

NGHIÊN CỨU XÂY DỰNG CHUẨN CƠ SỞ CỦA DƯỢC LIỆU ĐỘC HOẠT

TS.DS. Hoàng Lê Sơn, ThS.DS. Nguyễn Văn Hanh

Khoa Y Dược, Trường Đại học Thành Đông

TÓM TẮT

*Nghiên cứu xây dựng tiêu chuẩn cơ sở của dược liệu Độc hoạt là một chuyên đề nằm trong khuôn khổ đề tài cấp Quốc gia: “Sản xuất thử nghiệm giống và dược liệu từ nguồn gen Độc hoạt (*Angelica pubescens* Ait.)”, Mã số: DA.10/2019 - HĐ - NVQG. Độc hoạt được thu hái ở Đắk Lắk làm nguyên liệu nghiên cứu. Nội dung nghiên cứu xây dựng tiêu chuẩn cơ sở cho dược liệu Độc hoạt gồm: Mô tả dược liệu, vi phẫu; độ ẩm; tro toàn phần; định tính bằng sắc ký bản mỏng; xác định đặc điểm bột, tro không tan trong acid và định lượng hoạt chất chính.*

Từ khóa: Dược liệu Độc hoạt, tiêu chuẩn cơ sở của dược liệu.

ABSTRACT

*Research to develop standard base of poisonous medicinal herbs is a topic within the framework of a national level project "Pilot run of seeds and medicinal herbs from the gene source of *Angelica pubescens* Ait ", Code: DA.10/2019 - HD - NVQG. *Angelica pubescens* Ait was collected in Dak Lak as research materials. Research to develop standard base of poisonous medicinal herbs includes description of medicinal materials; microsurgery; moisture; total ash; quantification by thin plate chromatography; determining characteristics of powder, ash insoluble in acid and quantification of main active ingredients.*

Keywords: *Poisonous medicinal herbs, standard base of medicinal herbs*

I. GIỚI THIỆU

Độc hoạt có tên khoa học *Angelica pubescens* Maxim. Cây thảo, sống lâu năm, cao 1 – 2m. Độc hoạt xuất xứ từ Trung Quốc, được trồng nhiều ở Chiết Giang, Hồ Nam. Cây được nhập vào Việt Nam đầu những năm 70 và được trồng ở Sa Pa, sau đó đưa ra sản xuất ở Sìn Hồ (Lai Châu). Môi trường sống của Độc hoạt thường ở vùng ôn đới, thích nghi cao với khí hậu vùng á nhiệt đới núi cao, nhiệt độ trung bình khoảng 15°C, độ ẩm 75 – 90 %.

Nghiên cứu xây dựng tiêu chuẩn cơ sở của dược liệu Độc hoạt là một chuyên đề nằm trong khuôn khổ của đề

*tài “Sản xuất thử nghiệm giống và dược liệu từ nguồn gen Độc hoạt (*Angelica pubescens* Ait.)”, Mã số: DA.10/2019 - HĐ - NVQG*

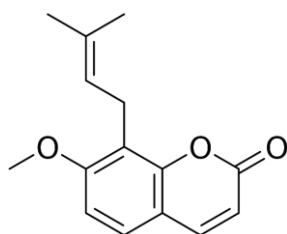
Độc hoạt được thu hái ở Đắk Lắk làm nguyên liệu nghiên cứu làm thuốc. Trong chuyên đề này, nhóm nghiên cứu xây dựng tiêu chuẩn cơ sở cho dược liệu Độc hoạt với các nội dung:

- Mô tả dược liệu, vi phẫu, độ ẩm, tro toàn phần, định tính bằng sắc ký bản mỏng (áp dụng Dược điển Việt Nam V (ĐDVN V);
- Đặc điểm bột, tro không tan trong acid (áp dụng ĐĐ Hong Kong)
- Định lượng hoạt chất chính.

II. TỔNG QUAN VỀ ĐỘC HOẠT

1. Mô tả, bộ phận dùng

Độc hoạt có tên khoa học *Angelica pubescens* Maxim. Cây thảo, sống lâu năm, cao 1 – 2m. Thân nhẵn, hình trụ, có rãnh dọc, màu lục hoặc tím nhạt. Lá phía gốc kép 2 – 3 lần lông chim, lá chét nguyên hình bầu dục hoặc hình trứng. Cụm hoa mọc ở kẽ lá hoặc đầu cành thành tán kép, có lông mịn, hoa nhỏ, 12 – 30 cái ở mỗi tán, màu trắng. Quả bế, hình trụ hay bầu dục tròn, có sống dọc, có dìa ở hai bên [1].



Hình 1. Cấu trúc của osthol

3. Tác dụng sinh học

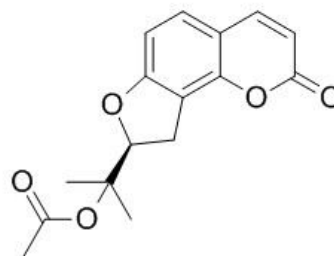
- **Tính vị, công năng:** độc hoạt có vị khổ, quy vào các kinh thận, can, bàng quang. Có khả năng khu phong, trừ thấp, thông tý, chỉ thống [1] [2].

- **Công dụng:** Độc hoạt dùng theo kinh nghiệm dân gian để điều trị phong thấp, đau khớp, lưng gối đau nhức, chân tay tê cứng, co quắp. Ngoài ra, độc hoạt còn được sử dụng cho các trường hợp cảm gió, đau đầu, đau răng. Liều dùng hàng ngày khoảng 4 – 12 g dưới dạng thuốc sắc hoặc ngâm rượu [1] [2]. Các nghiên cứu dược lý chỉ ra Độc hoạt có tác dụng giảm hưng phấn và tăng quá trình ức chế ở vỏ não trên thỏ thí nghiệm, làm mất phản xạ tủy sống trên ếch thí nghiệm.

Bộ phận sử dụng làm dược liệu là phần rễ của cây Độc hoạt [1], [2].

2. Thành phần hóa học

Rễ độc hoạt chứa nhiều dẫn chất coumarin: osthol, bergapten, glabralacton, angelol, psoralen, xanthotoxin ... [1], [3]. Ngoài ra, một số dẫn chất furo - (2,3 - h) - benzopyran - 2 - on columbianetin và columbianetin acetat cũng được phát hiện trong rễ độc hoạt [1], [4].



Hình 2. Cấu trúc của columbianetin

- **Tác dụng dược lý:** Độc hoạt làm tăng thành phần sóng chậm, đặc biệt là sóng delta, làm giảm tính hưng phấn và tăng quá trình ức chế vỏ não trên chuột thí nghiệm [1]. Cao Độc hoạt làm chậm quá trình truyền phản xạ và giảm số lượng phản xạ cơ cơ trên ếch thí nghiệm. Đây có thể là cơ chế tạo nên tác dụng giảm đau của Độc hoạt. Ngoài ra, Độc hoạt được chứng minh có khả năng làm tăng khoảng 12,3 % hàm lượng acetylcholine trong máu thỏ do ức chế hoạt tính cholinesterase trong huyết thanh thỏ và giảm đau trên mô hình gây đau bàng quang bằng acid acetic tiêm trong màng bụng [1].

Trong một nghiên cứu khác, Độc hoạt được chứng minh có tác dụng giảm

viêm thông qua ức chế COX-2 và các cytokins trên chuột thí nghiệm [5], tác dụng chống kết tập tiểu cầu, giảm thời gian chảy máu thông qua ức chế các yếu tố hình thành thromboxan B2 [6].

III. NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Đối tượng nghiên cứu

Dược liệu dùng cho nghiên cứu là rễ của cây Độc hoạt (*Angelica pubescens* Maxim.), họ Hoa tán (Apiaceae). Mẫu nghiên cứu được rửa sạch, thái nhỏ, sấy ở 60°C trong tủ sấy chân không. Bảo quản nguyên liệu trong túi polyme, để nơi khô thoáng, tránh ẩm mốc.

