

NGHIÊN CỨU XÂY DỰNG TIÊU CHUẨN CƠ SỞ CHO DƯỢC LIỆU BẠCH TRUẬT

GS, TS. DS. Phạm Xuân Sinh, TS. DS. Hoàng Lê Sơn,

ThS. DS. Nguyễn Văn Hanh, ThS. DS. Võ Tự Cường

Khoa Y Dược - Trường Đại học Thành Đông

TÓM TẮT

*Chuyên đề này nằm trong khuôn khổ của đề tài cấp Nhà nước, Mã số: 10/2017/HĐ-NVQG, ngày 20 tháng 10 năm 2017: “Nghiên cứu khai thác và phát triển nguồn gen Bạch truật (*Atractylodes macrocephala* Koidz.) và sâm Bồ Chính (*Abelmoschus sagittifolius* (Kurz) Merr.) làm nguyên liệu sản xuất thuốc tại Đắk Lắk và một số tỉnh Tây Nguyên”. Mục tiêu của chuyên đề là nghiên cứu xây dựng tiêu chuẩn cơ sở cho dược liệu Bạch truật. Bạch truật - tên khoa học *Atractylodes macrocephala* Koidz, cây thảo, sống lâu năm, cao 40 – 60 cm. Rễ Bạch truật được sử dụng làm dược liệu. Nghiên cứu đã xây dựng được TCCS cho dược liệu Bạch truật với các chỉ tiêu giữ nguyên DDVN V: Mô tả, vi phẫu, đặc điểm bột, độ ẩm, tro toàn phần, chất chiết được, định tính bằng phương pháp sắc ký bản mỏng; Các chỉ tiêu giữ nguyên DDVN Hong Kong: tro không tan trong acid; Các chỉ tiêu thay đổi, bổ sung: Dầu vân tay; Bổ sung chỉ tiêu 04 kim loại nặng (As, Pb, Cd, Hg), Dư lượng thuốc bảo vệ thực vật: Benzen hexaclorid (BHC); Chỉ tiêu định lượng atractylenolide III (HPLC) qui định hàm lượng atractylenolide III $\geq 0,019\%$; Phương pháp định lượng đã được thẩm định đạt yêu cầu theo hướng dẫn của ICH.*

Từ khóa: Tiêu chuẩn cơ sở, dược liệu Bạch truật.

ABSTRACT

*This topic is a part of the State-level project with Code: 10/2017/ HĐ-NVQG dated on October 20, 2017: “Research, exploitation and development of Atractylis gene resources (*Atractylodes macrocephala* Koidz.) and Bo Chinh ginseng (*Abelmoschus sagittifolius* (Kurz) Merr.) as raw materials for drug production in Dak Lak and some provinces in Tay Nguyen”. The objective of the topic is to study and develop basic standards for atractylis herbal medicine. Atractylis, scientific name *Atractylodes macrocephala* Koidz, is herbaceous, perennial, 40-60 cm high. Atractylis root is used medicinally. The research has established the TCCS for atractylis herbal medicine with the criteria keeping the same DVVN V: Description, microsurgery, powder characteristics, moisture, total ash, extractable substances, qualitative by thin layer chromatography method; The criteria to keep the Hong Kong DDVN unchanged: ash insoluble in acid; Indicators changed and supplemented: Fingerprints; Adding*

indicators of 04 heavy metals (As, Pb, Cd, Hg), Residues of pesticides: Benzene hexachloride (BHC). Quantitative criteria of atractylenolide III (HPLC) specify atractylenolide III content $\geq 0.019\%$. The quantitative method was validated according to the ICH guidelines.

Keywords: basic standards, *Atractylis* herbal medicine

1. MỞ ĐẦU

Bạch truật có tên khoa học *Atractylodes macrocephala* Koidz. Cây thảo, sống lâu năm, cao 40 – 60 cm. Bạch truật xuất xứ từ Trung Quốc, được trồng nhiều ở Triết Giang, Hồ Nam. Cây được nhập vào Việt Nam đầu những năm 60 và được trồng ở Sa Pa (Lai Châu), Bắc Hà (Lào Cai). Đến đầu những năm 70, cây được đưa về trồng và sản xuất ở vùng ngoại thành Hà Nội và các tỉnh lân cận. Bạch truật thích nghi cao với khí hậu vùng á nhiệt đới núi cao, chịu được khí hậu lạnh, có khi tới 0°C hoặc thấp hơn.

Bạch truật dùng theo kinh nghiệm dân gian như một vị thuốc bổ dưỡng và dùng để điều trị các chứng bệnh đau dạ dày, bụng trướng đầy, nôn mửa, chậm tiêu, thấp nhiệt, tiêu chảy, phân sống, viêm ruột mạn tính, an thai trong trường hợp có thai đau bụng, ốm nghén nôn ọe, chữa sốt trong các trường hợp sốt ra mồ hôi, phù thũng. Liều dùng hàng ngày khoảng 6 – 12 g dưới dạng thuốc sắc hoặc thuốc bột. Các nghiên cứu dược lý chỉ ra Bạch truật có tác dụng chống loét dạ dày trên các mô hình thực nghiệm và làm giảm rõ rệt lượng dịch vị tiết ra.

Trong khuôn khổ của đề tài “Nghiên cứu khai thác và phát triển nguồn gen Bạch truật (*Atractylodes*

macrocephala Koidz.) và sâm Bồ Chính (*Abelmoschus sagittifolius*) (Kurz Merr.) làm nguyên liệu sản xuất thuốc tại Đắc Lắc và một số tỉnh Tây Nguyên”, Mã số: 10/2017/HĐ-NVQG, ngày 20 tháng 10 năm 2017, Bạch truật được thu hái ở Đắc Lắc làm nguyên liệu nghiên cứu làm thuốc. Trong chuyên đề này, nhóm nghiên cứu xây dựng tiêu chuẩn cơ sở cho dược liệu Bạch truật với các nội dung:

- Mô tả dược liệu, vi phẫu, đặc điểm bột, độ ẩm, tro toàn phần, định tính bằng sắc ký bản mỏng (Áp dụng ĐĐVN V);
- Tro không tan trong acid (Áp dụng ĐĐVN Hong Kong)
- Định lượng hoạt chất chính.
- Xác định dư lượng kim loại nặng (As, Pb, Hg, Cd); dư lượng thuốc bảo vệ thực vật.

