các dược liệu khác (Bồ công anh, Actiso, Kim ngân hoa, Cúc hoa, Cam thảo) cho vào nồi chiết. Chiết lần 1: tỉ lệ dược liệu/nước = 1/10; cấp hơi nóng vào thùng sôi liên tục trong 3 giờ (100°C). Rút dịch chiết vào bồn chưng. Chiết lần 2: tương tự như lần 1. Gộp dịch chiết hạt Cúc gai và dịch chiết các dược liệu khác, lọc qua máy lọc ly tâm, rút dịch chiết vào bồn chưng.

- Bước 2: Cố đặc dịch chiết bằng hệ thống cô áp suất giảm, đến khi tỷ trọng đạt 1,07-1,09. Lọc dịch qua lõi lọc tinh thu được cao lỏng. Bổ sung tinh dầu Nhân trần; tá dược maltodextrin (MD) và aerosil (AE) theo tỷ lệ MD/AE=40/60, hàm lượng bổ sung so với chất rắn trong cao là 40%.

- Bước 3: Phun sấy tạo cao khô: Bơm cao lỏng sang hệ thống phun sấy AH-LPG-50, tốc độ bơm dịch: 6-8Hz; tốc độ phun dịch: 40 Hz; nhiệt độ khí thổi đầu vào: $160^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$; nhiệt độ khí thổi ra: $80^{\circ}\text{C}-90^{\circ}\text{C}$; áp lực súng phun: 0,5 Mpa. Cao khô tạo ra dạng bột tơi mịn, màu nâu đậm.

* Thiết bị, hóa chất sử dụng:

Hệ thống sắc ký lỏng hiệu năng cao HPLC Ultimate 3000 - Dionex (Thermo Scientific, Hoa Kỳ) với đầu dò DAD, cột sắc ký Agilent C18 (250 x 4,6 mm; 5 μm); cân phân tích AUW220D (Shimadzu, Nhật Bản); bể chiết siêu âm D-78224 (Đức) và các bình định mức, pipet, micropipet.

Các dung môi, hóa chất: methanol (MeOH) của hãng Merck KGaA (Đức), dùng cho HPLC; acid phosphoric (hãng Xilong, Trung Quốc); nước cất hai lần. Chất chuẩn: silybin (hỗn hợp silybin A và B) có độ tinh khiết 98,0% (hãng ChemFaces, Trung Quốc).

2.2. Thời gian và địa điểm nghiên cứu

- Thời gian nghiên cứu: Từ tháng 10/2023 đến tháng 5/2024.
- Địa điểm nghiên cứu: Trung tâm Nghiên cứu và Chuyển giao công nghệ Dược; Công ty cổ phần dược liệu Việt Nam; Trung tâm kiểm nghiệm thuốc, mỹ phẩm, thực phẩm Vĩnh Phúc.

2.3. Phương pháp nghiên cứu

2.3.1. Phương pháp phân tích

Tham khảo các tài liệu [2], [8], [9] và dựa vào trang thiết bị hiện có của phòng thí nghiệm, chúng tôi lựa chọn các điều kiện sắc ký để khảo sát như sau: Cột sắc ký Agilent C18 ($250 \times 4,6$ mm; 5 μm). Pha động: Dung môi A: MeOH: nước: acid phosphoric = 80:20:0,5 (tt/tt/tt); dung môi B: MeOH: nước: acid phosphoric = 20:80:0,5 (tt/tt/tt). Nhiệt độ lò cột: nhiệt độ phòng; thể tích tiêm: 10 μl ; bước sóng phát hiện: 288 nm. Khảo sát tỷ lệ dung môi, tốc độ pha động.