Phương pháp nghiên cứu

- 1) Mô tả: Kiểm tra bằng cảm quan, chế phẩm phải đạt các yêu cầu đã nêu.
- 2) Vi phẫu: Thử theo Dược điển Việt Nam V (ĐĐVN V), phụ lục 12.18: Định tính dược liệu và các chế phẩm bằng kính hiển vi. Soi tiêu bản dưới kính hiển vi phải thấy các đặc điểm như mô tả.
- 3) Soi bột: Thử theo ĐĐVN V, phụ lục 12.18: Định tính dược liệu và các chế phẩm bằng kính hiển vi. Nghiền dược liệu khô thành bột mịn rồi soi dưới kính hiển vi trong 1 giọt dung dịch soi, phải thấy các đặc điểm như mô tả.
- 4) Độ ẩm: Thử theo ĐĐVN V, phụ lục 12.13.
- 5) Tro toàn phần: Thử theo ĐĐVN V, phụ lục 9.8.
- 6) Tro không tan trong acid: Thử theo ĐĐVN V, phụ lục 9.7.
- 7) Kim loại nặng: Thử theo ĐĐVN V, phụ lục 9.4.11.

8) Dư lượng thuốc bảo vệ thực vật: Thử theo ĐĐVN V, phụ lục 12.17.

9) Định tính: Thử theo ĐĐVN V, Phụ lục 5.4: Phương pháp sắc ký lớp mỏng.

10) Dầu vân tay.

11) Chất chiết được trong dược liệu: Chất chiết được trong ether không được dưới 3,0 % tính theo dược liệu khô kiệt.

12) Định lượng: Định lượng đồng thời columbianetin acetate và osthole: Thử theo ĐĐVN V, phụ lục 5.3, Phương pháp sắc ký lỏng.

Hàm lượng (%) columbianetin acetate và osthole trong mẫu thử (tính theo dược liệu khô kiệt) được tính theo công thức sau:

$$X (\%) = \frac{C \times 100 \times 100}{10^6 \times m \times (100 - b)}$$

Trong đó: m: Khối lượng mẫu thử (g)
b: Độ ẩm mẫu thử (%)

C: Nồng độ chất chuẩn trong mẫu thử (µg/ml) tính từ phương trình hồi quy tuyến tính tương ứng.

IV. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

1. Đánh giá cảm quan

Rễ cái hình trụ, trên to, dưới nhỏ, đầu dưới phân 2 đến 3 nhánh hoặc hơn, dài 10 cm đến 30 cm. Đầu rễ phình ra, hình nón ngược với nhiều vân ngang. Đường kính 1,5 - 3 cm, đỉnh trên còn sót lại ít gốc thân, mặt ngoài màu nâu xám hay nâu thẫm, có vân nhăn dọc, với các lỗ vỏ, hơi lõm ngang và những vết sẹo rễ con hơi nổi lên. Chất tương đối rắn chắc, khi ẩm thì mềm. Mặt bẻ gãy có vỏ màu xám trắng, với nhiều khoang dầu màu nâu rải rác, gỗ từ màu vàng xám đến vàng nâu, tầng phát sinh màu nâu. Mùi thơm ngát đặc biệt, vị đắng và hăng, nếm hơi tê lưỡi (Hình 3).

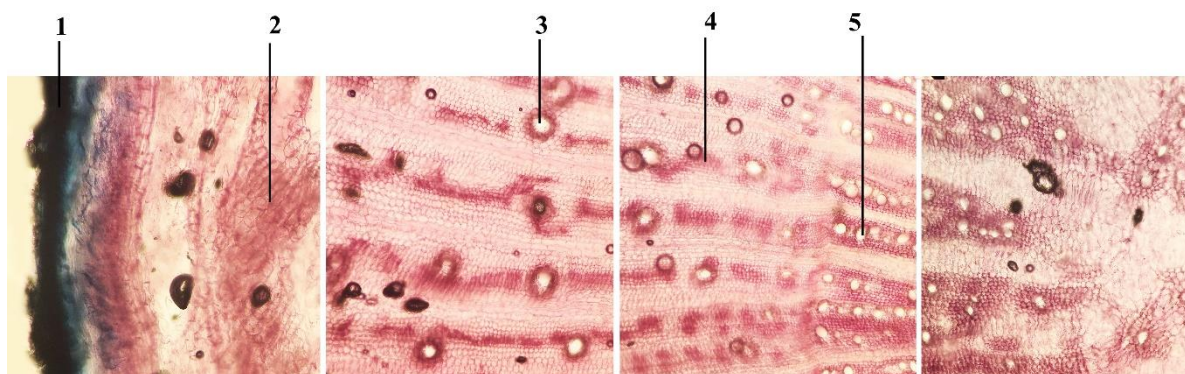


Hình 3. Hình ảnh dược liệu Độc hoạt nghiên cứu

2. Vi phẫu

Lớp bần (1) có nhiều hàng tế bào. Mô mềm (2) ở phần vỏ hẹp. Libe (4) rộng chiếm nửa bán kính của rễ. Khoảng tinh dầu (3) tương đối nhiều,

xếp thành nhiều vòng. Tầng phát sinh tạo thành vòng tròn liên tục. Mạch gỗ (5) thường xếp theo hình xuyên tâm, riêng lẻ. Giữa các bó libe-gỗ là tia ruột (Hình 4).



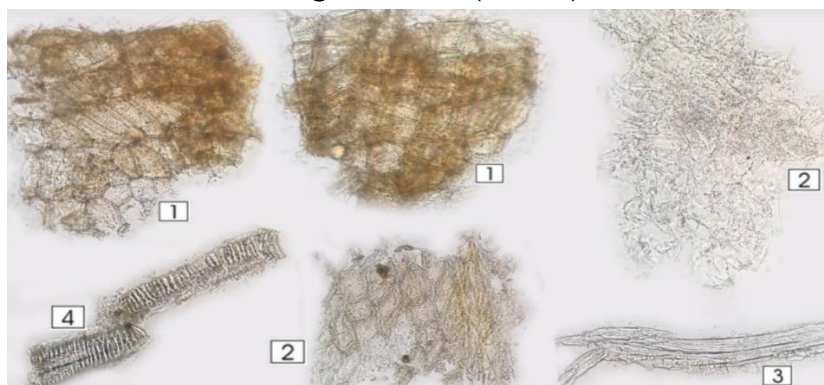
Hình 4. Vi phẫu dược liệu Độc hoạt

1. Bần, 2. Mô mềm, 3. Khoảng tinh dầu, 4. Libe, 5. Gỗ

3. Bột

Bột màu nâu, mùi thơm nhẹ, vị đắng. Quan sát trên kính hiển vi thấy: Mảnh bần gồm các tế bào hình đa giác,

thành dày, màu nâu (1). Mảnh mô mềm thành mỏng, có mang tinh bột (2). Rải rác có các sợi (3) và mảnh mạch mạng (4) (Hình 5).



Hình 5. Một số đặc điểm bột dược liệu Độc hoạt

1. Mảnh bần, 2. Mảnh mô mềm, 3. Sợi, 4. Mảnh mạch

Nhận xét: Thấy rằng, mẫu Độc hoạt nghiên cứu có các đặc điểm mô tả, vi phẫu như yêu cầu của ĐĐVN. Đặc điểm bột chưa được quy định trong ĐĐVN V. Tuy nhiên, Dược điển một số nước có mô tả về đặc điểm bột như ĐĐ Hong Kong với các chi tiết liên quan đến màu sắc bột, tế bào tiết, ống tiết, hạt tinh bột, lớp vỏ.