2. TỔNG QUAN VỀ BẠCH TRUẬT

2.1. Mô tả, bộ phận dùng

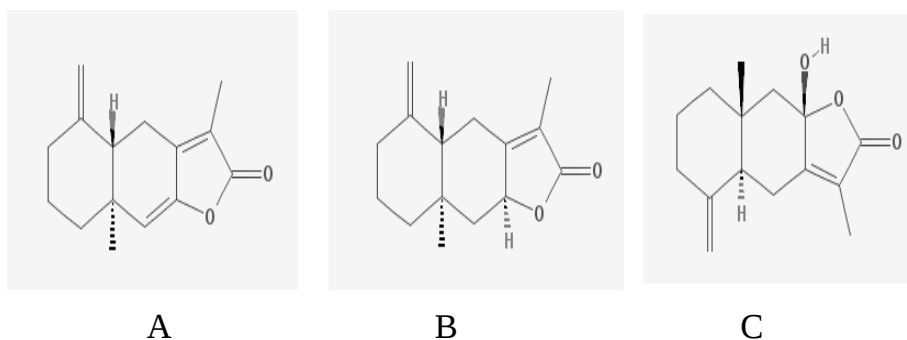
Bạch truật có tên khoa học *Atractylodes macrocephala* Koidz. Cây thảo, sống lâu năm, cao 40 – 60 cm. Thân hình trụ, mọc đứng, phía trên phân nhánh, phía dưới hóa gỗ. Lá mọc so le, lá phía dưới có cuống dài, xẻ sâu 3 thùy; lá gần ngọn có cuống ngắn, không chia thùy, mép có khía răng. Cụm hoa mọc ở đầu cành, mỗi đầu gồm nhiều hoa hình

ông. màu tím. Quả bé, hình cầu, hoặc bầu dục, hơi dẹt.

Bộ phận dùng: Rễ củ thu hoạch vào tháng 6 – 7 và tháng 12. Rễ củ đào về, cắt bỏ rễ con, rửa sạch, sấy hay phơi khô. Dược liệu Bạch truật có hình dạng thay đổi, có nhiều mấu phình ra, phía trên thót nhỏ lại, dài 5 – 10 cm, đường kính 2 – 5 cm. Mặt ngoài màu nâu xám, có vân hình hoa cúc, nhiều nếp nhăn dọc. Thễ chất cứng chắc, khó bẻ gãy, ruột trắng ngà, rải rác có khoang tinh dầu, mùi thơm nhẹ [1].

2.2. Thành phần hóa học

Rễ Bạch truật chứa tinh dầu (khoảng 1,4 %). Thành phần tinh dầu chủ yếu gồm atractylon, acetoxy atractylon, hydroxy atractylon, atractylon kal... [3]. Ngoài ra, rễ Bạch truật còn chứa các sesquiterpen: α – eudesmol, β – eudesmol; các dẫn chất lacton như atractylenolid I, II, III; polyacetylenes (tetradeca-4E,6E,12E-triene-8,10-diyne-1,3,14-triol và các đồng phân); coumarin (scopoletin); sitosterol và acid palmitic [1] [5] [6] [7].



Hình 2.1. Cấu trúc của atractylenolide

A – Atractylenolide I

B – Atractylenolide II

C – Atractylenolide III

2.3. Tác dụng sinh học

- **Tính vị, công năng:** Bạch truật có vị ngọt đắng, mùi thơm nhẹ, tính ấm. Có tác dụng kiện tỳ, táo thấp, chỉ tả, hòa trung, lợi thủy, an thai [1].

- **Công dụng:** Bạch truật được xem là vị thuốc bổ, bồi dưỡng và được dùng điều trị các chứng bệnh đau dạ dày, bụng trướng đầy, nôn mửa, chậm tiêu, tiêu chảy, phân sống, viêm ruột mạn tính, an thai trong trường hợp có thai đau bụng, ốm nghén nôn ọe, chữa sốt trong các trường hợp sốt ra mồ hôi, phù thũng. Ngày dùng 6 - 12 g dưới dạng thuốc sắc [1].

Theo y học Trung Quốc, Bạch truật được dùng uống để chống phù, có tác dụng lợi tiểu và làm tăng tiết mồ hôi; chữa ho dưới dạng nước sắc hay phối hợp với một số vị thuốc khác để chữa đái tháo đường. Theo y học cổ truyền Nhật Bản, Bạch truật được dùng làm thuốc lợi tiểu trong các trường hợp tiểu ít, tiểu buốt, hoa mắt; tăng cường tiêu hóa; chữa đau mình mẩy, ho đờm nhiều.

- **Tác dụng dược lý:** Bạch truật có tác dụng ức chế loét dạ dày rõ ràng qua 3 mô hình: Gây loét dạ dày thực nghiệm, tạo nên những tổn thương có bệnh sinh khác nhau; loét Shay bằng

cách thất môn vị, có khả năng gây nên tình trạng ứ dịch vị dạ dày và tổn thương mạch máu và loét do nhện đói có thể do nguồn gốc tâm lý. Cơ chế tác dụng có thể do Bạch truật làm giảm rõ rệt lượng dịch vị [6].

Hoạt tính chống viêm của Bạch truật được thể hiện rõ trên giai đoạn cấp tính của phản ứng viêm qua mô hình gây phù bằng kaolin. Ngoài ra, Bạch truật cũng thể hiện tác dụng ức chế sự tạo thành tổ chức hạt trong mô hình u hạt thực nghiệm với amian cho thấy tác dụng trên giai đoạn bán cấp của phản ứng viêm [6]. Cơ chế của tác dụng có thể do Bạch truật ức chế tác dụng của nitric oxyd (NO), prostaglandin E₂ (PGE₂), làm giảm biểu hiện của các cytokins (IL - 1 β , IL - 6...) [7].

Ngoài ra, Bạch truật cũng đã được chứng minh có tác dụng ức chế tế bào ung thư phổi [8], tăng cường miễn dịch, bảo vệ tế bào gan, chống oxy hóa [9], giảm co bóp tử cung và ức chế hình thành tế bào mỡ trên các mô hình thực nghiệm [10].

3. NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

3.1. Đối tượng nghiên cứu

Dược liệu dùng cho nghiên cứu là rễ của cây Bạch truật (*Atractylodes macrocephala* Koidz.), họ Cúc (*Asteraceae*). 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.

