

ĐỊNH LƯỢNG ĐỒNG THỜI CINNAMALDEHYD, ACID CINNAMIC VÀ COUMARIN TRONG VỎ THÂN QUẾ, ĐỊNH HƯỚNG TIÊU CHUẨN HOÁ DƯỢC LIỆU QUẾ NHỰC

Bùi Thị Lan Phương¹, Nguyễn Thị Phương Mai², Trần Ngọc Phan¹, Nguyễn Thu Hiền¹, Trần Văn Ôn¹, Ngô Quang Trung¹, Vũ Tùng Lâm¹, Phạm Lê Minh¹, Nguyễn Thị Hà Ly³, Nguyễn Thị Kiều Anh^{1,*}

¹Trường Đại học Dược Hà Nội; ²Hội đồng Dược Điển Việt Nam; ³Viện Dược liệu

*Email: anhnhtk@hup.edu.vn

(Nhận bài ngày 03 tháng 4 năm 2024)

Tóm tắt

Quế là một dược liệu được sử dụng từ lâu đời. Thành phần chính tạo nên tác dụng sinh học của vỏ quế là cinnamaldehyde (CAL) và acid cinnamic (CA). Ngoài ra trong quế có thành phần coumarin (CM) đang được quan tâm vì có thể độc tính trên gan. Do đó 3 chất này được lựa chọn để xây dựng phương pháp định lượng và định hướng tiêu chuẩn hoá chất lượng dược liệu quế nhục. Chất phân tích trong mẫu thử được chiết siêu âm bằng methanol : H₂O, dịch chiết được phân tích bằng HPLC-PDA với cột C₁₈ (250 x 4,6 mm, 5 µm), bước sóng phát hiện 280 nm, hệ pha động gồm acetonitril và acid phosphoric 0,05% rửa giải theo chương trình gradient. Phương pháp được thẩm định theo hướng dẫn của ICH-(Q2R1) và AOAC 2016 với độ đặc hiệu phù hợp, độ chính xác cao, độ đúng tốt, khoảng tuyến tính phù hợp. Quy trình phân tích được ứng dụng định lượng đồng thời 3 hợp chất trong 17 mẫu quế được định danh tên khoa học và 143 mẫu thu mua. Kết quả của nghiên cứu này có thể làm cơ sở định hướng để thực hiện các bước tiếp nhằm nâng cấp chuyên luận quế trong Dược điển Việt Nam V.

Từ khoá: Acid cinnamic, Coumarin, HPLC, Quế nhục.

Summary

Simultaneous Quantitative Analysis of Coumarin, Cinnamic Acid and Cinnamaldehyde in Cinnamon Bark Towards Standardization of Cinnamon Medicinal Herbs

Cinnamon is a medicinal herb that has been used for a long time. The main ingredients that create the biological effects of cinnamon bark are cinnamaldehyde (CAL) and cinnamic acid (CA). In addition, cinnamon contains coumarin (CM), which is of concern because of liver toxicity. Therefore, these three substances were selected to develop a method to quantify ingredients to standardize medicinal herbs. Samples were extracted with methanol-water in ultrasonic bath and analyzed by HPLC-PDA with C₁₈ column (4.6 x 250 mm, 5 µm). The detection wavelength was 280 nm. The mobile phase consisted of acetonitrile and 0.05% phosphoric acid solution, in gradient mode. The method was validated according to ICH-(Q2R1) and AOAC 2016 guidelines with appropriate specificity, high accuracy, good precision, and appropriate linear range. The analytical procedure was applied to quantify three compounds simultaneously in 17 cinnamon samples collected from various provinces, and 143 samples purchased by markets. The results of this study can serve as an orientation to take the following steps in order to upgrade the cortex cinnamomi monograph in Vietnam Pharmacopoeia V.

Keywords: Cinnamic acid, Coumarin, HPLC, Cinnamon bark.