Tiêu chuẩn đề xuất: Tiêu chí mô tả và vi phẫu giữ nguyên như yêu cầu ĐĐVN V. Tiêu chí về đặc điểm bột được xây dựng dựa trên ĐĐ Hong Kong và kết quả đánh giá thực tế thu được. Cụ thể như sau:

Mô tả: Rễ cái hình trụ, trên to, dưới nhỏ, đầu dưới phân 2 đến 3 nhánh hoặc hơn, dài 10 - 30 cm. Đầu rễ phình ra, hình nón ngược với nhiều vân ngang. Đường kính 1,5 - 3 cm, đỉnh trên còn sót lại ít gốc thân, mặt ngoài màu nâu xám hay nâu thẫm, có vân nhăn dọc, với các lỗ vỏ, hơi lồi ngang và những vết sẹo rễ con hơi nổi lên. Chất tương đối rắn chắc, khi ẩm thì mềm. Mặt bẻ gãy có vỏ màu xám trắng, với nhiều

khoang dầu màu nâu rải rác, gỗ từ màu vàng xám đến vàng nâu, tầng phát sinh màu nâu. Mùi thơm ngát đặc biệt, vị đắng và hăng, nếm hơi tê lưỡi.

Bột: Bột màu nâu nhạt hoặc nâu. Soi bột dưới kính hiển vi thấy: Mảnh bản gồm các tế bào hình đa giác, thành dày, màu nâu. Mảnh mô mềm thành mỏng, có mang tinh bột. Rải rác có các sợi và mảnh mạch mạng.

Vi phẫu: Bản gồm nhiều lớp tế bào (3 – 12 lớp). Vỏ hẹp với ít khoang tinh dầu. Libe rộng chiếm nửa bán kính của rễ. Khoang tinh dầu tương đối nhiều, xếp thành vài vòng tiếp tuyến, lớn tới 153 μm , xung quanh bao bọc bởi 6 đến 10 tế bào tiết. Tầng phát sinh tạo thành vòng tròn liên tục. Tia gỗ rộng có 1 đến 2 hàng tế bào. Mảnh mạch rải rác, đường kính tới 84 μm , thường xếp theo hình xuyên tâm, riêng lẻ. Tế bào mô mềm chứa hạt tinh bột.

4. Độ ẩm

Thử theo ĐĐVN V, phụ lục 12.13 (1g, 105°C, 5h).

Bảng 1. Kết quả phân tích độ ẩm của các mẫu dược liệu Độc hoạt

Tên mẫu	M1	M2	M3	Kết luận (theo ĐĐVN V)
Độ ẩm không quá 13,0 (%)	9,873	10,212	9,885	Đạt ($\leq 13\%$)

Nhận xét: Nhận thấy các mẫu dược liệu Độc hoạt nghiên cứu đều có độ ẩm dưới 13 % đạt theo yêu cầu của ĐĐVN V, chuyên luận Độc hoạt.

Tiêu chuẩn cơ sở: Độ ẩm không quá 13,0 % (theo yêu cầu của ĐĐVNV).

5. Tro toàn phần

Thử theo ĐĐVNV, Phụ lục 9.8, Xác định tro toàn phần.

Bảng 2. Kết quả phân tích tro toàn phần của các mẫu dược liệu Độc hoạt

Tên mẫu	M1	M2	M3	Kết luận (theo ĐĐVN V)
Tro toàn phần không quá 8,0 %	3,2	2,8	2,7	Đạt ($\leq 8,0\%$)

Nhận xét: Nhận thấy các mẫu được liệu Độc hoạt nghiên cứu đều có tro toàn phần dưới 8,0 % đạt theo yêu cầu của ĐĐVN V, chuyên luận Độc hoạt.

Tiêu chuẩn đề xuất: Tro toàn phần không quá 8,0% (theo yêu cầu của ĐĐVN V).

6. Tro không tan trong acid

Thử theo ĐĐVN V, Phụ lục 9.7, Xác định tro không tan trong acid. Kết quả được trình bày ở Bảng 3.

Bảng 3. Kết quả phân tích tro không tan trong acid của các mẫu được liệu Độc hoạt

Tên mẫu	M1	M2	M3	Kết luận (theo ĐĐ Hong Kong)
Tro không tan trong acid không quá 3,0 %	0,4	0,5	0,7	Đạt ($\leq 3,0$ %)

Nhận xét: Nhận thấy các mẫu được liệu Độc hoạt nghiên cứu đều có tro không tan trong acid dưới 3,0 % đạt theo yêu cầu của ĐĐ Hong Kong, chuyên luận Độc hoạt.

Tiêu chuẩn đề xuất: Tro không tan trong acid không quá 3,0 % (theo yêu cầu của ĐĐ Hong Kong).

7. Kim loại nặng

04 kim loại nặng gồm As, Pb, Cd và Hg là những kim loại độc hại, thường yêu cầu giới hạn thấp, đặc biệt là với các dược liệu được trồng theo GAP. Định lượng kim loại nặng được tiến hành bằng phương pháp quang phổ hấp thụ nguyên tử, thử theo ĐĐVN V, phụ lục 9.4.11 hoặc theo TCVN.

Bảng 4. Kết quả phân tích kim loại nặng mẫu được liệu Độc hoạt

Kim loại nặng	As	Cd	Hg	Pb
Hàm lượng (mg/kg)	0,020	0,076	< 0,006	0,052

Nhận xét: Nhận thấy các mẫu được liệu Độc hoạt nghiên cứu đều có dư lượng kim loại nặng rất thấp, ĐĐVN V chuyên luận Độc hoạt chưa có yêu cầu dư lượng kim loại nặng. ĐĐVN V không có yêu cầu chung cho giới hạn nhiễm 04 kim loại này, ngoại trừ một số chuyên luận ĐĐVN qui định như chuyên luận lá sen yêu cầu không quá 10 phần triệu Pb; 1 phần triệu Cd; 0,4 phần triệu Hg, 1 phần triệu As. Ngoài ra ĐĐ một số nước có yêu cầu chung

về dư lượng kim loại nặng như ĐĐ Hong Kong, chuyên luận dược liệu qui định chung (không quá 5 phần triệu Pb; 1 phần triệu Cd; 0,2 phần triệu Hg, 2 phần triệu As). Như vậy, các mẫu nghiên cứu đều có dư lượng kim loại nặng thấp.

Tiêu chuẩn đề xuất: Kim loại nặng.

Kim loại nặng	As	Cd	Hg	Pb
Hàm lượng (mg/kg)	≤ 2	≤ 1	$\leq 0,2$	≤ 5

8. Dư lượng thuốc bảo vệ thực vật

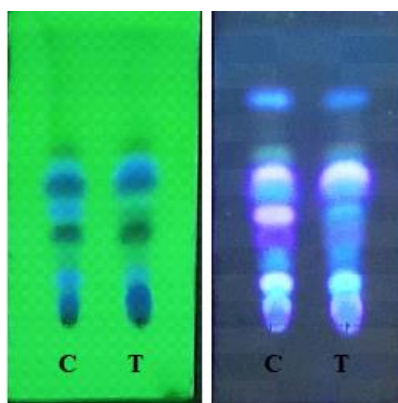
Kết quả kiểm tra dư lượng thuốc bảo vệ thực vật trong các mẫu Độc hoạt, không phát hiện tồn dư thuốc bảo vệ thực vật. DĐVN V không có yêu cầu chung cho dư lượng thuốc bảo vệ thực vật, tuy nhiên có một số chuyên luận có yêu cầu chỉ tiêu này, như trong chuyên luận tía tô lá có yêu cầu dư lượng thuốc bảo vệ thực vật “Benzen

hexaclorid (BHC): Không quá 0,2 phần triệu”.

Tiêu chuẩn đề xuất: dư lượng thuốc bảo vệ thực vật trong dược liệu Độc hoạt qui định Benzen hexaclorid (BHC): Không quá 0,2 phần triệu.

9. Định tính

Thử theo phương pháp sắc ký lớp mỏng, DĐVN V, phụ lục 5.4. Kết quả được trình bày tại (Hình 6).



(A)

(B)

Hình 6. Hình ảnh SKĐ sắc ký lớp mỏng định tính Độc hoạt

(A) - SKĐ quan sát ở 254 nm

(B) – SKĐ quan sát ở 366 nm

Ghi chú: C. Mẫu Độc hoạt đối chiếu; T. Mẫu Độc hoạt thí nghiệm.

Dung môi khai triển: cyclohexan - ethylacetat : acid formic (8 : 2 : 0,5).