3.2. 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.
- 3) Soi bột: Thử theo ĐĐVN V, phụ lục 12.18 - Định tính dược liệu và các chế phẩm bằng kính hiển vi.
- 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) Chất chiết được trong dược liệu: Tiến hành theo phương pháp chiết nóng (Phụ lục 12.10). Chất chiết được trong dược liệu không dưới 3 % tính theo dược liệu khô kiệt.
- 8) Kim loại nặng: Thử theo ĐĐVN V, phụ lục 9.4.11.
- 9) Dư lượng thuốc bảo vệ thực vật: Thử theo ĐĐVN V, phụ lục 12.17.
- 10) Định tính: Thử theo ĐĐVN V, Phụ lục 5.4: Phương pháp sắc ký lớp mỏng.
- 11) Dầu vân tay: Trên SKĐ của dung dịch thử phải có 5 pic với giá trị RRT thuộc khoảng chấp nhận của các pic tương ứng trên SKĐ dầu vân tay chuẩn.
- 12) Định lượng: Định lượng đồng thời atractylenolide III: Thử theo ĐĐVN V. Phụ lục 5.3 - Phương pháp sắc ký lỏng. Hàm lượng (%) atractylenolide III trong

mẫu thử (tính theo được 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.

4. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

Dược liệu dùng là rễ đã phơi hay sấy khô của Bạch truật [*Atractylodes macrocephala* Koidz], họ Cúc (*Asteraceae*).

4.1. Đánh giá cảm quan

Thân rễ to (quen gọi là củ) có hình dạng thay đổi, hình chùy có nhiều mấu phình ra, phía trên thót nhỏ lại, hoặc từng khúc mập, nạc, dài 5 - 10 cm, đường kính 2 - 5 cm. Mặt ngoài màu nâu nhạt hoặc xám, có nhiều mấu, có vân hình hoa cúc, có nhiều nếp nhăn dọc. Chất cứng khó bẻ gãy, mặt cắt không phẳng, có màu vàng đến nâu nhạt, rải rác có khoang chứa tinh dầu màu nâu vàng, mùi đặc trưng (Hình 4.1).



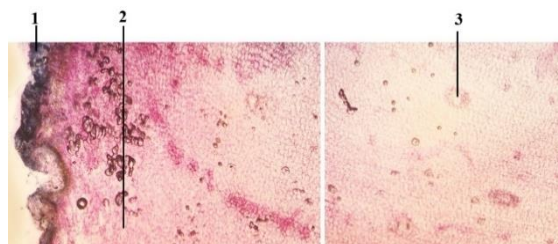
Hình 4.1. Hình ảnh dược liệu Bạch truật nghiên cứu

4.2. Vi phẫu

Lớp bản (1) gồm nhiều hàng tế bào xếp khá đều đặn. Mô mềm gồm những tế bào thành mỏng. Rải rác trong mô mềm có các khoang chứa tinh dầu (3) (Hình 4.2).

Hình 4.2. Vi phẫu dược liệu Bạch truật

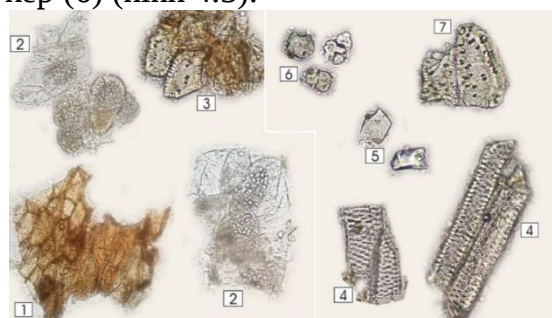
1. Bản, 2. Mô mềm, 3.



Khoang chứa tinh dầu

4.3. Bột

Bột có màu vàng nâu, mùi thơm đặc trưng, vị đắng nhẹ. Quan sát trên kính hiển vi thấy: Mảnh bản gồm những tế bào hình đa giác, thành dày, màu nâu (1). Tế bào mô cứng hình nhiều cạnh, vách dày, có lỗ trao đổi (3,7). Mảnh mô mềm mang tinh bột (2). Mảnh mạch mạng hay mạch chằm (4). Tinh thể canxi oxalat hình khối. Hạt tinh bột đơn hoặc kép (6) (hình 4.3).



Hình 4.3. Một số đặc điểm bột Bạch truật

1. Mảnh bản; 2. Mảnh mô mềm mang tinh bột; 3,7. Tế bào cứng; 4. Mảnh mạch; 5. Tinh thể canxi oxalat; 6. Tinh bột

Nhận xét: Thấy rằng, mẫu Bạch truật nghiên cứu có các đặc điểm mô tả, vi phẫu và đặc điểm bột như yêu cầu của ĐĐVN V.

Tiêu chuẩn đề xuất: Tiêu chí mô tả, vi phẫu và bột, giữ nguyên như yêu cầu ĐĐVN V.

Mô tả: Thân rễ to (quen gọi là củ) có hình dạng thay đổi, hình chùy có nhiều mấu phình ra, phía trên thót nhỏ lại, hoặc từng khúc mập, nạc, dài 5 - 10 cm, đường kính 2 - 5 cm. Mặt ngoài màu nâu nhạt hoặc xám, có nhiều mấu, có vân hình hoa cúc, có nhiều nếp nhăn dọc. Chất cứng khó bẻ gãy, mặt cắt không phẳng, có màu vàng đến nâu nhạt, rải rác có khoang chứa tinh dầu màu nâu vàng, mùi đặc trưng.

