

1. Đỗ Huy Bích, Đặng Quang Chung, Bùi Xuân Chương, Nguyễn Thượng Dong, Đỗ Trung Đàm, Phạm Văn Hiến, Vũ Ngọc Lộ, Phạm Duy Mai, Phạm Kim Mẫn, Đoàn Thị Nhu, Nguyễn Tập, Trần Toàn (2006), Cây thuốc và động vật làm thuốc, NXB Khoa học và Kỹ thuật, tập 1, 828-830.
2. Liew P. M., & Yong Y. K. (2016), *Stachytarpheta jamaicensis* (L.) Vahl: from traditional usage to pharmacological evidence, *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*, 2016, 1-7.
3. Roengsumran S., Sookkongwaree K., Jaiboon N., Chaichit N., Petsom A. (2002), Crystal structure of ipolamiide monohydrate from *Stachytarpheta indica*, *Analytical Sciences*, 18(9), 1063-1064.
4. Yuliana Y., Auwalayah F., Fatmawati S. (2019), 6 β -Hydroxyipolamiide of *Stachytarpheta jamaicensis* leaves, *IPTEK The Journal for Technology and Science*, 30(3), 68-72.
5. Jawad F. H., Doorenbosx N. J., & Chengt P. C. (1977), Tarphetalin: A novel iridoid glucoside from *Stachytarpheta jamaicensis* (L.) Vahl, *Egyptian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 18, 511-514.
6. Froelich S., Gupta M. P., Siems K., Jenett-Siems K. (2008), Phenylethanoid glycosides from *Stachytarpheta cayennensis* (Rich.) Vahl, Verbenaceae, a traditional antimalarial medicinal plant, *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 18, 517-520.
7. Rodríguez M., Castro O. (1996), Pharmacological and chemical evaluation of *Stachytarpheta jamaicensis* (Verbenaceae), *Revista de Biología Tropical*, 44(2A), 353-359.
8. Ho U., Odoh U. E., Ugwu P. N., Diovu E. O., Okonta E. O., Onyekere P. F., Ezugwu C. (2016), Pharmacognostic Studies of the Leaves of *Stachytarpheta jamaicensis* Linn.(Vahl) (Verbenaceae), *International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research*, 8(9), 1503-1508.
9. Okwu D. E., Ohenhen O. N. (2009), Isolation, characterization and antibacterial activity of lanostane triterpenoid from the leaves of *Stachytarpheta jamaicensis* Linn Vahl, *Der pharma chemica*, 1(2), 32-39.
10. Eskander D. M., Aziz W. M., Nassar M. I., Hamed, M. A. (2021), Isolation and characterization of flavonoid compounds from *Stachytarpheta jamaicensis* (L.) Vahl and its role as anti-gastro ulcerative agent in rats, *Biomarkers*, 26(7), 606-616.
11. Putera I, Shazura K. A. (2010), Antimicrobial Activity and Cytotoxic Effects of *Stachytarpheta jamaicensis* (L.) Vahl Crude Plant Extracts, *Doctoral dissertation, Universiti Teknologi Malaysia*.
12. Thomas R. P., Thomas M., Paul J., Mohan M. (2013), Antifungal activity of Verbenaceae, *Biosciences Biotechnology Research Asia*, 10(1), 355-360.
13. Álvarez E., Leiro J. M., Rodríguez M., Orallo F. (2004), Inhibitory effects of leaf extracts of *Stachytarpheta jamaicensis* (Verbenaceae) on the respiratory burst of rat macrophages, *Phytotherapy Research*, 18(6), 457-462.
14. Sulaiman M. R., Zakaria Z. A., Chiong H. S., Lai S. K., Israf D. A., Azam Shah T. M. (2009), Antinociceptive and anti-inflammatory effects of *Stachytarpheta jamaicensis* (L.) Vahl (Verbenaceae) in experimental animal models, *Medical Principles and Practice*, 18(4), 272-279.
15. Idu M., Omogbai E. K. I., Amaechina F., Ataman J. E. (2006), Some Cardiovascular Effects of the Aqueous Extract of the Leaves of *Stachytarpheta jamaicensis* L. Vahl, *International Journal of Pharmacology*, 2(2): 163-165.
16. Abraham R. J., Smith K. M., Goff D. A., Lai J. J. (1982), NMR spectra of porphyrins. 18. A ring-current model for chlorophyll derivatives, *Journal of the American Chemical Society*, 104(16), 4332-4337.
17. Chansakaow S., Ruangrunsi N., Ishikawa T. (1996), Isolation of pyropheophorbide a from the leaves of *Atalantia monophylla* (ROXB.) CORR. (Rutaceae) as a possible antiviral active principle against herpes simplex virus type 2, *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 44(7), 1415-1417.
18. Lin S. M., Wu J. Y., Su C., Ferng S., Lo C. Y., & Chiou R. Y. Y. (2012), Identification and mode of action of 5-hydroxymethyl-2-furfural (5-HMF) and 1-methyl-1,2,3,4-tetrahydro- β -carboline-3-carboxylic acid (MTCA) as potent xanthine oxidase inhibitors in vinegars, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(39), 9856-9862.
19. Phan Minh Giang, Đỗ Thị Việt Hương, Dương Hồng Anh, Phạm Hùng Việt (2018), Xác định các steroid và triterpenoid trong thân cây bàng tay ma trắng, 23(2), 135-141.
20. Tung T. B., Hai H. N., Huong T. L. D., Huong T. T. L., Loi D. V., & Tung H. N. (2015), Flavonoids from leaves of *Tetracera scandens* L., *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 7(3), 2123-2126.
21. Kopalli S. R., Yoo S. K., Kim B., Kim S. K., & Koppula S. (2022), Apigenin isolated from *Carduus crispus* protects against H₂O₂-induced oxidative damage and spermatogenic expression changes in GC-2spd sperm cells, *Molecules*, 27(6), 1777.
22. Costa E. C., Menezes P. M. N., de Almeida R. L., Silva F. S., de Araújo Ribeiro L. A., de Silva J. A., de Oliveira A. P., da Cruz Araújo E. C., Araújo Rolim L., Nunes X. P. (2020), Inclusion of vitexin in β -cyclodextrin: Preparation, characterization and expectorant/antitussive activities, *Heliyon*, 6(12), e05461.

Tạp chí Dược liệu, tập 29, số 4/2024 (Trang 203 - 211)

NGHIÊN CỨU NÂNG CẤP TIÊU CHUẨN CHẤT LƯỢNG VỊ THUỐC TRẦN BÌ SAO VÀNG

**Phạm Thị Hiền¹, Trần Huyền Trang¹, Nguyễn Thị Hằng¹, Nguyễn Văn Hòa², Nguyễn Thị Phương¹,
Trần Hữu Khánh Tân¹, Nguyễn Thế Chung¹, Nguyễn Minh Toàn¹, Đỗ Thị Hà¹, Nguyễn Thị Hà Ly^{1*}**

¹Viện Dược liệu; ²Khoa Hóa học, Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội

*Email: nguyenthihaly.chem@gmail.com

(Nhận bài ngày 28 tháng 3 năm 2024)

Tóm tắt

Mục tiêu của nghiên cứu là bổ sung, nâng cấp tiêu chuẩn cơ sở cho vị thuốc trần bì sao vàng theo hướng dẫn của Tiêu chuẩn Việt Nam, Dược điển Việt Nam và Dược điển Hồng Kông. Các chỉ tiêu lựa chọn trong tiêu chuẩn cơ sở gồm có mô tả, định tính bằng phương pháp sắc ký lớp mỏng, độ ẩm, tro toàn phần, tro không tan trong acid và định lượng bốn chất hesperidin, narirutin, nobiletin, tangeretin bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao kết nối detector quang phổ hấp thụ phân tử (HPLC-DAD). Tiến hành phân tích các chỉ tiêu trên sáu mẫu trần bì sao vàng được chế biến theo hướng dẫn của Thông tư 30/2017/TT-BYT của Bộ Y tế, từ đó góp phần nâng cấp tiêu chuẩn chất lượng cho vị thuốc trần bì sao vàng và áp dụng phân tích chất lượng ba mẫu mua trên thị trường.