Nhận xét: SKĐ TLC cho các vết tách rõ, SKĐ của dung dịch thử có các vết cùng màu, cùng giá trị R_f với SKĐ của dung dịch đối chiếu Độc hoạt.

Tiêu chuẩn đề xuất:

- **Định tính:** Thử theo DĐVN V, Phụ lục 5.4, Phương pháp sắc ký lớp mỏng
- **Bản mỏng:** Silica gel 60F₂₅₄.
- **Dung môi khai triển:** cyclohexan - ethylacetat : acid formic (8 : 2 : 0,5).
- **Dung dịch thử:** Lấy 2 g bột dược liệu, thêm 10 ml ether (TT), ngâm qua đêm, lọc. Bốc hơi dịch lọc trên cách

thủy tới khô, hòa tan căn trong 2 ml cloroform (TT)

- **Dung dịch đối chiếu:** Lấy 2g bột Độc hoạt (mẫu chuẩn), tiến hành chiết như mô tả ở phần Dung dịch thử, được dung dịch đối chiếu.

- **Cách tiến hành:** Chấm riêng biệt lên bản mỏng khoảng 2 μ l mỗi dung dịch thử và dung dịch đối chiếu. Sau khi triển khai sắc ký, lấy bản mỏng để khô ở trong không khí. Quan sát dưới ánh sáng tử ngoại ở bước sóng 254 và 366 nm.

Kết quả: SKĐ của dung dịch thử phải có các vết cùng màu, cùng giá trị R_f với SKĐ của dung dịch đối chiếu Độc hoạt.

10. Dấu vân tay

Kiểm tra tính thích hợp hệ thống

Tiến hành tiêm lặp lại 5 lần mẫu dung dịch chuẩn có nồng độ 8,8 µg/ml, ghi lại thời gian lưu và diện tích pic. Kết quả được trình bày ở Bảng 5.

Bảng 5. Kết quả kiểm tra tính thích hợp hệ thống

	Thời gian lưu (phút)	Diện tích pic (mAu.S)
1	33,895	476282
2	33,802	477134
3	33,901	476855
4	33,913	476924
5	33,898	477018
TB	33,882	476843
RSD (%)	0,13	0,07

Độ lệch chuẩn tương đối của diện tích pic và thời gian lưu đều nhỏ hơn 2%. Số đĩa lý thuyết của pic osthole là 205473 (> 10000). Như vậy, các điều kiện sắc ký đã lựa chọn và hệ thống HPLC sử dụng là phù hợp và đảm bảo độ ổn định của phép phân tích.

Kết quả đánh giá dấu vân tay của mẫu dược liệu Độc hoạt thí nghiệm

Tiến hành khai triển mẫu dung dịch chuẩn và dung dịch thử theo điều kiện phân tích đã trình bày ở trên. Kết quả thu được như sau:

Bảng 6. Giá trị RRT của 6 pic đặc trưng trên SKĐ của mẫu dược liệu Độc hoạt

Pic	RRT
1	0,62
2	0,67
3	0,70
4 (columbianetin acetat)	0,82
5 (marker, osthole)	1,00
6	1,12

Trên SKĐ của dung dịch thử có 6 pic với giá trị RRT thuộc khoảng chấp nhận của các pic tương ứng trên SKĐ dấu vân tay chuẩn.

Tiêu chuẩn đề xuất:

- **Dung dịch chuẩn:** Cân chính xác khoảng 2,2 mg osthole, hòa tan trong 50 mL methanol. Hút chính xác 0,4 mL dung dịch trên vào bình định mức 2 mL, thêm methanol vừa đủ đến vạch, thu được

dung dịch chuẩn có nồng độ khoảng 8,8 µg/ml.

- **Dung dịch thử:** Cân chính xác khoảng 0,1 g bột dược liệu vào bình nón 250 ml, thêm 100ml methanol. Siêu âm (220 W) trong 10 phút. Lọc qua màng lọc 0,45 µm được dung dịch thử.

- **Điều kiện sắc ký:**

Cột: C18 (250 x 4,6 mm; 5 µm)

Detector: DAD, bước sóng phát hiện: 320 nm.

Tốc độ dòng: 1 ml/phút

Thể tích tiêm: 20 µl

Pha động: Acetonitril: H₂O, gradient:

Thời gian (phút)	Acetonitril	Nước	Phương pháp khai triển
0 - 15	30	70	Đẳng dòng
15 - 20	30 → 55	70 → 45	Gradient
20 - 40	55 → 65	45 → 35	Gradient

Kiểm tra tính thích hợp hệ thống:

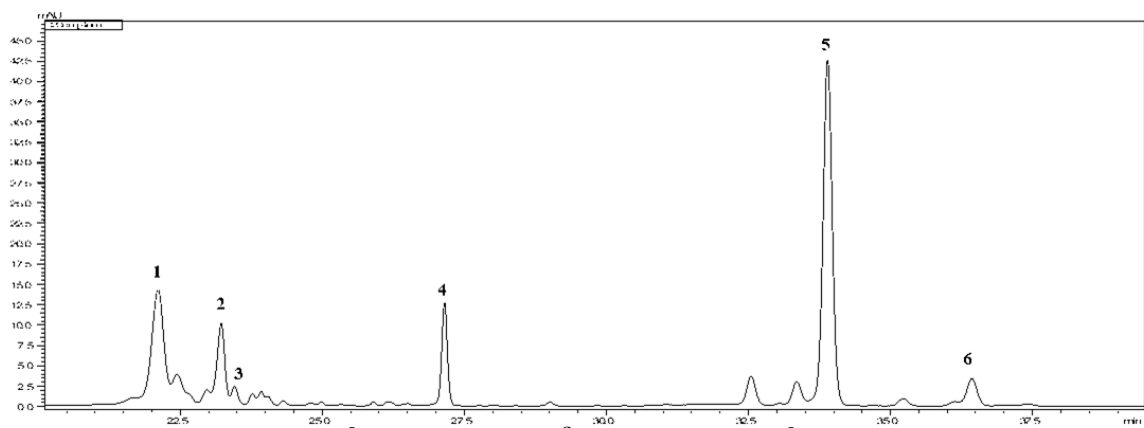
Tiến hành tiêm lặp lại ít nhất 5 lần dung dịch chuẩn, ghi lại thời gian lưu và diện tích pic. Giá trị RSD % của diện tích pic và thời gian không quá 3,0 %. Số đĩa lý thuyết của pic osthol không ít hơn 10000.

Tiến hành: Khai triển dung dịch chuẩn và dung dịch thử, ghi lại SKĐ. Đánh giá thời gian lưu của pic osthole và sáu pic đặc trưng trên SKĐ của dung dịch thử. Xác định pic osthole trên SKĐ của dung dịch thử bằng cách so sánh với thời gian lưu của pic osthole trên SKĐ của dung dịch chuẩn. Sự sai khác thời gian lưu của không quá 2,0 %. Xác định RRTs của các pic đặc trưng trên SKĐ của dung dịch thử.

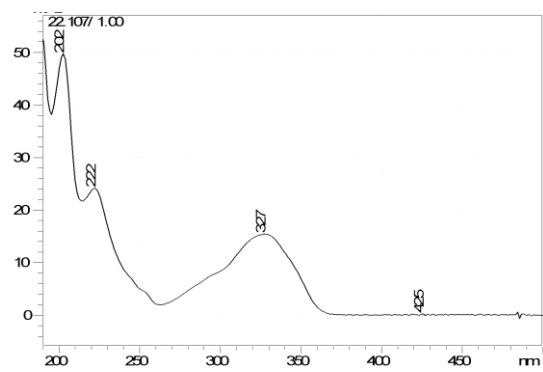
RRT ± SD của 6 pic đặc trưng của dịch chiết Độc hoạt được trình bày ở Bảng 7.