2.3.2. Chuẩn bị mẫu

Silybin là một flavonolignan có tính phân cực vừa phải nhờ các nhóm hydroxyl và vòng thom. Methanol có chỉ số phân cực 5,1 hòa tan tốt silybin tạo điều kiện chiết xuất và phân tích hiệu quả. Acetonitrile (ACN) có độ phân cực 5,8 hòa tan tốt nhưng độ rửa giải cao, làm silybin rửa giải quá nhanh, giảm độ phân giải. Ethanol (EtOH) có độ phân cực 4,3 hòa tan kém hơn MeOH, độ nhớt cao, không tối ưu cho HPLC. Đồng thời, silybin được phát hiện ở bước sóng 288 nm bằng detector UV trong HPLC. MeOH có ngưỡng hấp thụ UV thấp (205 nm), không gây nhiễu tín hiệu ở vùng này, đảm bảo độ nhạy và độ chính xác. ACN có ngưỡng hấp thụ UV 190 nm, tương thích tốt nhưng chi phí cao hơn. Acetone có ngưỡng hấp thụ UV 330 nm, che khuất tín hiệu 288 nm, không phù hợp. EtOH có ngưỡng hấp thụ UV 210 nm, khả thi nhưng độ tinh khiết thấp hơn MeOH, dễ gây nhiễu nền [8]-[11]. Do đó, dung môi MeOH được lựa chọn trong phân tích silybin bằng HPLC.

Dung dịch chuẩn gốc: Cân chính xác khoảng 10 mg chuẩn silybin, hòa tan trong MeOH trong bình định mức 100 ml, bổ sung MeOH đến thể tích vừa đủ và lắc kỹ được dung dịch gốc có nồng độ chính xác 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Từ dung dịch này pha loãng thành dây dung dịch chuẩn có nồng độ lần lượt là 5, 10, 50, 100, 200 và 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Lọc dung dịch qua màng lọc kích thước lỗ lọc 0,45 μm trước khi tiêm mẫu vào hệ thống sắc ký.

Dung dịch thử: Mẫu thử là bột cao khô BG-PT được bào chê theo phương pháp trình bày tại mục 2.1. Mẫu thử được chuẩn bị tương tự như mẫu chuẩn với lượng bột tương ứng với 10 mg chuẩn silybin.

Mẫu trắng: Methanol.

2.3.3. Thẩm định phương pháp

Quy trình thẩm định phương pháp định lượng được tiến hành theo hướng dẫn của ICH (International Council for Harmonisation), AOAC (Association of Official Analytical

Collaboration International) [12], [13] gồm các yếu tố sau:

- Độ thích hợp của hệ thống: Tiêm mẫu chuẩn có nồng độ 100 µg/ml lặp lại 6 lần qua hệ thống sắc ký theo chương trình đã chọn. Ghi lại các sắc ký đồ và xác định giá trị thời gian lưu (t_R), diện tích pic trung bình (S_{pic}). Giá trị RSD của thời gian lưu và diện tích pic phải $\leq 2,0\%$.

- Độ đặc hiệu: Tiêm mẫu chuẩn, mẫu thử và mẫu trắng vào hệ thống sắc ký theo chương trình đã lựa chọn. Yêu cầu pic của silybin được nhận diện rõ trên sắc ký đồ của mẫu chuẩn, mẫu thử và không xuất hiện pic lạ tại thời điểm trùng với t_R của silybin trên sắc ký đồ của mẫu trắng.

- Độ lặp: Sắc ký 6 lần đối với dung dịch thử. Giá trị RSD $\leq 2\%$ thì quy trình có độ lặp tốt.

- Tương quan tuyến tính: Từ dung dịch chuẩn 1000 µg/ml tiến hành pha 5 mẫu có nồng độ 5, 10, 50, 100, 200 và 500 µg/ml rồi tiến hành phân tích HPLC. Khảo sát sự tương quan của S_{pic} với nồng độ silybin theo hàm $Y = aX + b$ bằng phương pháp bình phương tối thiểu. Nếu hệ số tương quan $R^2 \geq 0,999$ thì quy trình định lượng có độ tuyến tính tốt.