Bột: Lốp bản gồm nhiều hàng tế bào xếp khá đều đặn. Lốp mô mềm gồm những tế bào hình nhiều cạnh, có thành

mỏng, có khoang chứa tinh dầu và rải rác có các tinh thể calci oxalat hình kim. Phía trên libe có những đám tế bào mô cứng đa số hóa sợi. Tầng phát sinh libe-gỗ thành vòng rõ rệt. Libe-gỗ xếp thành tia tỏa tròn. Tia ruột hẹp

Vi phẫu: Bột có màu vàng nâu, mùi thơm đặc trưng, vị đắng. Soi kính hiển vi thấy: Mảnh bản gồm những tế bào hình nhiều cạnh, thành dày. Tế bào mô cứng hình nhiều cạnh, thành dày, có lỗ trao đổi. Mảnh mô mềm chứa tinh thể calci oxalat hình cầu gai và có các khoang chứa tinh dầu có màu nâu đến nâu vàng. Tinh thể calci oxalat hình kim có đầu nhọn nằm riêng rẽ hay thành đám. Mảnh mạch vạch, mạch mạng. Khối nhựa màu vàng, nâu, đỏ

4.4. Độ ẩm

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

Bảng 4.1. Kết quả phân tích độ ẩm của các mẫu dược liệu Bạch truật

Tên mẫu	M1	M2	M3	Kết luận (theo ĐĐVN V)
Độ ẩm không quá 14,0 (%)	9,103	11,284	12,945	Đạt ($\leq 14\%$)

Nhận xét: Nhận thấy các mẫu dược liệu Bạch truật nghiên cứu đều có độ ẩm dưới 14 % đạt theo yêu cầu của ĐĐVN V, chuyên luận Bạch truật.

Tiêu chuẩn cơ sở: Độ ẩm không quá 14,0 % (theo yêu cầu của ĐĐVN V).

4.5. Tro toàn phần

Thử theo ĐĐVN V, Phụ lục 9.8 - Xác định tro toàn phần.

Bảng 4.2. Kết quả phân tích tro toàn phần của các mẫu dược liệu Bạch truật

Tên mẫu	M1	M2	M3	Kết luận (theo ĐĐVN V)
Tro toàn phần không quá 5,0 %	3,7	3,1	4,2	Đạt ($\leq 5,0\%$)

Nhận xét: Nhận thấy các mẫu được liệu Bạch truyệt nghiên cứu đều có tro toàn phần dưới 5,0 % đạt theo yêu cầu của ĐĐVN V, chuyên luận Bạch truyệt. **Tiêu chuẩn đề xuất:** Tro toàn phần không quá 5,0% (theo yêu cầu của ĐĐVN V).

4.6. Tro không tan trong acid

Thử theo ĐĐVN V, Phụ lục 9.7- Xác định tro không tan trong acid.

Bảng 4.3. Kết quả phân tích tro không tan trong acid của các mẫu được liệu Bạch truyệt

Tên mẫu	M1	M2	M3	Kết luận (theo ĐĐ Hong Kong)
Tro không tan trong acid không quá 0,5 %	0,1	0,2	0,1	Đạt (≤ 0,5 %)

Nhận xét: Nhận thấy các mẫu được liệu Bạch truyệt nghiên cứu đều có tro không tan trong acid dưới 0,5 % đạt theo yêu cầu của ĐĐ Hong Kong, chuyên luận Bạch truyệt.

Tiêu chuẩn đề xuất: Tro không tan trong acid không quá 0,5 % (theo yêu cầu của ĐĐ Hong Kong).

4.7. Chất chiết được trong dược liệu

Kết quả chất chiết được trong ethanol 96% của các mẫu Bạch truyệt được trình bày ở Bảng 4.4.

Bảng 4.4. Kết quả chất chiết được các mẫu được liệu Bạch truyệt

Tên mẫu	M1	M2	M3	Kết luận (theo ĐĐVN V)
Chất chiết được trong ethanol 96%	4,5 ± 0,2	5,1 ± 0,3	4,7 ± 0,2	Đạt (≥ 3,0 %)

4.8. 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 4.5. Kết quả phân tích kim loại nặng mẫu được liệu Bạch truyệt

Kim loại nặng	As	Cd	Hg	Pb
Hàm lượng (mg/kg)	0,01	0,046	< 0,006	0,042

Nhận xét: Nhận thấy các mẫu được liệu Bạch truyệt nghiên cứu đều có dư lượng kim loại nặng rất thấp, ĐĐVN V chuyên luận Bạch truyệt 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 DD một số nước có yêu cầu chung về dư lượng kim loại nặng như DD 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 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	≤ 0,2	≤ 5

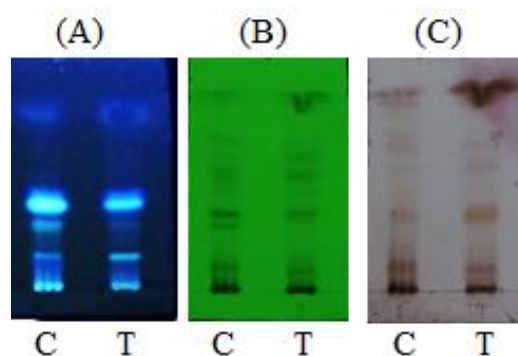
4.9. Dư lượng thuốc bảo vệ thực vật

Nhận xét: Kết quả kiểm tra dư lượng thuốc bảo vệ thực vật trong các mẫu Bạch truật, không phát hiện tồn dư thuốc bảo vệ thực vật. DDVN 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 Bạch truật qui định Benzen hexaclorid (BHC): Không quá 0,2 phần triệu.

4.10. Định tính

Thử theo phương pháp sắc ký lớp mỏng, DDVN V, phụ lục 5.4. Kết quả được trình bày tại (Hình 4.4).



Hình 4.4. Hình ảnh SKĐ sắc ký lớp mỏng định tính Bạch truật

(A)-SKĐ quan sát ở 254 nm;

(B)-SKĐ quan sát ở 366 nm;

(C)-SKĐ hiện màu bằng H_2SO_4 .

Ghi chú: C. Mẫu Bạch truật đối chiếu; T. Mẫu Bạch truật thí nghiệm, Dung môi khai triển: ether dầu hỏa - ethylacetat (50 : 1).

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 Bạch truật.

Tiêu chuẩn đề xuất

- **Định tính:** Thử theo DDVN V, Phụ lục 5.4, Phương pháp sắc ký lớp mỏng

- **Bản mỏng:** Silica gel 60F₂₅₄.

- **Dung môi khai triển:** ether dầu hỏa - ethylacetat (50 : 1).

- **Dung dịch thử:** Lấy 0,5 g bột dược liệu, thêm 5 ml n-hexan (TT), cho vào bình kín, lắc khoảng 30 phút. Lọc, lấy dịch lọc được dung dịch thử.