Bảng 7. Giá trị RRT của 6 pic đặc trưng của dịch chiết Độc hoạt

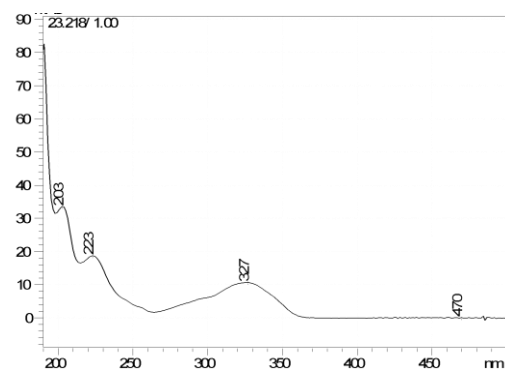
Pic	RRT	SD
1	0,65	± 0,04
2	0,68	± 0,04
3	0,69	± 0,04
4 (columbianetin acetat)	0,80	± 0,04
5 (marker, osthole)	1,00	± 0,04
6	1,10	± 0,04



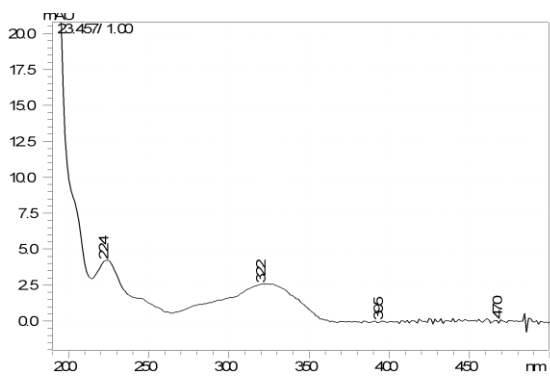
Hình 7. Dấu vân tay chuẩn của dịch chiết Độc hoạt



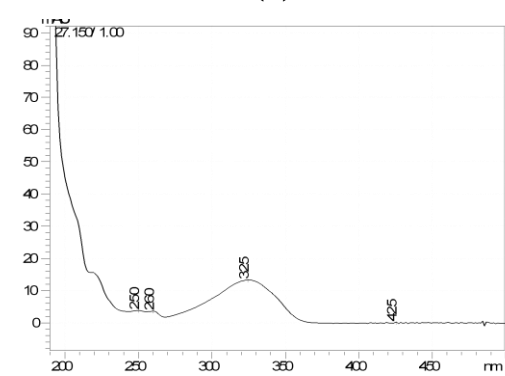
(1)



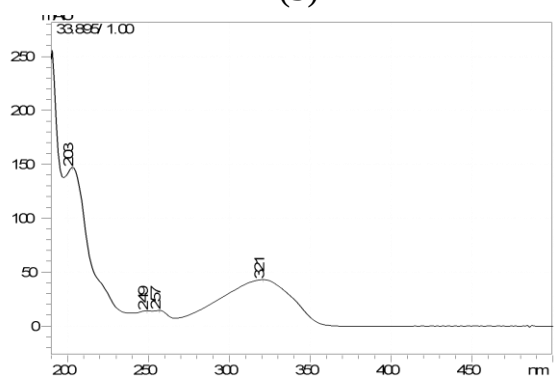
(2)



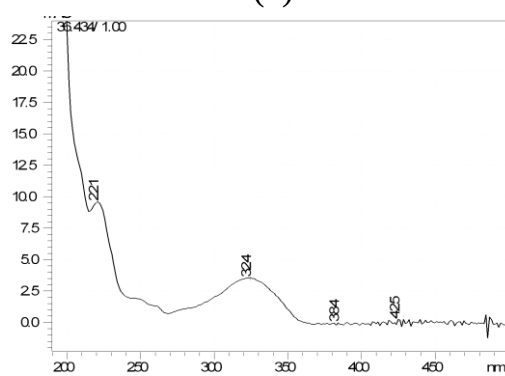
(3)



(4)



(5)



(6)

Hình 8. Phổ hấp thụ UV – Vis của 6 pic đánh dấu trên dấu vân tay của dược liệu Độc hoạt

Kết quả: Trên SKĐ của dung dịch thử phải có 6 pic với giá trị RRT thuộc khoảng chấp nhận của các pic tương ứng trên SKĐ dấu vân tay chuẩn.

11. Chất chiết được trong dược liệu

Kết quả chất chiết được trong ether của các mẫu Độc hoạt được trình bày trong bảng 8.

Bảng 8. Kết quả chất chiết được các mẫu dược liệu Độc hoạt

Tên mẫu	M1	M2	M3	Kết luận (theo ĐĐVN V)
Chất chiết được trong ether	$3,6 \pm 0,2$	$3,8 \pm 0,3$	$3,5 \pm 0,2$	Đạt ($\geq 3\%$)

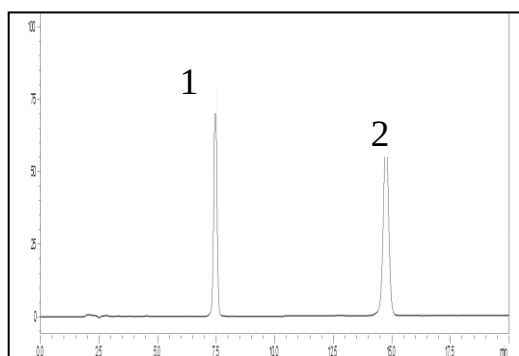
12. Định lượng

1) Xây dựng phương pháp định lượng

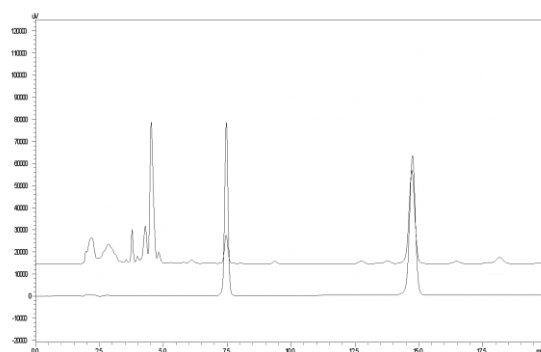
Thử theo ĐĐVN V, phụ lục 5.3, Phương pháp sắc ký lỏng.

Đánh giá lại điều kiện phân tích HPLC và quy trình xử lý mẫu trên hệ

thống máy móc và phòng thí nghiệm tại Khoa Bào chế - Chế biến, Viện Dược liệu, nhóm nghiên cứu nhận thấy điều kiện phân tích trên phù hợp. Kết quả thu được như hình 9 và bảng 9.



A-SKĐ HPLC columbianetin (1) và osthole (2)



B-SKĐ HPLC phân tích columbianetin và osthole trong Độc hoạt

Hình 9. SKĐ HPLC phân tích columbianetin và osthole trong dược liệu Độc hoạt

Bảng 9. Các thông số đánh giá đối với columbianetin và osthole

STT	Thông số đánh giá	Giá trị	
		Columbianetin	Osthole
1	Thời gian lưu, t_R	7,473	14,758
2	Độ phân giải, R	1,83	2,23
3	Hệ số kéo đuôi peak	1,009	0,966
4	Số đĩa lý thuyết	15128	20267

Các thông số độ phân giải (R_s), hệ số kéo đuôi của peak, số đĩa lý thuyết N đều đạt yêu cầu, chứng tỏ điều kiện

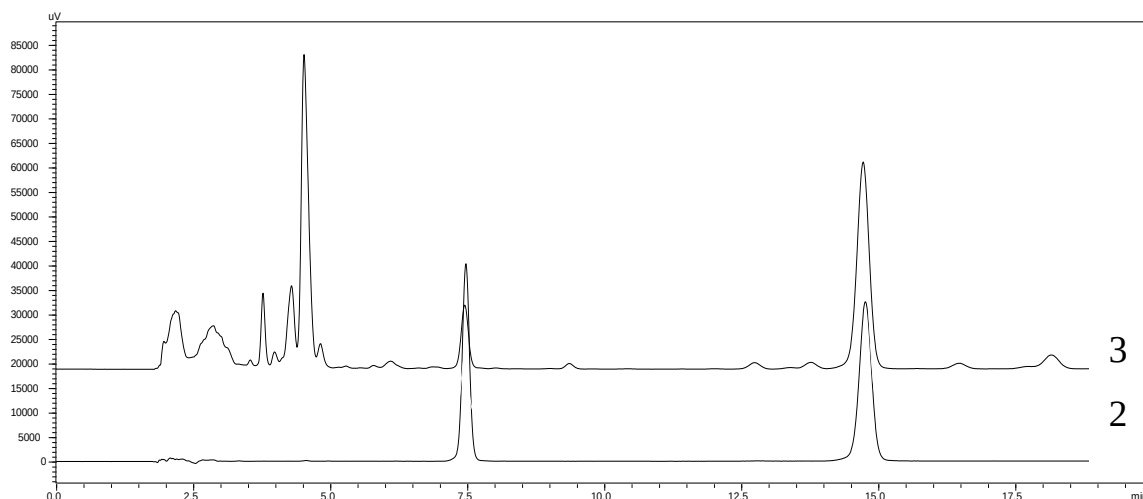
phân tích HPLC này là phù hợp cho phân tích columbianetin và osthole trong dược liệu Độc hoạt.