- Độ chính xác: Tiến hành định lượng 6 mẫu thử độc lập. Xác định hàm lượng silybin có trong các mẫu thử theo phương trình hồi quy tuyến tính. Độ chính xác được xác định bằng giá trị RSD (%) kết quả định lượng hàm lượng hoạt chất có trong cao khô BG-PT. Yêu cầu RSD $\leq 2,0\%$.

- Độ đúng: Nghiên cứu sử dụng dung dịch thử làm dung dịch không thêm chuẩn. Dung dịch thêm chuẩn được tạo ra bằng việc lấy dung dịch thử và thêm một lượng silybin chuẩn ở các nồng độ 160, 200 và 240 µg/ml vào mẫu thử. Mỗi mức thêm chuẩn lặp lại 3 lần. Tiến hành sắc ký 9 dung dịch thử thêm chuẩn. Yêu cầu hiệu suất thu hồi nằm trong khoảng 98,0 - 102,0%.

- Giới hạn phát hiện (LOD) và giới hạn định lượng (LOQ): Dung dịch thử được pha loãng thành các mẫu LOD₁, LOD₂, LOD₃,... Lần lượt tiêm 10 µl từng mẫu vào hệ thống HPLC. Xác định tỷ lệ S/N (Signal to Noise ratio), S là chiều cao tín hiệu của chất silybin, N là nhiễu đường nền. LOD được chấp nhận tại nồng độ có S/N=3. LOQ được chấp nhận tại nồng độ có S/N=10.

2.3.4. Xử lý số liệu

- Mỗi mẫu nghiên cứu được làm lặp lại 3 lần. Kết quả được xử lý thông kê bằng phần mềm Microsoft Excel.

- Hàm lượng của silybin trong cao khô được tính theo công thức: $H = \frac{C \times V \times 10^{-3}}{m}$.

Trong đó:

H: hàm lượng của silybin trong cao khô được liệu (mg/g);

C: nồng độ của silybin có trong dung dịch mẫu thử (µg/ml) được tính từ đường chuẩn;

V: thể tích pha mẫu thử (ml);

m: khối lượng cao khô được liệu (g).

3. Kết quả và bàn luận

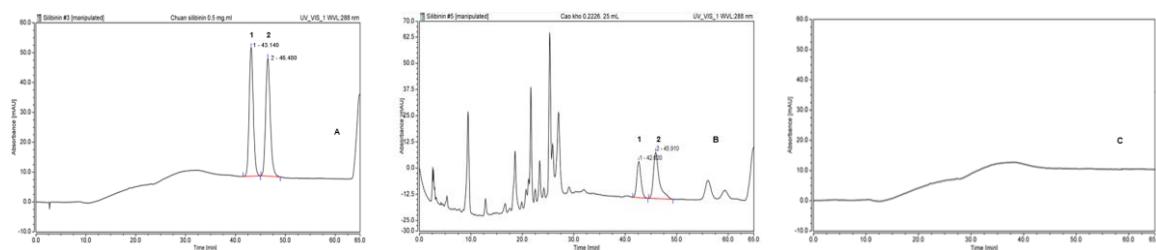
3.1. Lựa chọn điều kiện sắc ký

Sau khi tiến hành khảo sát điều kiện sắc ký như Mục 2.3.1, kết quả lựa chọn được chương trình sắc ký tại Bảng 1.

Bảng 1. Kết quả lựa chọn chương trình sắc ký

Thời gian (min)	Dung môi A (% tt/tt)	Dung môi B (% tt/tt)
0-6	85	15
6-20	85 → 55	15 → 45
20-60	55	45
60-65	55→85	45 → 15

Ở điều kiện trên, silybin A, B được tách khỏi nhau và tách khỏi các chất khác trong cao khô BG-PT, các pic cân đối, gọn. Tham khảo Chuyên luận Cúc gai trong DĐVN V [2] cho thấy silybin A (1) tách trước silybin B (2); do đó thời gian lưu (t_R) của silybin A, B trên sắc ký đồ tương ứng là khoảng 43,1 min và 46,4 min. Trên mẫu trắng không có pic tín hiệu silybin A, B (Hình 1).