Từ khóa: Tiêu chuẩn cơ sở, Trần bì sao vàng, Định tính và định lượng.

Summary

Research to Upgrade an In-House Standard for *Pericarpium Citri reticulatae perenne praeparatum*

This research aims to upgrade an in-house standard for *Pericarpium Citri reticulatae perenne praeparatum* according to the guidelines of the Vietnam Standards, Vietnamese Pharmacopoeia, and Hong Kong Chinese Materia Medica Standards. The criteria include description, identification by thin layer chromatography, moisture, total ash, acid-insoluble ash, and quantification of four substances (hesperidin, narirutin, nobiletin, and tangeretin) using High-performance liquid chromatography with diode-array detection (HPLC-DAD). Six samples of *Pericarpium Citri reticulatae perenne praeparatum* processed according to the guidelines of Circular 30/2017/TT-BYT of the Ministry of Health were analyzed and evaluated for the seven criteria. From the results obtained, an in-house standard for *Pericarpium Citri reticulatae perenne praeparatum* is proposed and applied quality analysis and three samples of *Pericarpium Citri reticulatae perenne praeparatum* purchased on the market.

Keywords: In-House standard, *Pericarpium Citri reticulatae perenne*, Qualitative and quantitative.

1. Đặt vấn đề

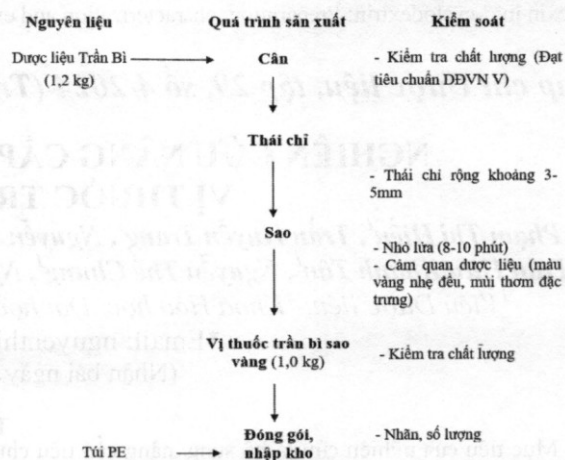
Dược liệu trần bì (*Pericarpium Citri reticulatae perenne*) được qui định là vỏ quả chín đã phơi hoặc sấy khô và để lâu năm của cây Quýt (*Citrus reticulata* Blanco). Trần bì được sử dụng phổ biến trong y học cổ truyền, với các công dụng chính như chữa ăn không tiêu, đau bụng, nôn mửa, ho tức ngực, nhiều đờm và là thành phần có trong rất nhiều bài thuốc y học cổ truyền nổi tiếng như: Sâm tô ẩm, Hoắc hương chính khí tán,...[1],[2]. Y học hiện đại đã chứng minh trần bì có một số tác dụng như chống viêm, chống loét, lợi mật, tác dụng đối với tim mạch cụ thể là tăng cường sức co bóp của cơ tim và tăng lượng máu do tim đẩy ra, chống ung thư [1],[3]. Các hoạt tính này chủ yếu là do sự có mặt của các hợp chất flavonoid có trong trần bì, đáng kể đến là hesperidin, narirutin, nobiletin, tangeretin, methylhesperidin. Hesperidin được chứng minh tác dụng hạ mỡ máu, bảo vệ tim mạch, hạ huyết áp, điều trị tiểu đường, liền vết loét, chống stress oxy hóa, chống trầm cảm nhờ cơ chế chống oxy hóa và ức chế tạo thành các tiền chất gây viêm [4],[5]. Trên chuột cống trắng gây tắc nghẽn mạch huyết khối thực nghiệm, nobiletin, tangeretin có tác dụng ức chế hoạt động men thrombogen nhưng không ảnh hưởng đến thời gian đông máu. Nobiletin còn có tác dụng ức chế tốc độ lắng hồng cầu người với tỷ lệ ức chế là 78,8% [1].

Theo y học cổ truyền, dược liệu thường được sử dụng ở dạng sau chế biến. Đối với dược liệu trần bì, Thông tư 30/2017/TT-BYT của Bộ Y tế qui định hai vị thuốc là trần bì sao vàng (TBSV, trần bì thái chỉ, sao cho tới khi vàng đều, mùi thơm đặc trưng) và trần bì sao cháy (trần bì thái chỉ, sao lửa to cho đến khi mặt ngoài có màu đen, bên trong có màu nâu đen, lấy ra, để nguội) [6]. Mục đích của việc chế biến dược liệu trần bì là để dễ bảo quản dược liệu, giảm tính hàn, giúp tăng tác dụng dẫn thuốc vào Tỳ vị và tạo mùi thơm vị thuốc [2],[6]. Về tiêu chuẩn chất lượng, Dược điển các nước như Việt Nam (ĐDVN), Trung Quốc (ĐDTQ), Hồng Kông (ĐĐHK) đều có qui định chuyên luận đối với dược liệu trần bì. Trong khi ĐDVN V và ĐDTQ 2020 qui định chỉ

tiêu định lượng hoạt chất là hàm lượng hesperidin không được dưới 3,5% [2],[7], ĐĐHK qui định chỉ tiêu định lượng sử dụng một phương pháp HPLC-DAD định lượng đồng thời bốn chất hesperidin, narirutin, nobiletin, tangeretin, trong đó tổng hàm lượng hesperidin và narirutin không dưới 2,9%, tổng hàm lượng nobiletin và tangeretin không dưới 0,071% [8]. Tuy nhiên chưa có Dược điển nào qui định chuyên luận riêng đối với các vị thuốc trần bì (sau chế biến). TCVN 11776-24:2017 (Phần 24) có qui định tiêu chuẩn chất lượng cho trần bì chế, trong đó bao gồm các chỉ tiêu cảm quan, định tính (bằng phản ứng hóa học và bằng sắc ký lớp mỏng so sánh với dược liệu đối chiếu hoặc chất đối chiếu hesperidin), độ ẩm, tro toàn phần, kim loại nặng, tiêu chuẩn này chưa có chỉ tiêu về định lượng hoạt chất [9]. Nghiên cứu này được thực hiện nhằm nâng cấp tiêu chuẩn chất lượng cho vị thuốc trần bì sao vàng, đặc biệt là bổ sung thêm chỉ tiêu định lượng hoạt chất, giúp cho công tác kiểm tra đánh giá chất lượng dược liệu và vị thuốc trần bì sao vàng ở Việt Nam chặt chẽ hơn.