2) Thẩm định phương pháp phân tích

- Tính chọn lọc của phương pháp

Tiến hành phân tích 3 mẫu: dung dịch columbianetin và osthole chuẩn, dung dịch mẫu thử, dung dịch mẫu thử

thêm chuẩn columbianetin và osthole
columbianetin và osthole với điều kiện phân tích HPLC đã trình bày ở trên, thu được kết quả đánh giá bằng các SKĐ tương ứng như hình sau:



Hình 10. SKĐ đánh giá tính chọn lọc của phương pháp

1-Mẫu chuẩn columbianetin và osthole; 2-Mẫu thử dược liệu Độc hoạt;
3-Mẫu thử dược liệu Độc hoạt thêm chuẩn columbianetin và osthole.

Trên SKĐ thu được cho thấy, thời gian lưu của columbianetin và osthole ở 3 mẫu là tương đương nhau, pic columbianetin và osthole không bị trùng với các pic khác khác, diện tích pic columbianetin và osthole trong mẫu thử thêm chuẩn tăng lên tương ứng với lượng chuẩn thêm vào so với diện tích pic columbianetin và osthole trong mẫu thử, chứng tỏ phương pháp và hệ thống sắc ký có tính đặc hiệu cao.

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

Phân tích mẫu thử đã được xác định nồng độ columbianetin và osthole, sau đó pha loãng dần đến khi trên sắc ký đồ của dung dịch thử, tại thời gian lưu của acid ganoderic A, xác định được tỷ lệ S/N=2-3 và S/N= 9-11. Từ đó tìm được LOD và LOQ. Mỗi mẫu làm lặp lại 3

lần và lấy kết quả trung bình.

Kết quả thu được là:

Columbianetin: Tại nồng độ 0,043 ($\mu\text{g/ml}$) và 0,013 ($\mu\text{g/ml}$) tỷ lệ S/N tương ứng là 10 và 3. Với kết quả này chúng tôi xác định:

- Giới hạn phát hiện (LOD): 0,013 ($\mu\text{g/ml}$).

- Giới hạn định lượng (LOQ): 0,043 ($\mu\text{g/ml}$).

Osthole: Tại nồng độ 0,083 ($\mu\text{g/ml}$) và 0,025 ($\mu\text{g/ml}$) tỷ lệ S/N tương ứng là 10 và 3. Với kết quả này chúng tôi xác định:

- Giới hạn phát hiện (LOD): 0,025 ($\mu\text{g/ml}$).

- Giới hạn định lượng (LOQ): 0,083 ($\mu\text{g/ml}$).

- Xác định khoảng tuyến tính và xây dựng đường chuẩn

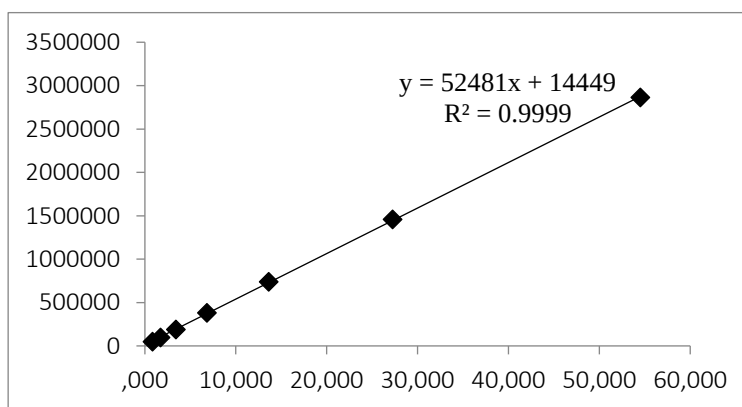
Chuẩn bị một dãy gồm dung dịch columbianetin có nồng độ tăng dần

từ 0,85 µg/ml đến 54,5 µg/ml và osthole chuẩn có nồng độ tăng dần từ 0,83 µg/ml đến 53,0 µg/ml rồi tiến

hành phân tích HPLC với các điều kiện như đã trình bày ở trên. Kết quả khảo sát được trình bày ở Bảng 10, Bảng 11.

Bảng 10. Quan hệ tuyến tính giữa nồng độ và diện tích của pic columbianetin

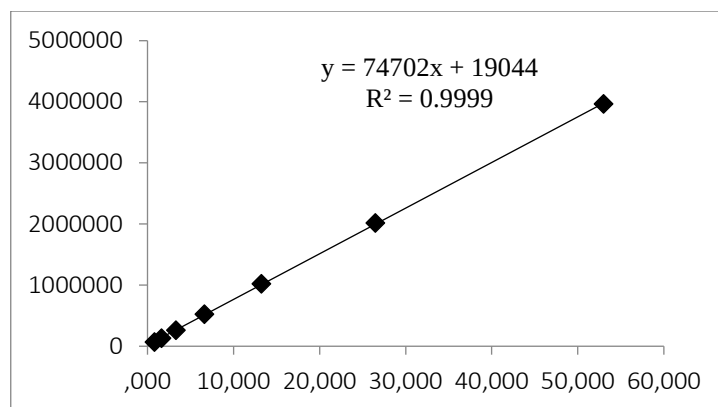
Nồng độ (µg/ml)	Diện tích pic (mAU.s)	Nồng độ tính lại từ đường chuẩn (µg/ml)	Độ chệch (%)
54,50	2865161	54,32	0,33
27,25	1458118	27,51	0,95
13,63	738917	13,80	1,32
6,81	379316	6,95	2,05
3,41	190274	3,35	1,64
1,70	96710	1,57	7,97
0,85	48349	0,75	11,93
Phương trình đường chuẩn		$Y = 52481.X + 14489$	
Hệ số tương quan		$R^2 = 0,999$	



Hình 11. Đường chuẩn biểu diễn mối quan hệ giữa nồng độ columbianetin và diện tích

Bảng 11. Quan hệ tuyến tính giữa nồng độ và diện tích của pic osthole

Nồng độ (µg/ml)	Diện tích pic (mAU.s)	Nồng độ tính lại từ đường chuẩn (µg/ml)	Độ chệch (%)
53,00	3966199	52,84	0,30
26,50	2015771	26,73	0,87
13,25	1021106	13,41	1,24
6,63	523436	6,75	1,92
3,31	263107	3,27	1,37
1,66	133004	1,53	7,89
0,83	67285	0,72	13,06
Phương trình đường chuẩn		$Y = 74702.X + 19044$	
Hệ số tương quan		$R^2 = 0,999$	



Hình 11. Đường chuẩn biểu diễn mối quan hệ giữa nồng độ osthole và diện tích pic

Đường chuẩn được đánh giá thông qua hệ số tương quan R và độ chệch của nồng độ tìm lại được từ đường chuẩn so với nồng độ thực. Kết quả đánh giá đường chuẩn được trình bày trong bảng 11 cho thấy độ chệch (Δ) tại các nồng độ đều nằm trong giới hạn cho phép ($<15\%$). $R^2 = 0,999$ cho thấy đường chuẩn được xây dựng có độ tuyến tính cao đảm bảo để thực hiện phép phân tích định lượng columbianetin và osthole.