Hình 1. Sắc ký đồ HPLC của các dung dịch: chuẩn (A); thử (B); mẫu trắng (C)

3.2. Thẩm định phương pháp định lượng

3.2.1. Tính thích hợp của hệ thống

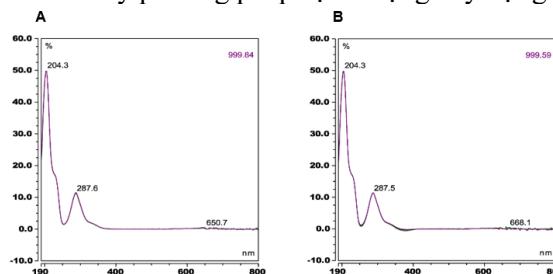
Tính thích hợp của hệ thống được xác định bằng cách tiêm lặp lại 6 lần, mỗi lần 10 µl dung dịch chuẩn silybin nồng độ 100 µg/ml vào hệ thống sắc ký. Tiến hành chạy sắc ký ở điều kiện đã lựa chọn. Số liệu trình bày ở Bảng 2 chỉ ra rằng độ lệch chuẩn tương đối (RSD) của thời gian lưu (*t_R*) và diện tích pic (*S_{pic}*) của silybin A và silybin B < 2%, thông số này phù hợp với yêu cầu về tính tương thích hệ thống sắc ký cho việc xác định hàm lượng silybin trong cao khô BG-PT [13].

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

Số lần phân tích	Silybin A		Silybin B	
	<i>t_R</i> (min)	<i>S_{pic}</i> (mAU.s)	<i>t_R</i> (min)	<i>S_{pic}</i> (mAU.s)
1	42,82	624,3	46,11	637,2
2	43,02	619,9	46,33	629,7
3	42,98	627,3	46,38	642,9
4	43,13	626,0	46,56	639,1
5	42,97	622,5	46,37	634,8
6	43,15	628,4	46,57	642,5
Trung bình (TB)	43,01	624,7	46,39	637,7
RSD (%)	0,28	0,51	0,37	0,78

3.2.2. Độ đặc hiệu

Tiến hành chạy sắc ký dung dịch chuẩn (100 µg/ml), dung dịch thử, mẫu trắng trong cùng một điều kiện đã lựa chọn. Trên sắc ký đồ của mẫu trắng không có tạp tại thời gian lưu của silybin A, B so với dung dịch chuẩn. Các pic silybin A, B trên sắc ký đồ của dung dịch chuẩn, dung dịch thử có thời gian lưu lần lượt như nhau ($p > 0,05$) (Hình 2). Đồng thời độ tinh khiết của tất cả các pic này > 0,9999 và hệ số chồng phỏ (match) của silybin A, B lần lượt là 0,99984 và 0,9959 (Hình 2). Kết quả khảo sát cho thấy phương pháp định lượng xây dựng có độ đặc hiệu cao [13].



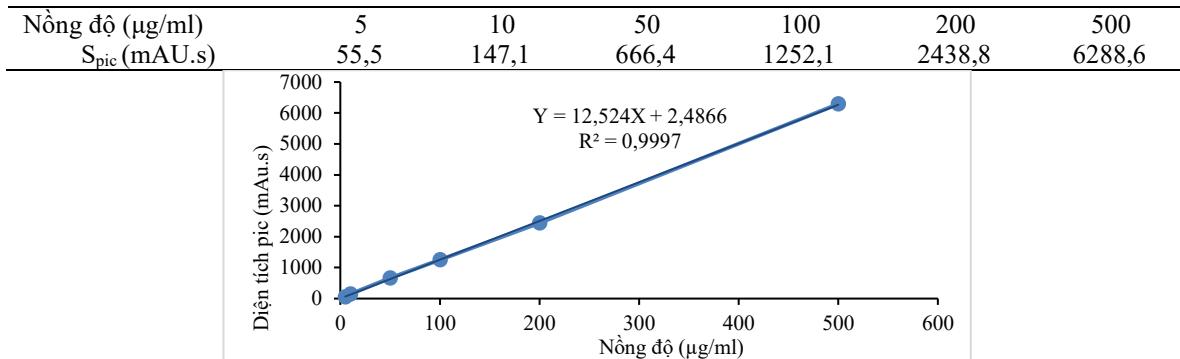
Hình 2. Hình ảnh chồng phỏ và hệ số match của silybin A (A) và silybin B (B)