- **Dung dịch đối chiếu:** Lấy 0,5 g bột Bạch truật (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 10 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 366 nm, rồi phun dung dịch vanilin 1 % trong dung dịch acid sulfuric 5 %. Sấy bản mỏng ở 60°C trong 15 phút đến khi các vết hiện rõ.

- **Kết quả:** Trên SKĐ của dung dịch thử phải có các vết phát huỳnh quang cùng màu và cùng giá trị R_f với các vết trên SKĐ của dung dịch đối chiếu.

4.11. Dấu vân tay

Kiểm tra tính thích hợp hệ thống

Tiến hành tiêm lặp lại 5 lần mẫu dung dịch chuẩn có nồng độ 100 µg/ml, ghi lại thời gian lưu và diện tích pic. Kết quả được trình bày ở Bảng 4.6.

Bảng 4.6. Kết quả kiểm tra tính thích hợp hệ thống

STT	Diện tích pic (mAU.s)	Thời gian lưu (phút)
1	18,298	2461416
2	18,305	2489823
3	18,342	2490506
4	18,287	2501107
5	18,299	2478905
Trung bình	18,306	2484351
RSD (%)	0,11	0,61

Độ lệch chuẩn tương đối của diện tích pic và thời gian lưu đều nhỏ hơn 2%. Số đĩa lý thuyết của pic atractylenolide III là 269253 (> 80000). 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 Bạch truật 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 4.7. Giá trị RRT của 5 pic đặc trưng trên SKĐ của mẫu dược liệu Bạch truật

Pic	RRT
1 (marker, atractylenolide III)	1
2	1,06
3	1,10
4	1,57
5	2,04

Trên SKĐ của dung dịch thử có 5 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 1,0 mg, hòa tan trong 10 mL ethanol., thu được dung dịch chuẩn có nồng độ khoảng 100 µg/ml.

- **Dung dịch thử:** Cân chính xác khoảng 1,0 g bột dược liệu vào bình nón 50 ml, thêm 20 ml ethanol. Siêu âm (90 W) trong 30 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: 220 nm.

Tốc độ dòng: 1 ml/phút

Thể tích tiêm: 10 µl

Pha động: Acetonitril: H₂O, gradient:

Thời gian (phút)	Acetonitril	Nước	Phương pháp khai triển
0 – 5	20	80	Đẳng dòng
5 – 10	20 → 60	80 → 40	Gradient
10 – 25	60 → 100	40 → 0	Gradient
25 - 40	100	0	Đẳng dòng

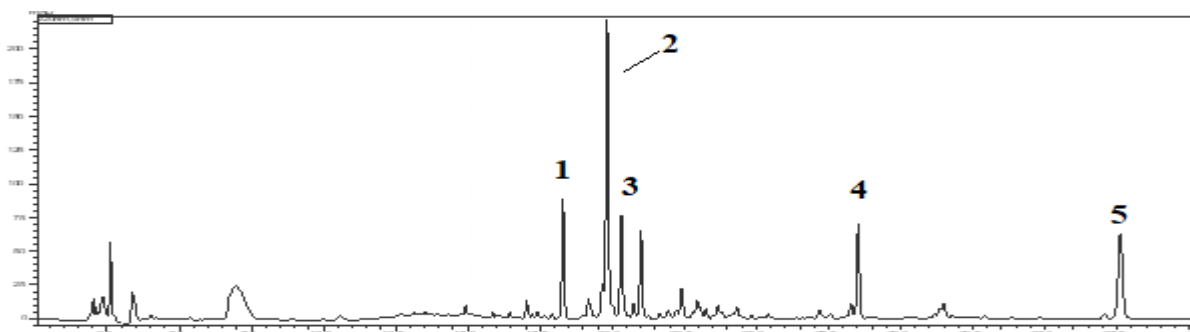
Kiểm tra tính thích hợp hệ thống: Tiến hành tiêm lặp lại ít nhất 5 lần dung dịch chuẩn, ghi lại thời gian lưu và diện tích pic. Giá trị RSD % của diện tích pic và thời gian không quá 5,0 %. Số đĩa lý thuyết của pic atractylenolide III không ít hơn 80000. Hệ số phân giải Rs giữa pic số 1 và pic liền kề không ít hơn 1,5.

Tiến hành: Khai triển dung dịch chuẩn và dung dịch thử, ghi lại SKĐ. Đánh giá thời gian lưu của pic atractylenolide III và năm pic đặc trưng trên SKĐ của dung dịch thử. Xác định pic atractylenolide III trên SKĐ của dung dịch thử bằng cách so sánh với thời gian lưu của pic atractylenolide III trên

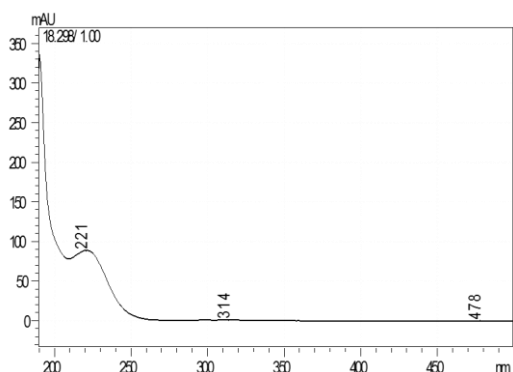
SKĐ của dung dịch chuẩn. Sự sai khác thời gian lưu của không quá 2,0 %. Xác định RRTs của các pic đặc trưng trên SKĐ của dung dịch thử. RRTs $\pm$ SD của 5 pic đặc trưng của dịch chiết Bạch truật được trình bày ở Bảng 4.8.