2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

2.1. Nguyên liệu



Hình 1. Quy trình chế biến vị thuốc TBSV

Mẫu dược liệu trần bì được cung cấp bởi Công ty Indochina, Việt Nam. Mẫu dược liệu kiểm nghiệm đạt tiêu chuẩn chất lượng theo chuyên

lượn trần bì trong ĐĐVN V. Ba mẫu trần bì sao vàng (**TBSV1-3**) được mua trên thị trường tại ba cửa hàng khác nhau trên phố Lãn Ông, Hà Nội. Sáu mẫu trần bì sao vàng (**TBSV5-10**) được chế biến tại Trung tâm Ứng dụng Khoa học công nghệ dược liệu, Viện Dược liệu, theo phương pháp được qui định trong Thông tư 30/2017/TT-BYT của Bộ Y tế hướng dẫn phương pháp chế biến các vị thuốc cổ truyền [6]. Quy trình chế biến được trình bày trong Hình 1.

2.2. Hóa chất

Chất chuẩn dùng trong nghiên cứu gồm có hesperidin (CAS: 520-26-3, số Lot: CFS202301, độ tinh khiết 98,0%), narirutin (CAS: 14259-46-2, số Lot: CFS202301, độ tinh khiết 98,0%), nobiletin (CAS: 478-01-3, số Lot: CFS202202, độ tinh khiết 98,0%), tangeretin (CAS: 481-53-8, số Lot: CFS202301, độ tinh khiết 98,0%) được cung cấp bởi hãng Chemfaces (Trung Quốc). Các dung môi, hóa chất dùng cho HPLC đều của hãng Merck (đạt chuẩn HPLC); các dung môi, hoá chất dùng để xử lý mẫu đều đạt tiêu chuẩn hóa chất tinh khiết phân tích (P.A.). Nước cất hai lần đã qua hệ thống deion.

2.3. Thiết bị

Thiết bị chính dùng trong nghiên cứu là hệ thống HPLC (Shimadzu, Nhật Bản) gồm bơm LC-20AD, bộ tiêm mẫu tự động SIL-20AHT, detector DAD, phần mềm Labsolution để truy xuất hình ảnh và số liệu từ hệ thống.

2.4. Phương pháp nghiên cứu

2.4.1. Mô tả [2]:

Mô tả cảm quan (hình dạng, kích thước, màu sắc, mùi, vị) và các đặc điểm bề ngoài khác, tiến hành theo những quy định chung về kiểm tra chất lượng dược liệu của ĐĐVN V.

2.4.2. Định tính bằng phương pháp sắc ký lớp mỏng [2]:

Bản mỏng: *Silica gel* 60 F₅₄

Hệ dung môi 1: ethyl acetat - methanol - nước (tỷ lệ 100:17:13 theo thể tích).

Hệ dung môi 2: toluen - ethyl acetat - acid formic - nước (tỷ lệ 20 : 10 : 1 : 1 theo thể tích).

Dung dịch thử: Lấy 0,3 g bột dược liệu, thêm 20 ml methanol, đun hồi lưu 20 phút, để nguội, lọc. Bóc hơi 5 mL dịch lọc đến còn khoảng 1 mL làm dung dịch chấm sắc ký.

Dung dịch dược liệu đối chiếu: lấy 0,3 g bột dược liệu trần bì, chiết như mô tả ở phần dung dịch thử.

Dung dịch chất chuẩn: hòa tan hesperidin trong methanol để được dung dịch có nồng độ 1 mg/mL.

Cách tiến hành: Chấm riêng biệt lên bản mỏng khoảng 2 μ L mỗi dung dịch trên. Triển khai sắc ký với hệ dung môi 1 đến khi dung môi đi được 3

cm, lấy bản mỏng ra để khô trong không khí. Tiếp tục triển khai với hệ dung môi 2 đến khi dung môi đi được 8 cm, lấy bản mỏng ra để khô trong không khí. Phun dung dịch nhôm clorid 1 %. Quan sát dưới ánh sáng tử ngoại bước sóng 366 nm.

2.4.3. Độ ẩm [2]:

Thử theo Dược điển Việt Nam V, Phụ lục 12.13, Xác định hàm lượng nước bằng phương pháp cất với dung môi.

2.4.4 Tro toàn phần [2]:

Thử theo Dược điển Việt Nam V, Phụ lục 9.8, Xác định tro toàn phần - Phương pháp 1, sử dụng khối lượng mẫu thử là 2 gam.

2.4.5. Tro không tan trong acid [2]:

Thử theo Dược điển Việt Nam V, Phụ lục 9.7, Xác định tro không tan trong acid - Phương pháp 1.

2.4.6. Định lượng hesperidin, narirutin, nobiletin, tangeretin bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao kết nối detector DAD (HPLC-DAD) [8]:

Nội dung này được thực hiện theo phương pháp qui định trong chuyên luận dược liệu trần bì trong Dược điển Hồng Kông. Tuy nhiên trong nghiên cứu này, đối tượng nghiên cứu là các mẫu trần bì sao vàng, vì vậy nhóm nghiên cứu áp dụng điều kiện xử lý mẫu và điều kiện phân tích HPLC-DAD trong Dược điển Hồng Kông và có thẩm định lại phương pháp này (theo hướng dẫn của ICH và AOAC) tại điều kiện phòng thí nghiệm dùng trong nghiên cứu, nhằm đảm bảo phương pháp phân tích là phù hợp để đánh giá hàm lượng các chất hesperidin, narirutin, nobiletin, tangeretin trong mẫu trần bì sao vàng (Phương pháp ESM, External standard method). Ngoài ra, phương pháp định lượng đa thành phần thông qua một chất chuẩn (Phương pháp QAMS, Quantitative analysis of multi components by single marker) cũng được nghiên cứu nhằm áp dụng định lượng 4 chất hesperidin, narirutin, nobiletin, tangeretin trong mẫu trần bì sao vàng. Phương pháp này được đánh giá độ chính xác bằng cách so sánh kết quả phân tích bằng phương pháp ESM.

Dung dịch thử: cân chính xác khoảng 0,2 g bột mẫu thử chuyển vào bình cầu dung tích 250 ml, thêm 90 mL methanol, chiết hồi lưu trong 1 giờ, lọc dịch chiết vào bình định mức 100 mL, rửa cân 3 lần, mỗi lần 3 ml methanol, gom dịch rửa vào bình định mức trên, bổ sung đến vạch mức bằng methanol, trộn đều, lọc qua màng lọc 0,45 μ m thu được dung dịch mẫu thử.

Dung dịch chuẩn đơn: cân chính xác khoảng 10 mg từng chất chuẩn đơn hesperidin (hoặc narirutin, nobiletin, tangeretin), hòa tan riêng biệt trong methanol và chuyển vào bình định mức 10

ml, bổ sung dung môi methanol đến vạch mức, lắc đều thu được các dung dịch chuẩn đơn có nồng độ chính xác khoảng 1000 µg/mL.

Dung dịch chuẩn hỗn hợp: hút chính xác 1 mL từ bốn dung dịch chuẩn đơn nồng độ chính xác khoảng 1000 µg/mL, trộn đều, thu được dung dịch chuẩn hỗn hợp bốn chất có nồng độ chính xác khoảng 250 µg/mL. Từ dung dịch chuẩn hỗn hợp này, tiến hành pha loãng bằng methanol với các tỷ lệ khác nhau để thu được các dung dịch chuẩn hỗn hợp có nồng độ các chất trong khoảng từ 4-250 µg/mL dùng để xây dựng đường chuẩn (đối với hesperidin, nobiletin, tangeretin) và khoảng từ 0,98 - 125 µg/mL (đối với narirutin).