3.2.3. Khoảng tuyến tính, giới hạn phát hiện, giới hạn định lượng

Trong khoảng nồng độ silybin khảo sát, có sự tương quan rất chặt giữa nồng độ chất phân tích và *S_{pic}* ($R^2=0,9997$). Phương trình dạng: $Y = 12,524X + 2,4866$ (Bảng 3, Hình 3). Mật khán LOD, LOQ của silybin được xác định lần lượt ở nồng độ là 0,20 µg/ml và 0,67 µg/ml dựa trên tỷ lệ tín

hiệu chất phân tích so với nhiễu đường nền (S/N) lần lượt là 3 và 10 [12], [13].

Bảng 3. Kết quả mối liên hệ giữa nồng độ và S_{pic} của silybin



Hình 3. Đồ thị biểu diễn mối tương quan giữa S_{pic} và nồng độ của silybin

3.2.4. Độ lặp lại và độ chính xác trung gian

Độ lặp lại của phương pháp xác định bởi định lượng silybin trong cao khô BG-PT sáu lần theo quy trình phân tích lựa chọn. Kết quả xác định hàm lượng trung bình tìm thấy chất silybin trong cao khô trong ngày là 37,67 mg/g, RSD = 0,66% và khác ngày là 37,58 mg, RSD = 0,83% đều < 2%, đáp ứng yêu cầu của AOAC [13] cho thấy phương pháp xây dựng có độ lặp cao (Bảng 4).

Bảng 4. Kết quả xác định độ lặp lại và độ chính xác trung gian của silybin trong cao khô BG-PT

STT	Phân tích silybin trong ngày		Phân tích silybin khác ngày, khác người thực hiện	
	Hàm lượng (mg/g)	Tỷ lệ %/viên nang cứng chứa 450 mg cao khô (%)	Hàm lượng (mg/g)	Tỷ lệ %/viên nang cứng chứa 450 mg cao khô (%)
1	37,7	3,39	37,3	3,36
2	37,5	3,38	37,4	3,37
3	37,6	3,38	38,0	3,42
4	37,9	3,41	37,7	3,39
5	37,3	3,36	37,3	3,36
6	38,0	3,42	37,8	3,40
TB = 37,67 mg/g; RSD = 0,66% (n=6)		TB = 37,58 mg/g; RSD = 0,83% (n=6)		
TB = 37,62 mg/g; RSD = 0,77% (n=12); P _{trong ngày/khác ngày} > 0,05				

Độ chính xác trung gian (độ chính xác ngày): Độ chính xác được thực hiện tương tự như độ lặp lại nhưng ở ngày kế tiếp và khác người thực hiện. Hàm lượng trung bình tìm thấy của silybin trong cao khô khi phân tích trong ngày, khác ngày là 37,62 mg/g, không khác nhau có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$), RSD = 0,77% < 2%, đáp ứng được yêu cầu của AOAC [13] (Bảng 4).

3.2.5. Độ đúng

Độ đúng của phương pháp phân tích được xác định thông qua hiệu suất thu hồi. Thêm chuẩn vào nền dung dịch cao khô để được nồng độ silybin đạt khoảng 80%, 100% và 120% so với nồng độ mẫu nghiên cứu. Mỗi mức nồng độ tiến hành 3 lần và tính toán hiệu suất thu hồi (Bảng 5).