Bảng 4.8. Giá trị RRT của 6 pic đặc trưng trên dấu vân tay chuẩn của Bạch truật

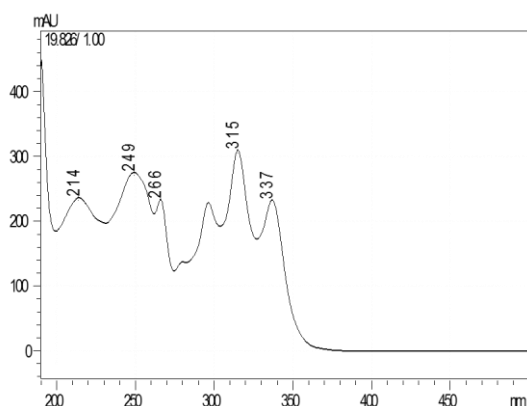
Pic	RRT	SD
1 (marker, atractylenolide III)	1	-
2	1,08	$\pm 0,03$
3	1,11	$\pm 0,03$
4	1,56	$\pm 0,03$
5	2,06	$\pm 0,03$



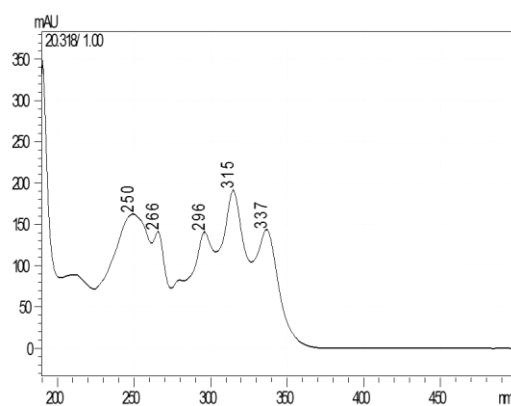
Hình 4.5. Dấu vân tay chuẩn của dịch chiết Bạch truật



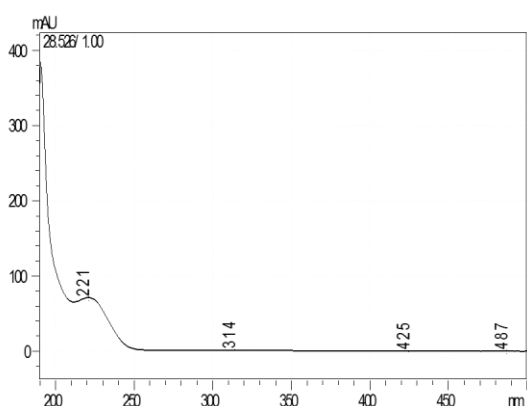
(1)



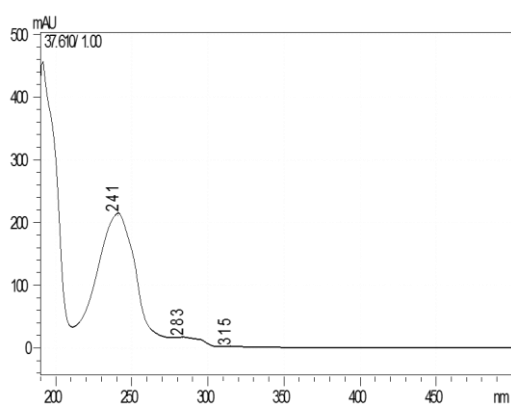
(2)



(3)



(4)



(5)

Hình 4.6. Phổ hấp thụ UV – Vis của 05 pic đánh dấu trên dấu vân tay của dược liệu Bạch trưật

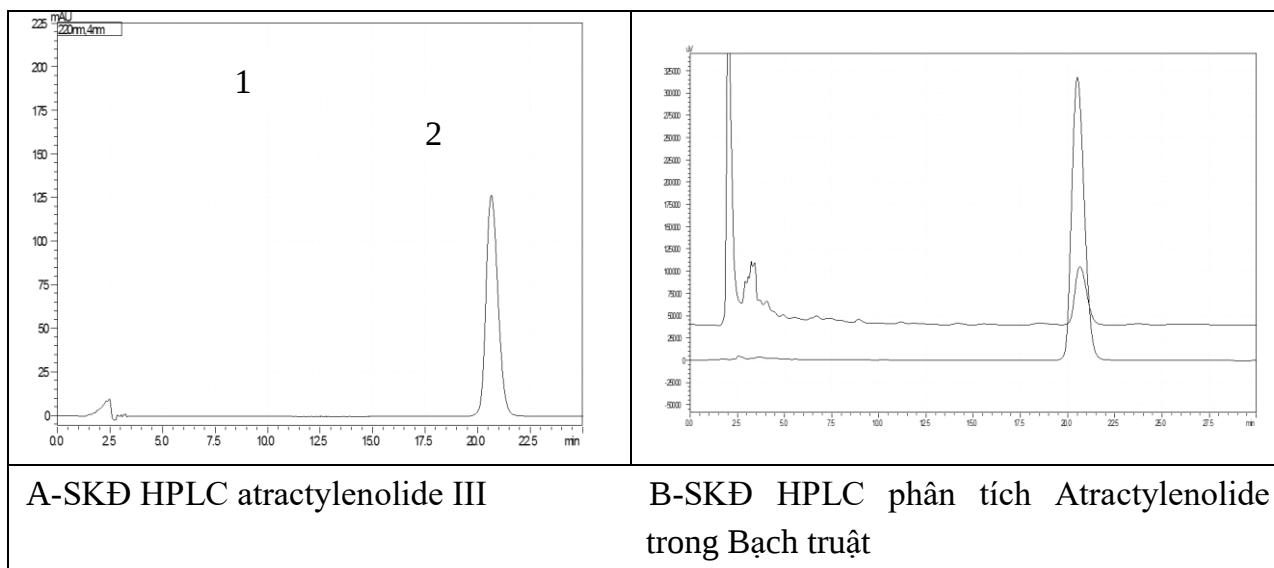
Kết quả: Trên SKĐ của dung dịch thử phải có 5 pic với giá trị RRT thuộc khoảng chấp nhận của các pic tương ứng trên SKĐ dấu vân tay chuẩn.

4.12. 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 đã nêu trong mục 2.2 (12) 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 4.7 và bảng 4.9.



Hình 4.7. SKĐ HPLC các mẫu phân tích

(1-Mẫu trắng; 2- Mẫu thử; 3-Mẫu thử thêm chuẩn; 4- Mẫu chuẩn)

Bảng 4.9. Các thông số đánh giá đối với atractylenolide III

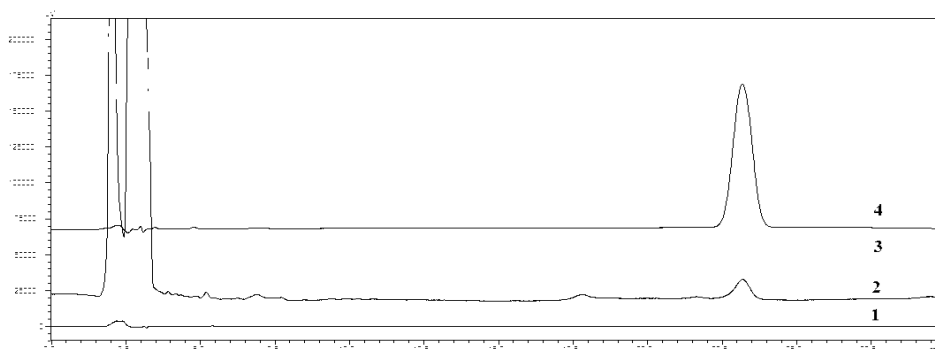
STT	Thông số đánh giá	Giá trị
1	Thời gian lưu, t_R	23,356
2	Độ phân giải, R	1,892
3	Hệ số kéo đuôi peak	1,144
4	Số đĩa lý thuyết	19215

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 atractylenolide III trong dược liệu Bạch truật.