Điều kiện sắc ký: Cột HPLC C₁₈ (250 x 4,6 mm, 5 µm) của hãng Agilent; Detector DAD: 283 nm; thể tích tiêm mẫu: 10 µL; tốc độ dòng: 1

$$RRT_x = \frac{T_{Rx}}{T_{Rs}} \quad (CT\ 1)$$

Trong đó: T_{Rs}, A_s và C_s là thời gian lưu, diện tích pic và nồng độ của (hesperidin); T_{Rx}, A_x và C_x là thời gian lưu, diện tích pic và nồng độ của chất cần xác định giá trị RRT và RCF.

Giá trị RCF được thẩm định bằng cách tiến hành phân tích cùng một mẫu hỗn hợp dung dịch 4 chất chuẩn (hesperidin, narirutin, nobiletin, tangeretin) ở một số điều kiện khác nhau về thể tích tiêm mẫu (1-20 µL), các loại cột sắc ký HPLC C₁₈ của 3 hãng khác nhau (Agilent, Phenomenex và Vertical) và phân tích trên 2 hệ thống HPLC khác nhau.

2.5. Phương pháp xử lý số liệu

Hàm lượng (%) từng chất trong mẫu thử được tính theo công thức:

$$X(\%) = \frac{C_x \times V \times 100 \times P}{m \times 10^6 \times (100 - B)} \times 100 \quad (CT\ 3)$$

Trong đó: X(%) là hàm lượng của hoạt chất tương ứng có trong mẫu thử; C_x là Nồng độ của hoạt chất có trong dung dịch mẫu thử tính từ phương trình đường chuẩn (µg/mL); V là thể tích dung dịch chiết mẫu (mL); m là khối lượng mẫu thử (g); B là độ ẩm của mẫu thử (%); P là độ tinh khiết của chất chuẩn (P=0,98).

mL/min; pha động gồm acetonitril (ACN) và nước, chương trình rửa giải gradient như sau: 0-20 (21% ACN), 20-30 phút (21-45%ACN), 30-60 phút (45% ACN).

* Phương pháp ESM được thẩm định theo hướng dẫn của ICH và tham chiếu theo các qui định trong AOAC, gồm các chỉ tiêu: tính thích hợp của hệ thống, độ đặc hiệu, giới hạn phát hiện và giới hạn định lượng, đường chuẩn, độ lặp lại trong ngày và khác ngày, hiệu suất thu hồi [9, 10].

* Phương pháp QAMS: Hesperidin được chọn là chất chuẩn tham chiếu, tiến hành xác định giá trị thời gian lưu tương đối RRT (relative retention time) và hệ số điều chỉnh RCF (relative correction factors) của ba chất còn lại theo chuẩn hesperidin dựa trên các công thức sau [12],[14]:

$$RCF = \frac{A_s \times C_x}{A_x \times C_s} \quad (CT\ 2)$$

Đối với phương pháp QAMS, C_x của các chất narirutin, nobiletin, tangeretin được tính theo công thức sau:

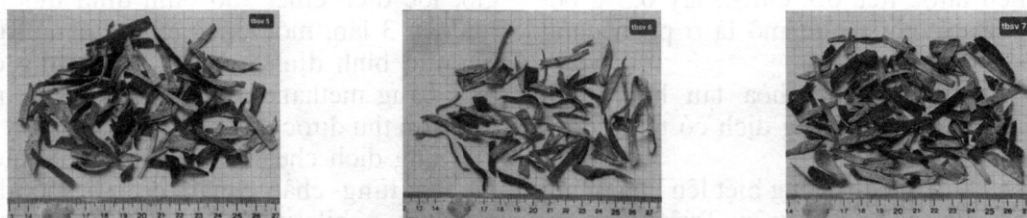
$$C_x = \frac{RCF_x \times A_x \times C_s}{A_s} \quad (CT\ 4)$$

Trong đó: A_x và C_x là diện tích pic và nồng độ chất tương ứng (narirutin, nobiletin, tangeretin) trong dung dịch mẫu thử; A_s và C_s là diện tích pic và nồng độ của chất chuẩn tham chiếu (hesperidin); RCF và hệ số điều chỉnh của các chất phân tích (narirutin, nobiletin, tangeretin) so với chuẩn tham chiếu hesperidin.

3. Kết quả nghiên cứu

3.1. Mô tả

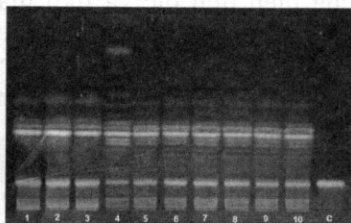
Phân tích đặc điểm về cảm quan, thể chất và mùi vị của 06 mẫu TBSV cho thấy các mẫu TBSV có các đặc điểm như sau: vị thuốc dạng sợi ngắn, kích thước rộng 1-5 mm, dài 2-5 cm. Mặt ngoài có màu vàng nâu đậm, có nhiều chấm màu sẫm hơn và lõm xuống; mặt trong xốp, có màu vàng nhạt. Thể chất nhẹ, giòn, dễ bẻ gãy. Mùi thơm đặc trưng, vị hơi đắng và hơi cay (Hình 2). Các đặc điểm này cũng tương đồng với qui định về cảm quan trong TCVN 11776-24:2017 [9].



Hình 2. Ảnh chụp các mẫu trần bì sao vàng

3.2. Định tính bằng TLC

Để định tính các mẫu TBSV, chúng tôi tham khảo phương pháp được quy định trong chuyên luận trần bì - ĐĐVN V. Kết quả được trình bày trong Hình 3.



Hình 3. Sắc ký đồ TLC định tính các mẫu TBSV (1-3: Mẫu TBSV mua trên thị trường; 4- được liệu trần bì; 5-10: 06 mẫu TBSV; C: chuẩn hesperidin)

Kết quả thu được cho thấy, sắc ký đồ TLC tách rõ các vết, đặc biệt là vết ứng với chất chuẩn hesperidin tách tốt trên nền mẫu dược liệu trần bì và TBSV. Chín mẫu TBSV (1-3 và 5-6) có các vết chính tương ứng về R_f và màu sắc phát huỳnh quang với các vết chính trong mẫu dược liệu trần bì (4). Điều này chứng tỏ phương pháp định tính trong chuyên luận dược liệu trần bì - ĐĐVN V phù hợp để áp dụng định tính đối với các mẫu TBSV.

3.3. Kết quả phân tích các chỉ tiêu độ ẩm, tro toàn phần, tro không tan trong acid

Kết quả phân tích các chỉ tiêu độ ẩm, tro toàn phần, tro không tan trong acid của 06 mẫu TBSV chế biến tại cơ sở (TBSV 5-10) và 03 mẫu TBSV mua trên thị trường (TBSV1-3) được trình bày trong Bảng 1.