Kết quả trình bày trong Bảng 5 cho thấy, cả 3 nồng độ thêm chuẩn hiệu suất thu hồi dao động từ 98,1 - 98,3% (trung bình 98,2%) nằm trong khoảng 98,0-102,0% đạt theo yêu cầu của AOAC [13]. Như vậy, phương pháp phân tích xây dựng có độ đúng cao.

3.3. Kết quả xác định hàm lượng silybin trong các lô cao khô nghiên cứu

Tiến hành định lượng silybin trong 03 lô cao khô BG-PT dựa trên phương pháp phân tích đã được xây dựng và thẩm định, xác định. Kết quả nghiên cứu tổng hợp trong Bảng 6 cho thấy cao khô BG-PT nghiên cứu có tổng hàm lượng silybin A và silybin B trong khoảng 35,3 - 37,2 mg/g.

Bảng 5. Kết quả xác định hiệu suất thu hồi của phương pháp

Hàm lượng silybin thêm vào ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	Hàm lượng silybin tìm thấy ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	Hiệu suất thu hồi (%)	Trung bình hiệu suất thu hồi (%)	RSD (%)
160	156,3	97,7	98,1	1,02
	155,8	97,4		
	158,8	99,3		
200	197,3	98,7	98,3	1,26
	193,9	97,0		
	198,7	99,4		
240	236,5	98,5	98,1	0,81
	235,8	98,3		
	233,9	97,5		
<i>Trung bình</i>		98,2	<i>1,00</i>	

Bảng 6. Kết quả định lượng silybin trong các lô cao khô BG-PT

STT	Lot cao khô	Hàm lượng silybin (mg/g)
1	CK01	$37,2 \pm 0,23$
2	CK02	$36,7 \pm 0,17$
3	CK03	$35,3 \pm 0,18$

3.4. Bàn luận

Phương pháp HPLC được đánh giá là phương pháp tối ưu để phân tích silybin trong dược liệu và các chế phẩm từ Cúc gai như cao khô, viên nang, viên nén nhờ độ nhạy cao và khả năng phân tách hiệu quả. Sự kết hợp của chương trình gradient pha động giúp tách tốt các hoạt chất nhóm silybin và detector PDA đã giúp tăng độ đặc hiệu của phương pháp [9], [14]. So với các phương pháp định lượng silybin khác, HPLC cho thấy ưu thế vượt trội. Phương pháp TLC (Thin-Layer Chromatography) được cho là thiếu độ nhạy và chủ yếu dùng cho định tính silymarin; phương pháp UV-Vis cũng được cho là không đặc hiệu, dẫn đến độ chính xác thấp trong phân lập silybin [11]. Trong khi đó, UPLC và HPLC-MS tuy có thời gian phân tích silybin ngắn hơn và LOD thấp hơn (0,5 ng/ml) [15], [16], nhưng chi phí cao chủ yếu dùng định lượng silybin trong huyết tương người, ít dùng cho định lượng thông thường. Hiện tại HPLC là thiết bị phổ biến trong các phòng kiểm nghiệm, có khả năng định lượng tốt silybin, dễ thực hiện và chi phí vận hành tương đối hợp lý, áp dụng rộng rãi trong kiểm nghiệm ở Việt Nam.