2) Thẩm định phương pháp phân tích

- **Tính chọn lọc của phương pháp:** Tiến hành phân tích 3 mẫu: dung dịch atractylenolide III chuẩn, dung dịch mẫu thử, dung dịch mẫu thử thêm chuẩn atractylenolide III 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 4.8. SKĐ đánh giá tính chọn lọc của phương pháp

1-Mẫu trắng; 2-Mẫu thử dược liệu Bạch truật;

3-Mẫu thử dược liệu Bạch truật thêm chuẩn atractylenolide III;

4-Mẫu chuẩn atractylenolide III

Trên SKĐ thu được cho thấy, thời gian lưu của atractylenolide III ở 3 mẫu là tương đương nhau, pic atractylenolide III không bị trùng với các pic khác khác, diện tích pic atractylenolide III trong mẫu thử thêm chuẩn tăng lên tương ứng với lượng chuẩn thêm vào so với diện tích pic atractylenolide III 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 atractylenolide III, sau đó pha loãng dần đến khi trên sắc kí 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:

Atractylenolide III: Tại nồng độ 0,215 (µg/ml) và 0,065 (µg/ml) tỷ lệ S/N tương ứng là 10 và 3. Với kết quả này chúng tôi xác định:

+ Giới hạn phát hiện (LOD): 0,065 (µg/ml).

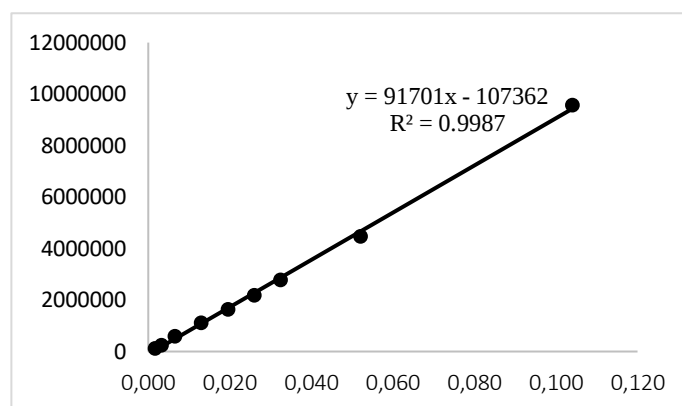
+ Giới hạn định lượng (LOQ): 0,215 (µg/ml).

- Xác định khoảng tuyến tính và xây dựng đường chuẩn

Chuẩn bị một dãy gồm dung dịch atractylenolide III chuẩn có nồng độ tăng dần từ 1,625 µg/ml đến 104 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 4.10.

Bảng 4.10. Quan hệ tuyến tính giữa nồng độ và diện tích của pic atractylenolide III

Nồng độ (mg/ml)	Diện tích pic (mAU.s)	Nồng độ tính lại từ đường chuẩn (mg/ml)	Độ chệch (%)
1,625	120783	1,987	18,2
3,250	243363	3,824	15,0
6,500	587771	7,580	14,2
13,000	1111158	13,287	2,2
19,500	1643712	19,095	2,1
26,000	2188350	25,034	3,9
32,500	2797135	31,673	2,6
52,000	4468481	49,899	4,2
104,000	9566241	105,490	1,4
Phương trình đường chuẩn		Y= 91701x – 107362	
Hệ số tương quan		R² = 0,9987	



Hình 4.9. Đường chuẩn biểu diễn mối quan hệ giữa nồng độ atractylenolide 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 3.10** 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 atractylenolide III.

- 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 atractylenolide III có nồng độ lần lượt là 26 $\mu\text{g/ml}$. Kết quả được trình bày trong **Bảng 4.11**.

Bảng 4.11. Kết quả đánh giá tính thích hợp hệ thống

	Thời gian lưu (phút)	Diện tích pic (mAU.s)
1	23,169	2611305
2	23,152	2572585
3	23,363	2604363
4	23,398	2626525
5	23,445	2687905
TB	23,305	2620537
RSD (%)	0,582	1,621

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 atractylenolide III.

- Độ lặp lại

Tiến hành: Cân chính xác khoảng 0,4 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 4.12**.

Bảng 4.12. Kết quả đánh giá độ lặp lại

	Lần 1	Lần 2	Lần 3	Lần 4	Lần 5
Khối lượng dược liệu (g)	0,2130	0,2107	0,2115	0,2128	0,2123
Hàm lượng atractylenolide III (%)	0,0405	0,0389	0,0404	0,0391	0,0399
TB hàm lượng (%)	0,0398				
RSD (%)	1,84				

Hàm lượng trung bình của atractylenolide III trong mẫu dược liệu Bạch truật là 0,398 % (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 0,4 gam bột dược liệu và thêm một lượng atractylenolide III chuẩn, quá trình thêm chuẩn được tiến chuẩn bị ở 3 mức: 80 %, 100 %, 120 % và được chuẩn bị bằng cách pha dung dịch chuẩn atractylenolide III 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 % atractylenolide III 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 0,4 gam bột dược liệu và tiến hành xử lý mẫu theo quy trình đã trình bày ở trên.

Định lượng atractylenolide III 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 4.13.