Kết quả thu được cho thấy độ ẩm các mẫu TBSV đều đạt theo qui định giới hạn về độ ẩm, tro toàn phần và tro không tan trong acid của dược liệu trần bì trong ĐĐVN V [2]. Giới hạn về độ ẩm trong TCVN 11776-24:2017 qui định là không quá 8,0% [9], tuy nhiên kết quả phân tích cho thấy cả 9 mẫu TBSV đều có độ ẩm trên 8,0% và dưới 13%. Dựa trên kết quả thực nghiệm và tham khảo ĐĐVN, đề xuất giới hạn về các chỉ tiêu này của vị thuốc trần bì sao vàng như sau: độ ẩm không quá 13,0%, tro toàn phần không quá

5,0% và tro không tan trong acid không quá 1,0%. Giới hạn tro toàn phần phù hợp với giới hạn qui định trong TCVN 11776-24:2017 [9].

Bảng 1. Kết quả phân tích các chỉ tiêu độ ẩm, tro toàn phần, tro không tan trong acid các mẫu TBSV

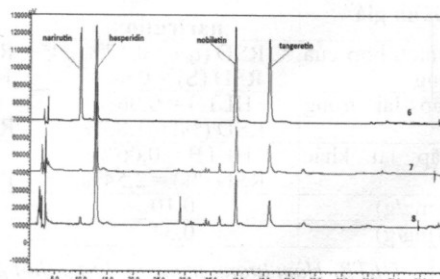
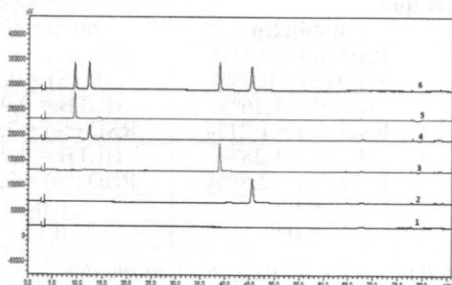
STT	Mẫu	Độ ẩm (%)	Tro toàn phần (%) (n=3)	Tro không tan trong acid (%) (n=3)
1	TBSV1	12,25	3,23 ± 0,04	0,28 ± 0,02
2	TBSV2	12,05	3,82 ± 0,10	0,36 ± 0,05
3	TBSV3	11,90	3,12 ± 0,02	0,32 ± 0,17
4	TBSV5	9,65	4,67 ± 0,09	0,08 ± 0,03
5	TBSV6	8,90	4,87 ± 0,08	0,13 ± 0,04
6	TBSV7	8,60	4,17 ± 0,09	0,48 ± 0,03
7	TBSV8	10,25	3,58 ± 0,04	0,27 ± 0,02
8	TBSV9	9,15	4,02 ± 0,07	0,28 ± 0,05
9	TBSV10	9,75	3,74 ± 0,04	0,31 ± 0,07

3.4. Định lượng một số hoạt chất (hesperidin, narirutin, nobiletin, tangeretin) bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao kết nối detector DAD (HPLC-DAD)

3.4.1 Thẩm định phương pháp ESM:

a) Độ đặc hiệu

Tiến hành phân tích dung dịch chuẩn đơn, chuẩn hỗn hợp, dung dịch mẫu thử TBSV, dung dịch mẫu trắng methanol với các điều kiện sắc ký và xử lý mẫu đã trình bày trong mục 2.4.6. Kết quả thu được như Hình 4 và Bảng 2 cho thấy tín hiệu pic của 4 chất chuẩn được tách hoàn toàn khỏi nhau trên sắc ký đồ dung dịch chuẩn hỗn hợp và dung dịch mẫu thử dược liệu. Độ tinh khiết pic của cả 4 chất (hesperidin, narirutin, nobiletin, tangeretin) trong sắc ký đồ mẫu thử đều lớn hơn 0,99 chứng tỏ pic tương ứng với các chất này tách rời khỏi các chất khác có trong nền mẫu thử. Bên cạnh đó, hệ số chồng phổ (Match ratio) của 4 chất chuẩn của mẫu thử so với mẫu chuẩn đều lớn hơn 0,99. Chứng tỏ phương pháp xây dựng đáp ứng yêu cầu về độ đặc hiệu để định lượng đồng thời hesperidin, narirutin, nobiletin, tangeretin trong mẫu TBSV.



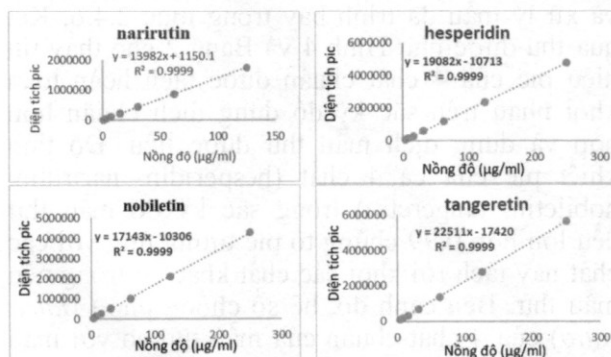
Hình 4. Sắc ký đồ đánh giá độ đặc hiệu của phương pháp (1-mẫu blank; 2-chuẩn tangeretin; 3-chuẩn nobiletin; 4-chuẩn hesperidin; 5-chuẩn narirutin; 6-hỗn hợp 4 chuẩn; 7-mẫu dược liệu trần bì; 8-mẫu trần bì sao vàng)

Bảng 2. Thông số pic của các chất định phân

Thông số	narirutin	hesperidin	nobiletin	tangeretin
Thời gian lưu (t_R , phút)	10,259	13,356	38,806	44,823
R_s	3,621	3,527	4,307	3,296
T_f	1,021	1,027	1,107	1,311
N	7150	7075	111617	64835
Hệ số chồng phổ UV	0,998	0,999	0,999	0,997
Độ tinh khiết pic	0,9939	0,9992	0,9993	0,9930

b) Đường chuẩn

Chuẩn bị một dãy các dung dịch hỗn hợp chứa hesperidin, nobiletin, tangeretin có nồng độ từ 3,9 $\mu\text{g/ml}$ đến 250 $\mu\text{g/ml}$, narirutin có nồng độ từ 0,98 $\mu\text{g/ml}$ đến 125 $\mu\text{g/ml}$. Tiến hành phân tích HPLC-DAD các dung dịch chuẩn này, ghi nhận giá trị diện tích pic và xây dựng đường chuẩn các chất hesperidin, narirutin, nobiletin, tangeretin. Các đường chuẩn thu được (Hình 5) đều có giá trị R^2 lớn hơn 0,999, hệ số P_{value} (số chẵn) $> 0,05$ chứng tỏ phương trình đường chuẩn xây dựng được không mắc sai số hệ thống và có độ tuyến tính cao, khoảng nồng độ lựa chọn là phù hợp để áp dụng phân tích định lượng các chất hesperidin, narirutin, nobiletin, tangeretin.