Phương pháp HPLC được một số tác giả dùng định lượng silybin từ dược liệu, cao khô, viên nang: Rodriguez [17] đã định lượng silybin B trong hạt Cúc gai đạt 7,4 mg/g, với LOD = 1,16 mg/ml, LOQ = 3,51 mg/ml. Ngô Thị Thanh Diệp [14] đã xác định hàm lượng silybin trong hạt Cúc gai (đạt 1,79 mg/g), chế phẩm FY (49,17 mg/viên), chế phẩm ZE (40,82 mg/viên) có độ chính xác với RSD < 5%, tỷ lệ thu hồi silybin trong khoảng 90 - 110%. Lê Đình Chi [8] đã định lượng hàm lượng silybin A, B và isosilybin A trong 12 mẫu thực phẩm chức năng chứa silymarin chỉ đạt từ 15,8 - 69,1% so với hàm lượng công bố trên nhãn. Nguyễn Thị Thu Hằng [9] đã định lượng silymarin, silybin trong 10 mẫu thực phẩm chức năng trên thị trường với hàm lượng hoạt chất dao động từ 11,1 - 116 mg/viên nang cứng, LOD = 0,24 mg/g, LOQ = 0,80 mg/g, độ lặp từ 1,28 - 2,41%, độ thu hồi từ 96,0-102,1%. Các kết quả này đã khẳng định độ tin cậy của phương pháp HPLC, đồng thời hỗ trợ kiểm soát chất lượng và phát triển sản phẩm chứa silybin.

Kết quả thẩm định quy trình định lượng silybin bằng HPLC trong cao khô BG-PT, cho thấy quy trình có tính thích hợp tốt (RSD t_R , S_{pic} của silybin A, B < 2%); độ đặc hiệu tốt (các pic silybin A, B trên sắc ký đồ của dung dịch chuẩn, dung dịch thử có t_R lần lượt như nhau), tương quan tuyến tính chặt ($R^2 = 0,9997 > 0,999$); độ lặp lại cao (RSD trong ngày = 0,66% < 2%, RSD khác ngày = 0,83% < 2%), độ chính xác cao (RSD = 0,77% < 2%), độ đúng cao (tỷ lệ thu hồi đạt 98,2%). Các kết quả này đáp ứng yêu cầu của AOAC [13]. Mật độ LOD = 0,20 $\mu\text{g}/\text{ml}$, LOQ =

0,67 µg/ml, gợi ý giới hạn ứng dụng trong định lượng cao khô từ 0,7 - 500 µg/ml, đây là khoảng nồng độ mà phương pháp cho kết quả tuyêntính, chính xác và lặp lại được.

Áp dụng quy trình xây dựng trong nghiên cứu vào định lượng silybin trong cao khô BG-PT cho thấy, sản phẩm có tổng hàm lượng silybin A, B trong khoảng 35,3 - 37,2 mg/g. Cao khô BG-PT là sản phẩm mới, được bào chế từ 7 loại dược liệu bằng công nghệ phun sấy. Kết quả nghiên cứu này góp phần xây dựng quy trình định lượng silybin cho sản phẩm là cao khô, viên nang, viên nén có chứa Cúc gai tại Việt Nam.

4. Kết luận

Nghiên cứu đã xây dựng được phương pháp định lượng silybin (hỗn hợp silybin A, B) trong cao khô dược liệu Cúc gai và sáu dược liệu khác (Nhân trần, Bồ công anh, Cúc hoa vàng, Actiso, Cam thảo, Kim ngân hoa). Phương pháp được thẩm định và đáp ứng các yêu cầu theo hướng dẫn của ICH, AOAC về độ đặc hiệu, tính thích hợp của hệ thống, khoảng tuyêntính, độ đúng, độ lặp lại, giới hạn phát hiện và giới hạn định lượng. Phương pháp đã được áp dụng để phân tích ba lô cao khô nghiên cứu, hàm lượng silybin xác định được nằm trong khoảng 35,3 - 37,2 mg/g. Phương pháp định lượng này có thể triển khai áp dụng để xác định hàm lượng silybin trong các sản phẩm cao khô dược liệu, viên nang, viên nén có chứa Cúc gai tại Việt Nam.

Lời cảm ơn

Công trình được tài trợ kinh phí từ đề tài KHCN tỉnh Phú Thọ, mã số 04/ĐT-KHCN.PT/2023.