1. Đặt vấn đề

Quế được sử dụng rộng rãi trong các lĩnh vực của đời sống và là một dược liệu quý được sử dụng từ lâu đời, bộ phận được sử dụng gồm vỏ quế (quế nhục - *cinnamon bark*), quế cành (quế chỉ - *cinnamon twig*) và tinh dầu quế, trong đó vỏ quế được sử dụng nhiều nhất và có giá trị thương mại cao [1]. Hiện nay, được điều một số nước đã quy định hàm lượng thành phần chính trong tiêu chuẩn dược liệu quế như Dược điển Trung Quốc kiểm soát hàm lượng CAL [2]; Bộ tiêu chuẩn dược liệu Hồng Kông đánh giá tổng CA và CAL [3]; Dược điển Hàn Quốc yêu cầu về hàm lượng CA [4], Dược điển Mỹ đặt ra mức yêu cầu đối với tổng các phenylpropanoid (gồm: 2-hydroxycinnamaldehyd, CA, CAL và 2-methoxycinnamaldehyd), hàm lượng CAL và hàm lượng procyanidin B2 mẫu vỏ quế [5]. Trong khi Dược điển Việt Nam V, chuyên luận dược liệu Quế (vỏ thân, vỏ cành) chỉ mới quy định hàm lượng tinh dầu và chưa yêu cầu cụ thể với thành phần hóa học chính [6]. CAL và CA là hai thành phần quyết định tác dụng dược lý của

quế, cũng như mùi và hương vị của dược liệu này [10],[11],[12]. Do đó, cần thiết định lượng CAL và CA để đánh giá chất lượng vỏ quế.

Ngoài ra, coumarin là chất hiện đang rất được quan tâm vì có thể gây độc tính trên gan và hàm lượng CM là một tiêu chí nhập khẩu quế ở một số nước Châu Âu; Cơ quan An toàn Thực phẩm Châu Âu (EFSA) và Viện Đánh giá rủi ro Liên Bang Đức đã thiết lập lượng CM tiêu thụ hàng ngày là 0,12 mg/kg, châu Âu cũng đưa ra mức giới hạn CM trong dược liệu là 5-50 mg/kg [13]. Do đó, xác định hàm lượng CM giúp tăng cường kiểm soát chất lượng dược liệu quế nhục.

Vì vậy, nghiên cứu này được thực hiện với mục tiêu xây dựng phương pháp định lượng đồng thời CAL, CA và CM trong vỏ quế, xác định hàm lượng các chất này trong các mẫu quế thu thập được nhằm định hướng nâng cấp tiêu chuẩn chất lượng dược liệu quế nhục Việt Nam.

2. Đối tượng, nguyên vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Đối tượng nghiên cứu

17 mẫu vỏ quế từ 10-15 năm tuổi được thu hái

từ 2021 - 2023 ở Hoà Bình (5 mẫu), Lào Cai (3 mẫu), Quảng Ninh (3 mẫu), Bắc Kạn (2 mẫu), Thanh Hoá (2 mẫu), Quảng Nam (2 mẫu), Yên Bái (1 mẫu). Các mẫu này được xác định tên khoa học là *Cinnamomum cassia* (L.) Presl. bởi nhóm PGS. TS. Trần Văn Ôn tại Bộ môn Thực vật, Khoa Dược liệu - Dược cổ truyền, Trường Đại học Dược Hà Nội. Mẫu sau khi thu hái được phơi khô tự nhiên. Bảo quản trong túi PE kín, ghi nhãn rõ ràng, bảo quản khô ráo, thoáng mát.

143 mẫu vỏ quế khô thành phẩm được thu mua vào vụ quế tháng 3 và tháng 8 âm lịch năm 2021 - 2023 từ một số vùng khác nhau ở Việt Nam: Quảng Ninh (20 mẫu), Quảng Nam (48 mẫu), Yên Bái (69 mẫu), Thanh Hoá (6 mẫu). Mẫu được đóng gói trong túi PE kín, ghi nhãn rõ ràng, bảo quản khô ráo, thoáng mát.