**Hình 5.** Đường chuẩn hesperidin, narirutin, nobiletin, tangeretin**c) Tính thích hợp của hệ thống****Bảng 3.** Kết quả thẩm định phương pháp HPLC-DAD phân tích hesperidin, narirutin, nobiletin, tangeretin trong TBSV

TT	Đánh giá	Kết quả			
		narirutin	hesperidin	nobiletin	tangeretin
1	Tính thích hợp của hệ thống	RSD (t_R) = 0,17% RSD (S) = 0,64%	RSD (t_R) = 0,19% RSD (S) = 0,91%	RSD (t_R) = 0,21% RSD (S) = 0,08%	RSD (t_R) = 0,23% RSD (S) = 0,30%
2	Độ lặp lại trong ngày	HLTB = 0,06% RSD (%) = 1,83%	HLTB = 3,40% RSD (%) = 2,08%	HLTB = 1,26% RSD (%) = 1,21%	HLTB = 0,95% RSD (%) = 2,04%
	Độ lặp lại khác ngày	HLTB = 0,06% RSD (%) = 2,54%	HLTB = 3,40% RSD (%) = 2,88%	HLTB = 1,28% RSD (%) = 2,86%	HLTB = 0,97% RSD (%) = 2,68%
3	LOD (mg/g)	0,10	0,04	0,02	0,04
4	LOQ (mg/g)	0,34	0,12	0,06	0,14

HLTB: Hàm lượng trung bình; t_R : thời gian lưu; S: diện tích pic; RSD: độ lệch chuẩn tương đối

f) Độ đúng

Mẫu thêm chuẩn: Cân chính xác khoảng 0,2 g

Tiến hành sắc ký 6 lần hỗn hợp dung dịch chuẩn hesperidin, narirutin, nobiletin, tangeretin có nồng độ từng chất là 62,5 $\mu\text{g/mL}$, ghi lại thời gian lưu và diện tích pic tương ứng. Kết quả thu được (Bảng 3) cho thấy các giá trị độ lệch chuẩn tương đối của diện tích pic và thời gian lưu của hesperidin, narirutin, nobiletin, tangeretin đều nhỏ hơn 2%, cho thấy các điều kiện sắc ký đã lựa chọn là phù hợp và đảm bảo độ ổn định của phép phân tích định lượng hesperidin, narirutin, nobiletin, tangeretin.

d) Độ lặp lại trong ngày và khác ngày

Phân tích lặp lại 6 lần cùng một mẫu thử thu được kết quả đánh giá độ lặp lại trong ngày của phương pháp. Phân tích lặp lại 6 lần mẫu thử đó vào một ngày khác để thu kết quả của 12 lần phân tích dùng cho đánh giá độ lặp lại khác ngày. Theo qui định của AOAC, với các chất có hàm lượng từ 0,1-1% thì RSD% đánh giá độ lặp lại trong ngày phải đạt từ 2-3%, RSD% đánh giá độ lặp lại khác ngày phải đạt từ 4-6%. Với các chất có hàm lượng từ 1-10% thì RSD% đánh giá độ lặp lại trong ngày phải đạt từ 1,5-2%, RSD% đánh giá độ lặp lại khác ngày phải đạt từ 3-4%.

Kết quả thu được (Bảng 3) cho thấy các giá trị RSD% ứng với các chất narirutin, nobiletin, tangeretin đều đạt giới hạn qui định trong AOAC. Riêng hợp chất hesperidin (hàm lượng trung bình đạt 3,4%), giá trị RSD% đối với đánh giá độ lặp lại trong ngày đạt 2,08% ($> 2\%$), tuy nhiên giá trị RSD% đối với đánh giá độ lặp lại khác ngày đạt 2,88% ($< 3\%$) và đạt theo qui định của AOAC.

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

Phân tích mẫu thử đã được xác định nồng độ hesperidin, narirutin, nobiletin, tangeretin, sau đó pha loãng dần đến khi trên sắc ký đồ của dung dịch thử, tại thời gian lưu của hesperidin, narirutin, nobiletin, tangeretin, xác định được tỷ lệ S/N = 3 - 4 và S/N = 10. Từ đó tìm được LOD và LOQ. Mỗi mẫu làm lặp lại 3 lần và lấy kết quả trung bình. Kết quả thu được như Bảng 3.

bột được liệu và thêm một lượng chất đối chiếu ở dung dịch chuẩn (hesperidin, narirutin, nobiletin,

tangeretin), quá trình thêm chuẩn được chuẩn bị ở 3 mức tương ứng 10%, 50% và 100% so với hàm lượng chất phân tích có trong mẫu thử trần bì dùng để thẩm định phương pháp. Sau đó, tiến hành xử lý mẫu thêm chuẩn và mẫu không thêm

chuẩn theo quy trình đã trình như mục 2.4.6. Tiến hành phân tích HPLC mẫu thêm chuẩn và mẫu không thêm chuẩn. Độ đúng của phương pháp được đánh giá thông qua hiệu suất thu hồi, kết quả trình bày trong Bảng 4.

Bảng 4. Kết quả đánh giá hiệu suất thu hồi của phương pháp

Chất	Thêm chuẩn mức 10%			Thêm chuẩn mức 50%			Thêm chuẩn mức 100%		
	Lượng thêm chuẩn (mg)	Lượng thêm chuẩn xác định được (mg)	Hiệu suất thu hồi (%)	Lượng thêm chuẩn (mg)	Lượng thêm chuẩn xác định được (mg)	Hiệu suất thu hồi (%)	Lượng thêm chuẩn (mg)	Lượng thêm chuẩn xác định được (mg)	Hiệu suất thu hồi (%)
Narirutin	0,02	0,02	103,75	0,08	0,08	96,25	0,16	0,15	98,13
Hesperidin	0,69	0,66	95,98	3,45	3,39	98,26	6,90	6,95	100,65
Nobiletin	0,27	0,27	98,52	1,35	1,30	95,10	2,70	2,77	102,76
Tangeretin	0,20	0,21	103,27	1,01	0,97	96,11	2,01	1,96	97,26

Theo qui định của AOAC, các chất có hàm lượng đạt 0,1%, 1% và 10% thì hiệu suất thu hồi phải đạt lần lượt từ 90-108%, 92-105% và 95-102%. Kết quả thu được trong Bảng 4 cho thấy các giá trị hiệu suất thu hồi đều đạt trong khoảng từ 95 -105%, chứng tỏ phương pháp xây dựng có độ đúng cao, phù hợp dùng cho phân tích định

lượng hesperidin, narirutin, nobiletin, tangeretin trong TBSV.

3.4.2. Kết quả xây dựng phương pháp QAMS định lượng hesperidin, narirutin, nobiletin, tangeretin trong trần bì sao vàng:

a) Xác định giá trị RCF theo thể tích tiêm mẫu khác nhau

Bảng 5. Kết quả xác định giá trị RCF ở các thể tích tiêm mẫu khác nhau

Thể tích	hesperidin	narirutin		Nobiletin		tangeretin	
	Diện tích pic	Diện tích pic	RCF	Diện tích pic	RCF	Diện tích pic	RCF
4	476249	389974	1,34	401739	1,12	506290	0,86
6	472375	593879	1,34	601450	1,11	771436	0,85
8	995919	793277	1,35	810972	1,12	1060899	0,85
10	1246680	1289522	1,35	1014282	1,11	1332993	0,85
16	2089741	1758082	1,36	1632348	1,11	2161763	0,85
20	2593991	2216881	1,36	2048890	1,11	3007898	0,85
TB			1,35		1,11		0,85
RSD			0,74		0,24		0,33

b) Xác định giá trị RRT và RCF (so với hesperidin) trên các thiết bị HPLC khác nhau và cột sắc ký khác nhau

Bảng 6. Kết quả xác định giá trị RRT và RCF (so với hesperidin) trên các thiết bị HPLC khác nhau và cột sắc ký khác nhau