Bảng 4.13. Kết quả đánh giá độ đúng của phương pháp

	Mức thêm chuẩn	M _{dược 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 (%)
Atractylenolide III	80%	0,2168	16,39	12	28,31	11,92	99,3	98,5
		0,2154	16,29		28,05	11,76	98,0	
		0,2166	16,38		28,17	11,79	98,3	
	100%	0,2132	16,12	16	31,96	15,84	99,0	99,5
		0,2148	16,24		31,94	15,70	98,1	
		0,2158	16,32		32,54	16,22	101,4	
	120%	0,2154	16,29	20	35,95	19,66	98,3	100,0
		0,2131	16,11		36,07	19,96	99,8	
		0,2147	16,24		36,61	20,37	101,9	

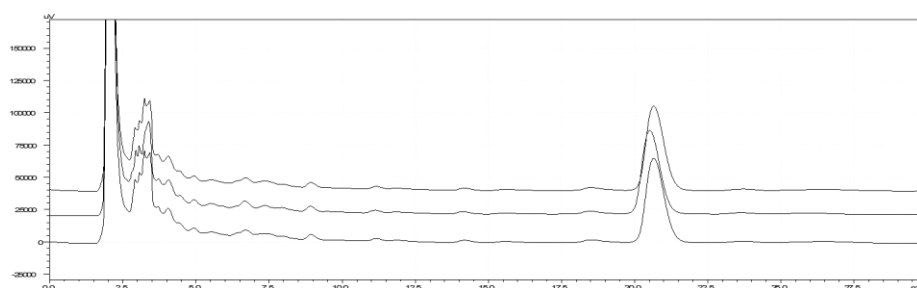
Độ thu hồi trung bình của phương pháp định lượng atractylenolide III trong dược liệu Bạch truật bằng sắc ký lỏng hiệu năng cao HPLC đạt trong khoảng 98,0-102,0 %, chứng tỏ phương pháp đã xây dựng có độ đúng cao.

4.13. Kết quả phân tích định lượng atractylenolide III trên một số mẫu dược liệu Bạch truật

Phân tích hàm lượng atractylenolide III trên 3 mẫu dược liệu Bạch truật theo phương pháp đã xây dựng. Kết quả được trình bày trong Bảng 4.14 và Hình 4.10.

Bảng 4.14. Kết quả phân tích hàm lượng atractylenolide III trong các mẫu Bạch truật

STT	Tên mẫu	Hàm lượng (%) Atractylenolide III (tính theo khối lượng dược liệu khô kiệt)
1	M1	0,0374 ± 0,002
2	M2	0,0249 ± 0,003
3	M3	0,0325 ± 0,002



Hình 4.10. SKD HPLC các mẫu Bạch truật kiểm nghiệm

Nhận xét: Nhận thấy hàm lượng atractylenolide III trong các mẫu Bạch truật kiểm nghiệm lớn hơn 0,019 % tính theo dược liệu khô kiệt (đạt yêu cầu về hàm lượng atractylenolide III theo ĐĐVN 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 0,019 % atractylenolide III ($C_{15}H_{20}O_3$) tính theo khối lượng khô kiệt.

5. KẾT LUẬN

Đã xây dựng được TCCS cho dược liệu Bạch truật với các chỉ tiêu.

- Các chỉ tiêu giữ nguyên ĐĐVN

V: Mô tả, vi phẫu, đặc điểm bột, độ ẩm, tro toàn phần, chất chiết được, định tính bằng phương pháp sắc ký bản mỏng.

- Các chỉ tiêu giữ nguyên ĐĐVN

Hong Kong: tro không tan trong acid.

- Các chỉ tiêu thay đổi, bổ sung:

+ Dầu vân tay

+ Bổ sung chỉ tiêu 04 kim loại nặng (As, Pb, Cd, Hg).

+ Dư lượng thuốc bảo vệ thực vật: Benzen hexaclorid (BHC).

+ Chỉ tiêu định lượng atractylenolide III (HPLC) qui định hàm lượng atractylenolide III $\geq 0,019$ %. Phương pháp định lượng đã được thẩm định đạt yêu cầu theo hướng dẫn của ICH.

TÀI LIỆU TRÍCH DẪN

- [1] Đỗ Tất Lợi, “Những cây thuốc và vị thuốc Việt Nam,” 2006, pp. 303–304.
- [2] Hội đồng Dược điển, Ed., *Dược điển Việt Nam V*, 1st ed. Nhà xuất bản Y học, 2015.
- [3] J. Li *et al.*, “Chemical Composition and Synergistic Antioxidant Activities of Essential Oils from *Atractylodes Macrocephala* and *Astragalus Membranaceus*,” *Nat. Prod. Commun.*, vol. 8, no. 9, p. 1934578X1300800, Sep. 2013.
- [4] Y. Li, M. Dai, and D. Peng, “New bisesquiterpenoid lactone from the wild rhizome of *Atractylodes macrocephala* Koidz grown in Qimen,” *Nat. Prod. Res.*, vol. 31, no. 20, pp. 2381–2386, Oct. 2017.
- [5] W. Peng, T. Han, Y. Wang, W.-B. Xin, C.-J. Zheng, and L.-P. Qin, “Chemical constituents of the aerial part of *Atractylodes macrocephala*,” *Chem. Nat. Compd.*, vol. 46, no. 6, pp. 959–960, Jan. 2011.
- [6] S. Gu, L. Li, H. Huang, B. Wang, and T. Zhang, “Antitumor, Antiviral, and Anti-Inflammatory Efficacy of Essential Oils from *Atractylodes macrocephala* Koidz. Produced with Different Processing Methods,” *Molecules*, vol. 24, no. 16, p. 2956, Aug. 2019.
- [7] D. Jeong, G. Dong, H. J. Lee, and J.-H. Ryu, “Anti-Inflammatory Compounds from *Atractylodes macrocephala*,” *Molecules*, vol. 24, no. 10, p. 1859, May 2019.
- [8] H. Liu *et al.*, “Anti-Tumor Effects of Atractylenolide I Isolated from *Atractylodes macrocephala* in Human Lung Carcinoma Cell Lines,” *Molecules*, vol. 18, no. 11, pp. 13357–13368, Oct. 2013.
- [9] X. Li *et al.*, “Antioxidant Ability and Mechanism of Rhizoma *Atractylodes macrocephala*,” *Molecules*, vol. 17, no. 11, pp. 13457–13472, Nov. 2012.
- [10] C. K. Kim *et al.*, “Effects of *Atractylodes macrocephala* Koidzumi rhizome on 3T3-L1 adipogenesis and an animal model of obesity,” *J. Ethnopharmacol.*, vol. 137, no. 1, pp. 396–402, Sep. 2011.