TÀI LIỆU THAM KHẢO/ REFERENCES

- [1] Vietnamese Ministry of Health, *Circ. No. 13/VBHN-BYT, list of traditional medicines, medicines from medicinal materials, and traditional medicinal ingredients covered by the health insurance fund*, 2021.
- [2] Vietnamese Ministry of Health, *Vietnamse Pharmacopoeia V* (In Vietnamese), vol. II, Hanoi: Medical Publishing House, 2017.
- [3] M. Bijak, "Silybin, a Major Bioactive Component of Milk Thistle (*Silybum marianum* L. Gaernt.) - Chemistry, Bioavailability, and Metabolism," *Molecules*, vol. 22, no. 11, 2017, Art. no. 1942.
- [4] R. Marceddu, L. Dinolfo, and G. Di Miceli, "Milk Thistle (*Silybum marianum* L.) as a Novel Multipurpose Crop for Agriculture in Marginal Environments: A Review," *Agronomy*, vol. 12, no. 3, 2022, Art. no. 729.
- [5] A. Federico, M. Dallio, and C. Loguerchio, "Silymarin/Silybin and Chronic Liver Disease: A Marriage of Many Years," *Molecules*, vol. 22, no. 2, 2017, Art. no. 191.
- [6] V. A. Kurkin, "Antioxidant activity of silybin and 2,3-dehydrosilybin from *Silybum marianum* (L.). Gaertn. Fruits," *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, vol. 5, no. 1, pp. 256-259, 2016.
- [7] M. Bijak, "Flavonolignans - compounds not only for liver treatment," *Europ PMC*, vol. 42, 2017, Art. no. 247.
- [8] C. D. Le and K. C. Cao, "Determination of the total content of silybione A, silybione B and isosilybione A in some health supplement products claimed to contain silymarine," (in Vietnamese), *Pharmaceutical Journal*, vol. 58, no. 512, pp. 29-32, 2018.
- [9] T. T. H. Nguyen, C. K. Cao, T. H. H. Le, and H. T. Le, "Study on the determination of the content of some silymarin compounds in functional foods using high-performance liquid chromatography," *Journal of Analytical Chemistry, Physics and Biology*, vol. 22, no. 4, pp. 62-69, 2017.
- [10] P. Lucie, K. Kristyna, B. David, and V. Katerina, "Simple and rapid HPLC separation and quantification of flavonoid, flavonolignans, and 2,3-dehydroflavonolignans in silymarin," *Foods*, vol. 9, 2020, Art. no. 116.
- [11] M. G. Quaglia, E. Bossu, E. Donati, G. Mazzanti, and A. Brandt, "Determination of silymarine in the extract from the dried *Silybum marianum* fruits by high performance liquid chromatography and capillary electrophoresis," *J. Pharm. Biomed Anal.*, vol. 19, pp. 435-442, 1999.
- [12] ICH, *Validation of analytical procedure: text and methodology Q2 (R1)*, 2005.
- [13] AOAC International, *Guidelines for Standard Method Performance Requirements*, Appendix F, 2016.

- [14] T. T. D. Ngo, H. A. La, Q. H. Ha, and C. M. H. Ta, "Development of a silybin quantification procedure in milk thistle seeds and preparations derived from milk thistle using HPLC method," *Ho Chi Minh City Med. J.*, vol. 23, no. 2, pp. 512-518, 2019.
- [15] H. Liu, Z. Du, and Q. Yuan, "A novel rapid method for simultaneous determination of eight active compounds in silymarin using a reversed-phase UPLC-UV detector," *Journal of Chromatography B*, vol. 877, no. 32, pp. 4159-4163, 2009.
- [16] M. Lazzaroni, G. Petrangolini, J. A. Iribarri, and A. Riva, "Development of an HPLC-MS/MS Method for the Determination of Silybin in Human Plasma, Urine and Breast Tissue," *Molecules*, vol. 25, no. 12, 2020, Art. no. 2918.
- [17] J. P. Rodriguez, N. G. Quilantang, J. S. Lee, and S. Lee, "Determination of Silybin B in the Different Parts of *Silybum marianum* using HPLC-UV," *Natural Product Sciences*, vol. 24, no. 2, pp. 82-87, 2018.