2.2. Nguyên vật liệu nghiên cứu

Thiết bị nghiên cứu:

Các thiết bị, dụng cụ đã được hiệu chuẩn, đáp ứng yêu cầu GLP gồm: Hệ thống HPLC-PAD Shimadzu LC-40D XR (Shimadzu, Nhật Bản) trang bị hệ thống bơm gradient áp suất thấp 4 kênh dung môi và detector PDA, phần mềm Labsolution; Cột sắc ký Inertsil C₁₈ (250 x 4,6 mm; 5 µm) (GL Sciences, Nhật Bản); và các thiết bị, dụng cụ phân tích phụ trợ khác.

Chất chuẩn và dung môi:

Chất chuẩn acid cinnamic (C₉H₈O₂) hàm lượng 99% (Shanghai Xian Ding Biotec, Trung Quốc); cinnamaldehyd (C₉H₈O) hàm lượng 98%, (Ark Pharm, Trung Quốc); coumarin (C₉H₆O₂) 99,99% (9DingChem, Trung Quốc), acid 2-methoxycinnamic (C₁₀H₁₀O₃) hàm lượng 98%, (KU72D5OB, CAS: 6099-02-2, MW: 178,18); 2-methoxycinnamaldehyd (C₁₀H₁₀O₂) hàm lượng 98,17% (BD218280, CAS: 1504-74-1, MW 162,19); cinnamyl alcohol (C₉H₁₀O) hàm lượng 99,67% (BD235871, CAS: 104-54-1, MW: 134,18); procyanidin B2 (C₃₀H₂₆O₁₂) hàm lượng 98% (ChemFaces, Trung Quốc).

Dung môi: acetonitril (HPLC - Merck), methanol (HPLC - Fisher, Mỹ), acid phosphoric 85% (PA-Merck, Đức), formamid (Samchun, Hàn Quốc), dung dịch chuẩn độ hydranal composite 5K (Merck, Đức).

2.3. Phương pháp nghiên cứu

Điều kiện phân tích:

Đánh giá độ phù hợp hệ thống phân tích dựa trên đáp ứng của hỗn hợp các chất chính trong dược liệu gồm: procyanidin B2, coumarin, cinnamylalcohol, acid 2-methoxycinnamic, acid cinnamic, cinnamaldehyd, 2-methoxycinnamaldehyd [5]. Nghiên cứu này sử dụng cột sắc ký Inertsil C₁₈ (250 x 4,6 mm; 5 µm), bước sóng phân tích 280 nm. Nhiệt độ cột 25°C. Tốc độ dòng pha động 1,0

mL/phút, thể tích tiêm mẫu 10 µL. Khảo sát hệ pha động để chọn điều kiện tối ưu cho quá trình phân tích các thành phần có trong vỏ quế.

Xử lý mẫu:

Lấy khoảng 10 g dược liệu đã cắt nhỏ, nghiền mịn, rây qua rây số 250. Cân chính xác khoảng 0,25 g bột dược liệu, cho vào bình định mức 25 mL. Thêm khoảng 20 mL hỗn hợp dung môi pha mẫu gồm MeOH-H₂O (7:3). Lắc nhẹ 1 phút. Siêu âm 30 phút. Để nguội. Thêm dung môi pha mẫu đến vạch. Lắc đều. Lấy khoảng 5 mL hỗn hợp thu được vào ống ly tâm và ly tâm 3000 vòng/phút trong 5 phút. Lọc lọc dịch trong phía trên qua màng lọc 0,45 µm để tiêm sắc ký. Hàm lượng (%), kl/kl các chất trong mẫu thử được tính theo khối lượng dược liệu khô kiệt [5],[7]. Độ ẩm trong mẫu thử được xác định bằng thuốc thử Karl-Fisher sau khi chiết với formamid khan [5].