- Tính thích hợp hệ thống

Tính thích hợp của hệ thống được đánh giá theo phương pháp như đã trình bày ở trên. Kết quả được đánh giá thông qua giá trị RSD (%) của diện tích pic và thời gian lưu sau 5 lần phân tích lặp lại cùng một mẫu chuẩn columbianetin và osthole có nồng độ lần lượt là 1,70 $\mu\text{g/ml}$ và 1,66 $\mu\text{g/ml}$. Kết quả được trình bày trong Bảng 12.

Bảng 12. Kết quả đánh giá tính thích hợp hệ thống

	Columbianetin		Osthole	
	Thời gian lưu (phút)	Diện tích pic (mAU.s)	Thời gian lưu (phút)	Diện tích pic (mAU.s)
1	7,471	96725	14,766	132436
2	7,475	96692	14,760	131107
3	7,468	96710	14,753	131004
4	7,476	96618	14,760	131556
5	7,473	96733	14,752	130673
TB	7,473	96696	14,758	131355
RSD (%)	0,04	0,05	0,04	0,52

Độ lệch chuẩn tương đối của diện tích pic và thời gian lưu đều nhỏ hơn 2%, cho thấy các điều kiện sắc ký đã lựa chọn và hệ thống HPLC sử dụng là phù hợp và đảm bảo độ ổn định của

phép phân tích định lượng columbianetin và osthole.

- Độ lặp lại

Tiến hành: Cân chính xác khoảng 0,1 gam dược liệu. Xử lý mẫu theo quy trình

đã trình bày ở trên để thu được dung dịch tiêm sắc ký. Tiến hành làm lặp lại 6

lần trên cùng một mẫu dược liệu. Kết quả được trình bày trong Bảng 13.

Bảng 13. Kết quả đánh giá độ lặp lại

	Lần 1	Lần 2	Lần 3	Lần 4	Lần 5	Lần 6	TB	RSD (%)
$m_{\text{dược liệu}}$ (g)	0,1158	0,1144	0,1156	0,1122	0,1138	0,1148		
Hàm lượng columbianetin (%)	0,196	0,198	0,200	0,203	0,205	0,203	0,200	1,74
Hàm lượng osthole (%)	0,884	0,874	0,855	0,858	0,889	0,883	0,874	1,63

Hàm lượng trung bình của columbianetin và osthole trong mẫu dược liệu Độc hoạt lần lượt là 0,200 % và 0,874 % (tính theo khối lượng dược liệu khô tuyệt đối), với độ lệch chuẩn tương đối RSD < 2% cho thấy phương pháp xây dựng có độ lặp lại cao.

- Độ đúng

Mẫu thêm chuẩn: cân chính xác khoảng 0,1 gam bột dược liệu và thêm một lượng columbianetin và osthole chuẩn, quá trình thêm chuẩn được chuẩn bị ở 3 mức: 80 %, 100 %, 120 % và được chuẩn bị bằng cách pha dung dịch chuẩn columbianetin và osthole nồng độ 1 mg/ml, sau đó hút các thể

tích khác nhau thêm vào mẫu thử sao cho lượng chất chuẩn thêm vào lần lượt là tương ứng với 80 %, 100 %, 120 % columbianetin và osthole có trong mẫu khảo sát. Sau đó, tiến hành xử lý mẫu theo quy trình đã trình bày ở trên.

Mẫu không thêm chuẩn: cân chính xác khoảng 0,1 gam bột dược liệu và tiến hành xử lý mẫu theo quy trình đã trình bày ở trên.

Định lượng columbianetin và osthole trong mẫu thêm chuẩn và mẫu không thêm chuẩn bằng HPLC, mỗi mức thêm chuẩn được làm lặp lại 3 lần và lấy kết quả trung bình. Kết quả được trình bày trong bảng 14.

Bảng 14. Kết quả đánh giá độ đúng của phương pháp

	Mức thêm chuẩn	$M_{\text{dược liệu}}$ (g)	Nồng độ thực ($\mu\text{g/ml}$)	Nồng độ thêm chuẩn ($\mu\text{g/ml}$)	Nồng độ mẫu thêm chuẩn ($\mu\text{g/ml}$)	Nồng độ thêm chuẩn tìm lại ($\mu\text{g/ml}$)	Độ thu hồi (%)	TB (%)
Columbianetin	80%	0,1158	2,08	1,60	3,70	1,62	101,0	100,5
		0,1144	2,06		3,64	1,58	98,8	
		0,1156	2,08		3,71	1,63	101,8	

	Mức thêm chuẩn	M _{được liệu} (g)	Nồng độ thực (µg/ml)	Nồng độ thêm chuẩn (µg/ml)	Nồng độ mẫu thêm chuẩn (µg/ml)	Nồng độ thêm chuẩn tìm lại (µg/ml)	Độ thu hồi (%)	TB (%)
	100%	0,1122	2,02	2,00	4,05	2,03	101,5	100,4
		0,1138	2,05		4,01	1,96	98,1	
		0,1148	2,07		4,10	2,03	101,7	
	120%	0,1164	2,10	2,40	4,54	2,44	101,9	99,9
		0,1121	2,02		4,40	2,38	99,3	
		0,1137	2,05		4,41	2,36	98,5	
Osthole	80%	0,1158	9,11	7,00	16,22	7,11	101,6	100,5
		0,1144	9,00		16,08	7,08	101,2	
		0,1156	9,09		16,01	6,92	98,8	
	100%	0,1122	8,83	8,70	17,49	8,66	99,6	99,6
		0,1138	8,95		17,60	8,65	99,4	
		0,1148	9,03		17,72	8,69	99,9	
	120%	0,1164	9,16	10,50	19,71	10,55	100,5	100,8
		0,1121	8,82		19,33	10,51	100,1	
		0,1137	8,94		19,64	10,70	101,9	

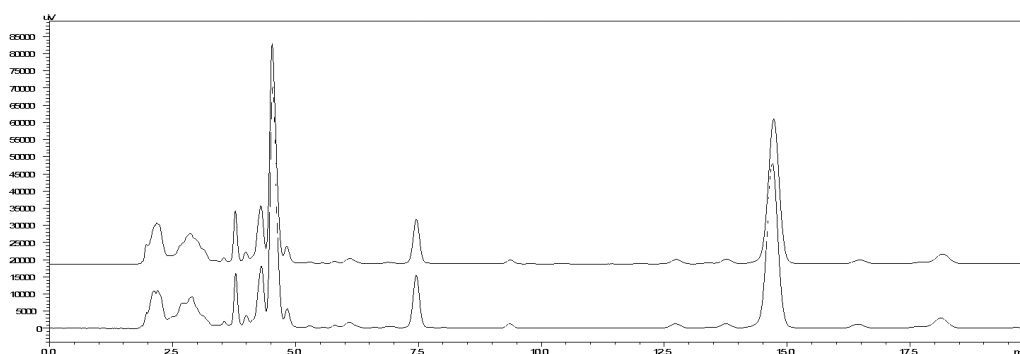
Độ thu hồi trung bình của phương pháp định lượng columbianetin và osthole trong dược liệu Độc hoạt bằng sắc ký lỏng hiệu năng cao HPLC đạt trong khoảng 98,0-102,0 %, chứng tỏ phương pháp đã xây dựng có độ đúng cao.

13. Kết quả phân tích định lượng columbianetin và osthole trên một số mẫu dược liệu Độc hoạt

Phân tích hàm lượng columbianetin và osthole trên 3 mẫu dược liệu Độc hoạt theo phương pháp đã xây dựng. Kết quả được trình bày trong Bảng 15 và Hình 12.