Hệ thống - cột		Hesperidin	narirutin		Nobiletin		tangeretin	
Máy	Cột	Thời gian lưu (phút)	RRT	RCF	RRT	RCF	RRT	RCF
Hệ HPLC 1	Cột A	12,29	0,76	1,35	3,17	1,11	3,70	0,85
		12,34	0,76	1,35	3,15	1,11	3,68	0,85
	Cột B	15,45	0,77	1,35	3,10	1,11	3,65	0,85
		15,38	0,76	1,35	3,11	1,11	3,71	0,85
	Cột C	20,72	0,77	1,35	3,01	1,11	3,49	0,85
		20,67	0,77	1,35	3,02	1,11	3,60	0,85
Hệ HPLC 2	Cột A	12,19	0,76	1,35	3,28	1,11	3,65	0,85
		12,19	0,76	1,35	3,19	1,11	3,64	0,85
	Cột B	14,77	0,78	1,35	3,21	1,11	3,54	0,85
		14,77	0,78	1,35	3,21	1,11	3,59	0,85
	Cột C	19,87	0,78	1,35	3,04	1,11	3,68	0,85
		19,86	0,78	1,35	3,01	1,11	3,67	0,85
TB			0,77	1,35	3,12	1,11	3,63	0,85
RSD			1,02	0,13	2,93	0,02	1,83	0,04

Cột A (Cột Eclipse Plus C₁₈ của hãng Agilent, kích thước 4,6 x 250 mm, 5 µm); Cột B (Cột Phenomenex: Luna® 5 µm C₁₈, kích thước 4,6 x 250 mm, 5 µm); Cột C (Cột VertiSep TM UPS C₁₈ HPLC Column, kích thước 4,6 x 250 mm, 5 µm).

Kết quả xác định giá trị RRT và RCF của từng chất narirutin (RRT = 0,77 và RCF = 1,35), nobiletin (RRT = 3,12; RCF = 1,11), tangeretin (RRT = 3,63; RCF = 0,85) so với chất chuẩn hesperidin cho thấy có độ lặp lại tốt (các giá trị RSD < 3%) khi sử dụng các thể tích tiêm mẫu khác nhau, pha tĩnh khác nhau và hệ thống sắc ký HPLC khác nhau. Điều này chứng tỏ phương

pháp nghiên cứu ổn định, có độ lặp lại tốt.

3.4.3. Đánh giá hàm lượng một số hoạt chất (hesperidin, narirutin, nobiletin, tangeretin) trong các mẫu TBSV:

Áp dụng phương pháp HPLC-DAD đánh giá hàm lượng hesperidin, narirutin, nobiletin, tangeretin trong một số mẫu trần bì. Kết quả thu được trình bày trong Bảng 7.

Bảng 7. Hàm lượng hesperidin, narirutin, nobiletin, tangeretin trong một số mẫu trần bì (n = 3)

Tên mẫu	Phương pháp	Hàm lượng (%)				P _{value} *	Tổng hàm lượng (%) narirutin và hesperidin	Tổng hàm lượng (%) nobiletin và tangeretin
		hesperidin	narirutin	nobiletin	tangeretin			
Mẫu TBSV mua trên thị trường								
TBSV1	ESM	5,73	0,33	1,71	1,01	0,709	6,06	2,72
	QAMS		0,37	1,70	1,00			
TBSV2	ESM	5,36	0,30	1,70	1,03	0,673	5,67	2,73
	QAMS		0,33	1,70	1,02			
TBSV3	ESM	5,65	0,24	0,97	1,14	0,692	5,91	2,11
	QAMS		0,28	0,97	1,13			
Mẫu TBSV chế biến tại đơn vị								
TBSV5	ESM	4,79	0,29	0,42	1,24	0,612	5,10	1,66
	QAMS		0,33	0,42	1,23			
TBSV6	ESM	5,88	0,35	0,48	1,53	0,539	6,24	2,01
	QAMS		0,38	0,48	1,52			
TBSV7	ESM	5,40	0,31	0,46	1,34	0,585	5,73	1,80
	QAMS		0,35	0,46	1,33			
TBSV8	ESM	4,91	0,30	0,45	1,35	0,570	5,22	1,80
	QAMS		0,33	0,45	1,34			
TBSV9	ESM	4,78	0,28	0,40	1,15	0,602	5,08	1,55
	QAMS		0,31	0,39	1,15			
TBSV10	ESM	4,64	0,26	0,38	1,22	0,607	4,92	1,60
	QAMS		0,30	0,38	1,21			

*Giá trị P_{value} được xác định đối với từng mẫu (dữ liệu so sánh là hàm lượng các chất xác định được bằng hai phương pháp ESM và QAMS) bằng phương pháp thống kê so sánh cặp (Paired T-test) sử dụng phần mềm minitab 20.

Kết quả phân tích hàm lượng ba chất nobiletin, tangeretin và narirutin trong 9 mẫu trần bì sao vàng bằng hai phương pháp ESM và QAMS đều có các giá trị P_{value} lớn hơn 0,05, chứng tỏ kết quả thu được của hai phương pháp này khác nhau không có ý nghĩa thống kê và phương pháp QAMS khả thi, có thể áp dụng thay thế phương pháp ESM để định lượng đồng thời bốn chất hesperidin, narirutin, nobiletin, tangeretin tính theo một chất chuẩn hesperidin trong trần bì sao vàng. QAMS là một phương pháp phân tích đa thành phần tính theo một chất chuẩn, đã được nhiều nghiên cứu áp dụng trên đối tượng dược liệu, với những ưu điểm như có thể phân tích đồng thời nhiều chất nhưng chỉ sử dụng đơn chất chuẩn giúp cho thời gian và chi phí phân tích giảm [12],[14]. Ở Việt Nam có ít nghiên cứu về định lượng đồng thời các chất hesperidin,

narirutin, nobiletin, tangeretin trong trần bì, đặc biệt chưa có nghiên cứu nào áp dụng phương pháp QAMS để định lượng đồng thời các chất này tính theo một chất chuẩn. Kết quả thu được trong nghiên cứu này đóng góp thêm một phương pháp mới trong lĩnh vực tiêu chuẩn hóa chất lượng trần bì.

Hàm lượng hesperidin trong sáu mẫu TBSV chế biến tại đơn vị (TBSV5-10) đạt từ 4,64-5,88%, narirutin đạt từ 0,26-0,35%, nobiletin đạt từ 0,38-0,48%, tangeretin đạt từ 1,15-1,53%. Với kết quả thu được, một số mẫu sẽ có nồng độ narirutin, nobiletin và tangeretin trong dung dịch sắc ký nằm ngoài khoảng nồng độ đánh giá độ thu hồi (tuy nhiên vẫn nằm trong khoảng nồng độ tuyến tính). Đây là tồn tại của nghiên cứu này và lý do là bởi sự hạn chế về lượng chất chuẩn, trong nghiên cứu tiếp theo chúng tôi sẽ tiếp tục