Dung dịch chuẩn gốc:

Các dung dịch chuẩn gốc CA, CM, cinnamyl alcohol, procyanidin B2, 2-methoxycinnamaldehyd, acid 2-methoxycinnamic có nồng độ chính xác khoảng 1 mg/mL, dung dịch gốc CAL có nồng độ chính xác khoảng 3 mg/mL được chuẩn bị trong methanol, bảo quản ở nhiệt độ 2 - 8°C, tránh ánh sáng.

Dung dịch chuẩn định lượng:

Các dung dịch chuẩn hỗn hợp sử dụng trong quá trình khảo sát và thẩm định bằng cách pha loãng chính xác các dung dịch chuẩn gốc bằng dung môi pha mẫu cho tới khi thu được dung dịch có nồng độ thích hợp và sử dụng ngay sau khi pha.

Phương pháp được thẩm định đầy đủ theo hướng dẫn của ICH [8] và AOAC [9]. Đánh giá độ đặc hiệu của chất phân tích trên mẫu chuẩn, mẫu thử và dung môi pha mẫu. Tiến hành tiêm sắc ký lặp lại 6 lần liên tục để đánh giá độ thích hợp hệ thống. Phân tích dãy dung dịch chuẩn có nồng độ từ thấp đến cao, ghi lại tín hiệu để xác định khoảng tuyến tính của nồng độ và diện tích pic. Trên cùng một mẫu thử, phân tích 6 lần đánh giá độ lặp, phân tích khác ngày lặp lại thêm 6 lần để đánh giá độ chính xác trung gian. Đối với chỉ tiêu độ đúng, thêm chuẩn vào mẫu thử được giảm một nửa so với khối lượng mẫu phân tích ở 3 mức nồng độ cao - trung bình - thấp. Xác định giới hạn phát hiện và giới hạn định lượng của phương pháp dựa vào tỷ lệ đáp ứng của nhiều nền bằng cách pha loãng mẫu thử đã biết nồng độ. Pha loãng đến S/N ~ 3 và S/N ~ 10 để xác định giới hạn phát hiện và giới hạn định lượng.

3. Kết quả nghiên cứu

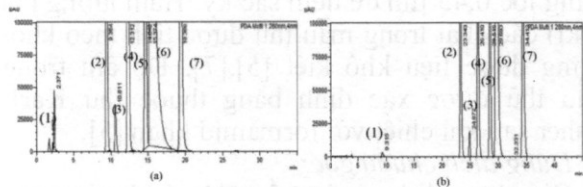
3.1. Khảo sát lựa chọn điều kiện sắc ký

Tiến hành khảo sát chương trình sắc ký với 7 chất: procyanidin B2, coumarin, cinnamylalcohol, acid 2-methoxycinnamic, acid cinnamic, cinnamaldehyd, 2-methoxycinnamaldehyd với 2

hệ pha động gồm dung dịch acid phosphoric 0,05% trong nước (kênh A) và ACN (kênh B), 2 chương trình gradient (Bảng 1). Kết quả được trình bày ở Hình 1.

Bảng 1. Chương trình gradient khảo sát

Gradient 1			Gradient 2		
Thời gian (phút)	Acid phosphoric 0,05% trong nước (% v/v)	ACN (% v/v)	Thời gian (phút)	Acid phosphoric 0,05% trong nước (% v/v)	ACN (% v/v)
0	75	25	0	85	15
1	75	25	15	75	25
21	62	38	21	62	38
30	60	40	30	60	40
35	60	40	38	60	40
			39	85	15
			45	85	15



Hình 1. SKĐ dung dịch 7 chất khi phân tích bằng chương trình gradient 1 (a) và gradient 2 (b).
Chú thích: 1: Procyanidin B₂, 2: coumarin, 3: cinnamyl alcohol, 4: acid cinnamic, 5: acid 2-methoxycinnamic, 6: cinnamaldehyd, 7: 2-methoxycinnamaldehyd.