Bảng 15. Kết quả phân tích hàm lượng columbianetin và osthole trong các mẫu Độc hoạt

STT	Tên mẫu	Hàm lượng (%) columbianetin (tính theo khối lượng dược liệu khô kiệt)	Hàm lượng (%) osthole (tính theo khối lượng dược liệu khô kiệt)
1	M1	0,198 ± 0,002	0,884 ± 0,015
2	M2	0,200 ± 0,003	0,874 ± 0,010
3	M3	0,198 ± 0,002	0,889 ± 0,016



Hình 12. SKĐ HPLC các mẫu Độc hoạt kiểm nghiệm

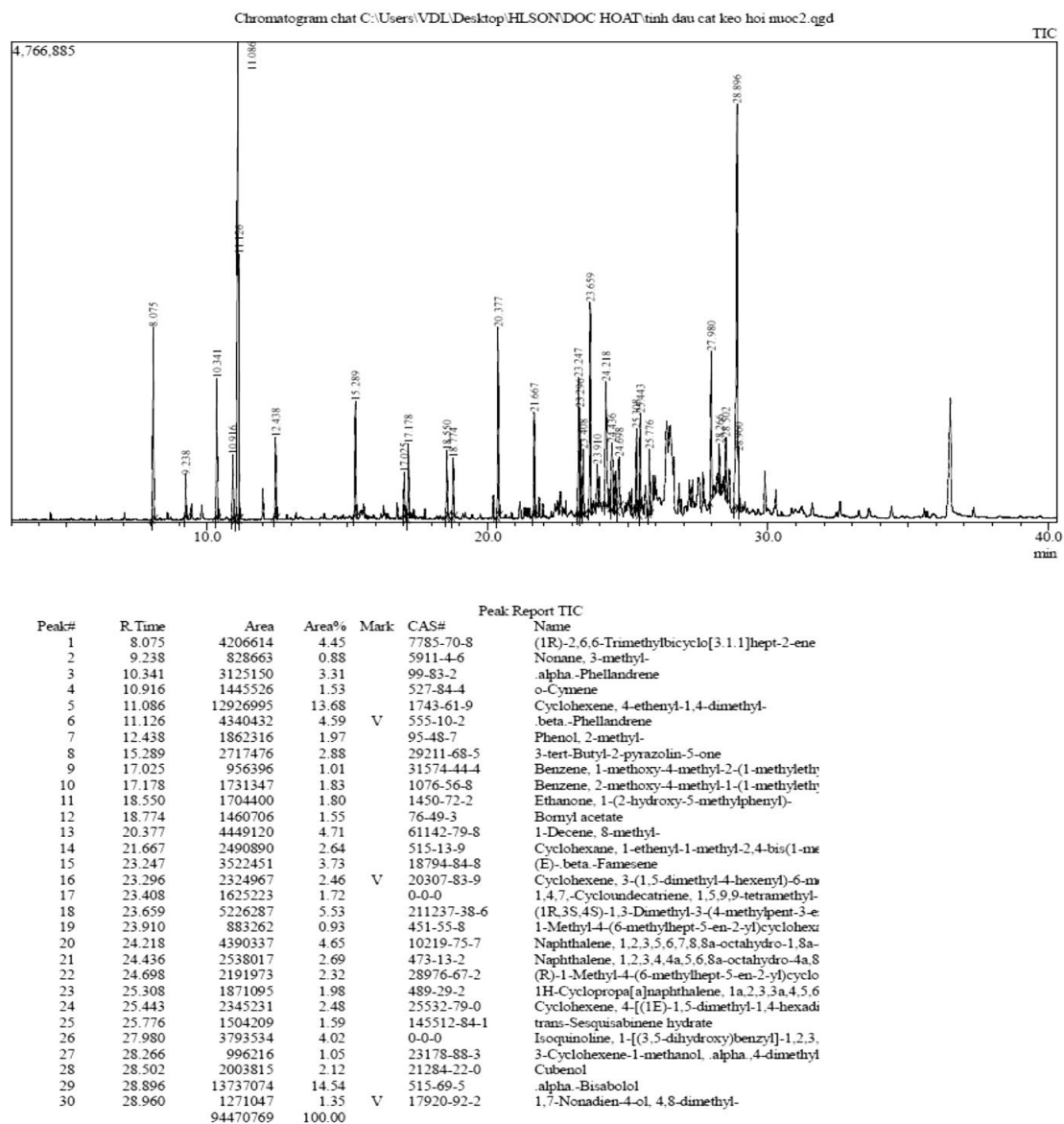
Nhận xét: Nhận thấy hàm lượng columbianetin và osthole trong các mẫu Độc hoạt kiểm nghiệm lần lượt lớn hơn 0,15 % và 0,5 % tính theo dược liệu khô kiệt (đạt yêu cầu về hàm lượng osthole theo DD Hong Kong). Tuy nhiên lượng mẫu kiểm tra chưa nhiều, cần định lượng thêm trên lượng mẫu nhiều hơn để kết quả có tính khách quan.

Tiêu chuẩn cơ sở đề xuất: Dược liệu không chứa ít hơn 0,15 % columbianetin ($C_{14}H_{14}O_4$) và không ít

hơn 0,5 % osthole ($C_{15}H_{16}O_3$) tính theo khối lượng khô kiệt.

14. Kết quả phân tích thành phần tinh dầu Độc hoạt

Tiến hành phân tích tinh dầu Độc hoạt thu được từ phương pháp cất kéo hơi nước bằng GC-MS. Theo đó, tinh dầu Độc hoạt là hỗn hợp gồm 30 thành phần với tỉ lệ từ 0,88% đến 14,54%. Hai thành phần chiếm tỉ lệ cao nhất là *Cyclohexene*, *4-ethenyl-1,4-dimethyl-* và *alpha.-Bisabolol* với tỉ lệ lần lượt là 13,68% và 14,54%. Kết quả chi tiết được trình bày ở bảng dưới:



V. KẾT LUẬN

Đã xây dựng được TCCS cho được liệu Độc hoạt với các chỉ tiêu.

- Các chỉ tiêu giữ nguyên DDVN V:
Mô tả, vi phẫu, độ ẩm, tro toàn phần, chất chiết được, định tính bằng phương pháp sắc ký bản mỏng.

- Các chỉ tiêu giữ nguyên DD Hong Kong: Soi bột, tro không tan trong acid.

- Các chỉ tiêu thay đổi, bổ sung:

Chỉ tiêu định lượng columbianetin và osthole (HPLC) qui định hàm lượng columbianetin $\geq 0,15$ % và hàm lượng osthole $\geq 0,5$ %. Phương pháp định lượng đã được thẩm định đạt yêu cầu theo hướng dẫn của ICH.

TCCS được liệu Độc hoạt được trình bày tại Phụ lục.

TÀI LIỆU TRÍCH DẪN

- [1] National institute of medicinal materials, “Cây thuốc và động vật làm thuốc ở Việt Nam I,” Science and technology publisher, 2006, pp. 807–810.
- [2] D. Tat Loi, “Những cây thuốc và vị thuốc Việt Nam,” 2006, pp. 303–304.
- [3] K. BABA, Y. MATSUYAMA, and M. KozAWA, “Studies on coumarins from the root of *Angelica pubescens* Maxim. IV. Structures of angelol-type prenylcoumarins,” *Chem. Pharm. Bull.*, vol. 30, no. 6, pp. 2025–2035, 1982.
- [4] Z. Cai-Yu②③, Z. Ben-Gang, and Y. Xiu-Wei④, “Studies on the chemical constituents of the root of *Angelica pubescens* f. *biserrata*,” *Pharm. J. Chinese People’s Lib. Army*, no. 4, p. 2, 2007.
- [5] G. Singh, R. Bhatti, R. Mannan, D. Singh, A. Kesavan, and P. Singh, “Osthole ameliorates neurogenic and inflammatory hyperalgesia by modulation of iNOS, COX-2, and inflammatory cytokines in mice,” *Inflammopharmacology*, pp. 1–12, 2018.
- [6] F.-N. Ko, T.-S. Wu, M.-J. Liou, T.-F. Huang, and C.-M. Teng, “Inhibition of platelet thromboxane formation and phosphoinositides breakdown by osthole from *Angelica pubescens*,” *Thromb. Haemost.*, vol. 62, no. 03, pp. 996–999, 1989.