mở rộng khoảng nồng độ dùng để đánh giá hiệu suất thu hồi nhằm đảm bảo tính ứng dụng của phương pháp. ĐĐVN V và ĐĐTQ 2020 qui định hàm lượng hesperidin trong dược liệu trần bì không được dưới 3,5%. ĐĐHK qui định tổng hàm lượng hesperidin và narirutin không dưới 2,9%, tổng hàm lượng nobiletin và tangeretin không dưới 0,071%. Với kết quả thu được cho thấy các mẫu TBSV chế biến tại đơn vị và các mẫu TBSV mua trên thị trường đều đạt so với mức qui định trong các chuyên luận dược điển này. Tuy nhiên, tổng hàm lượng hai chất nobiletin và tangeretin đạt trong khoảng 1,55-2,73% (cao hơn rất nhiều so với mức qui định trong ĐĐHK). Từ kết quả trên, đề xuất giới hạn cho chỉ tiêu định lượng hoạt chất trong TBSV như sau: tổng hàm lượng hesperidin và narirutin không dưới 2,9%, tổng hàm lượng nobiletin và tangeretin không dưới 0,5%. Thông qua kết quả phân tích 06 mẫu trần bì sao vàng, các yêu cầu và giới hạn về cảm quan, độ ẩm, tro toàn phần, tro không tan trong acid và định tính bằng phương pháp sắc ký lớp mỏng có sự phù hợp với các tài liệu tham khảo như TCVN 11776-24:2017, ĐĐVN V và ĐĐTQ 2020 [1, 7, 9]. ĐĐTQ 2020 không quy định tiêu chuẩn chất lượng đối với trần bì sao vàng, nhưng có quy định cho trần bì thái lát, và giới hạn về hàm lượng hesperidin cũng được giảm từ 3,5% (trong dược liệu) xuống 2,5% (trong trần bì thái lát), điều này chứng tỏ việc xử lý và chế biến dược liệu trần bì có ảnh hưởng rõ rệt đến hàm lượng hoạt chất, đặc biệt là hesperidin [7]. TCVN 11776-24:2017 hiện nay chưa qui định chỉ tiêu định lượng hoạt chất cho vị thuốc trần bì sao vàng, vì

vậy kết quả thu được của nghiên cứu này cũng nhằm cung cấp thêm cơ sở khoa học góp phần nâng cấp tiêu chuẩn chất lượng trần bì sao vàng theo TCVN [9].

4. Kết luận

Đã phân tích được các chỉ tiêu về cảm quan và chất lượng các mẫu trần bì sao vàng bao gồm mô tả, định tính, độ ẩm, tro toàn phần, tro không tan trong acid, định lượng. Trong đó có định tính hesperidin và định lượng bốn hoạt chất hesperidin, narirutin, nobiletin, tangeretin trong các mẫu trần bì sao vàng. Kỹ thuật HPLC-DAD được áp dụng để định lượng đồng thời bốn chất hesperidin, narirutin, nobiletin, tangeretin theo hai phương pháp khác nhau ESM và QAMS. Kết quả phân tích cho thấy sự chênh lệch về hàm lượng ba chất narirutin, nobiletin và tangeretin bằng hai phương pháp ESM và QAMS có độ sai khác không đáng kể. Hàm lượng hesperidin trong sáu mẫu TBSV chế biến tại đơn vị đạt từ 4,64-5,88%, narirutin đạt từ 0,26-0,35%, nobiletin đạt từ 0,38 - 0,48%, tangeretin đạt từ 1,15 - 1,53%. Từ các kết quả thu được, đề xuất chỉ tiêu định lượng đối với các mẫu trần bì sao vàng là tổng hàm lượng hesperidin và narirutin không dưới 2,9%, tổng hàm lượng nobiletin và tangeretin không dưới 0,5%.

Lời cảm ơn: Nghiên cứu được hoàn thành với sự hỗ trợ kinh phí từ đề tài cấp Viện Dược liệu “Nghiên cứu xây dựng tiêu chuẩn cho vị thuốc Y học cổ truyền, Hợp đồng số 03/2023/HĐ-NVBG-PTTC ngày 03/8/2023”.

Tài liệu tham khảo

1. Đỗ Huy Bích, Đặng Quang Chung, Bùi Xuân Chương, Nguyễn Thượng Dong, Đỗ Trung Đàm, Phạm Văn Hiền, Vũ Ngọc Lộ, Phạm Duy Mai, Phạm Kim Mân, Đoàn Thị Nhu, Nguyễn Tập, Trần Toàn (2006), *Cây thuốc và Động vật làm thuốc ở Việt Nam*, Tập II, NXB Khoa học và Kỹ thuật, 554-557.
2. Bộ Y tế (2017), *Dược điển Việt Nam V*, NXB Y học, chuyên luận trần bì, tr. 1358-1359.
3. Song L., Xiong P., Zhang W., Hu H., Tang S., Jia B and Huang W., (2022), Mechanism of *Citri Reticulatae Pericarpium* as an anticancer agent from the perspective of flavonoids: A review, *Molecules*, 27(17), 5622.
4. Anand A. Z., Sachin L. B., Pankaj S. S. (2013), Polyphenols in Human Health and Disease: Chapter 76 - Cardiovascular Effects of hesperidin: A Flavanone Glycoside, *Academic Press* 2, 989 - 992.
5. Leandro C. S. Marcelo G. G., André T. R. G., Lucian D. F., Carlos B. F., Silvana P. B., Cristiano R. J. (2013), Evidence for the involvement of the serotonergic 5-HT_{1A} receptors in the antidepressant-like effect caused by hesperidin in mice, *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry* 40, 103 - 109.
6. Bộ Y tế, Thông tư số 30/2017/TT-BYT ngày 11/7/2017 hướng dẫn phương pháp chế biến các vị thuốc cổ truyền.
7. Chinese Pharmacopoeia Commission, Pharmacopoeia of People's Republic of China, *China Medical Science Press, Beijing, Citri Reticulatae Pericarpium*, 2020, tập I, trang 124-125.
8. Chinese Medicine Regulatory Office, Hong Kong Chinese Materia Medica Standards, *Citri Reticulatae Pericarpium*, tập 8, trang 100-113.
9. Tiêu chuẩn Quốc gia, TCVN 11776-24:2017, Dược liệu sau chế biến - Phần 24: Trần bì chế.
10. ICH (2005), Validation of analytical procedures: Text and methodology Q2(R1), *ICH Harmonized Tripartite guidelines*, 1-13.
11. AOAC International (2013), Appendix K: Guidelines for Dietary Supplements and Botanicals, *PART I: AOAC Guidelines for Single-Laboratory Validation of Chemical Methods for Dietary Supplements and Botanicals*.
12. Zhang Y., Li Q., Feng Y., Yang L., Wang Q., Guo Y., Qiu D. (2021), Simultaneous Determination of Eight Chemical Components in *Angelicae Sinensis Radix* and Its Herbal Products by QAMS, *Journal of Analytical Methods in Chemistry* Volume 2021, Article ID 7178982, 7 pages. <https://doi.org/10.1155/2021/7178982>.
13. Zhang J., Chen L., Qiu J., Zhang Y., Wang L., Jiang L., Jiang Y., Liu B. (2020), Simultaneous determination of six chromones in *Saposhnikovia Radix* via quantitative analysis of multicomponents by single marker, *Journal of Analytical Methods in Chemistry* Volume 2020, Article ID 7867046, 13 pages. <https://doi.org/10.1155/2020/7867046>.
14. Li Y., Zhang Y., Zhang Z., Hu Y., Cui X., Xiong Y. (2019), Quality evaluation of *Gastrodia elata tubers* based on HPLC fingerprint analyses and quantitative analysis of multi-components by single marker, *Molecules*, 24, 1521; doi:10.3390/molecules24081521.