Kết quả phân tích dung dịch 7 chất với gradien 1, trên sắc ký đồ pic của procyanidin B₂ trùng với pic dung môi, pic acid 2-methoxycinnamic và pic CAL còn xen phủ nhau, độ phân giải chưa đạt, pic CAL bị kéo đuôi (Hình 1.a). Sắc ký đồ 7 chất phân tích với gradient 2 procyanidin B₂ tách ra ở thời điểm khoảng 9 - 10 phút, 3 chất phân tích CM, CA và CAL tách hoàn toàn, các chất còn lại đều cho pic gọn, cân xứng, tách rõ (Hình 1.b).

Khi áp dụng chương trình sắc ký này với dung dịch mẫu thử, kết quả thu được cho các pic tách ra gọn gàng, cân xứng, độ nhiễu đường nền thấp.

Do đó, nghiên cứu sử dụng hệ pha động với chương trình gradient 2 để tiếp tục nghiên cứu. Để xác nhận giá trị sử dụng của phương pháp, tiến hành thẩm định phương pháp phân tích theo các hướng dẫn quốc tế ICH [8] và AOAC 2016 [9].

Bảng 2. Kết quả thẩm định độ đặc hiệu

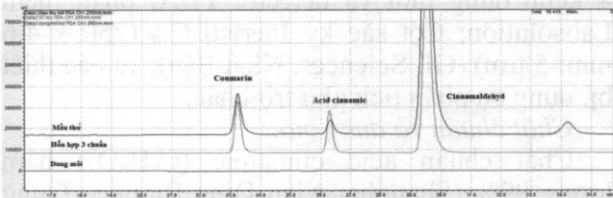
Chất phân tích	Thời gian lưu t _R (phút)		Độ tinh khiết pic	Hệ số Match
	Mẫu thử	Mẫu chuẩn hỗn hợp		
Coumarin (CM)	23,236	23,233	0,9973	0,9990
Acid cinnamic (CA)	26,306	26,293	0,9952	0,9968
Cinnamaldehyd (CAL)	29,516	29,528	0,9997	1,0000

Thời gian lưu của pic CM, CA và CAL trên sắc ký đồ của mẫu chuẩn hỗn hợp và thời gian lưu của dung dịch mẫu thử tương đương nhau. Trên sắc ký đồ mẫu trắng không xuất hiện pic ở trong khoảng thời gian lưu tương ứng với thời gian lưu của các pic CM, CA và CAL.

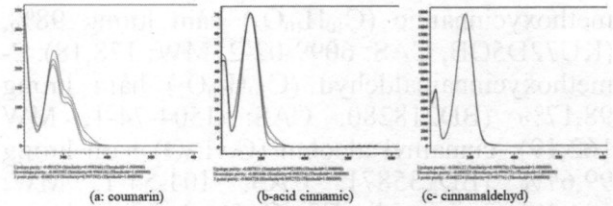
3.2. Thẩm định phương pháp phân tích
Phương pháp phân tích CM, CA và CAL trong mẫu vỏ thân quế ở Việt Nam được thẩm định theo hướng dẫn của ICH [8] và AOAC 2016 [9], kết quả thẩm định cụ thể:

a) Độ chọn lọc

Chuẩn bị mẫu thử và mẫu hỗn hợp 3 chuẩn, tiến hành tiêm sắc ký. Kết quả thu được trình bày ở Hình 2, Hình 3 và Bảng 2.



Hình 2. Chồng sắc ký đồ để đánh giá thời gian lưu của các chất phân tích trong mẫu chuẩn, mẫu thử và dung môi pha mẫu



Hình 3. Phổ UV để đánh giá độ tinh khiết của chất phân tích trong mẫu thử

Độ tinh khiết pic CM, CA và CAL trong mẫu thử lần lượt là 99,73%, 99,52% và 99,97% (Hình 3 và Bảng 2). Phổ UV của các chất phân tích trong mẫu thử và mẫu chuẩn tương tự nhau với hệ số match đều lớn hơn 0,990.

b) Độ thích hợp hệ thống

Tiến hành tiêm sắc ký 6 lần lặp lại mẫu 3 chuẩn có nồng độ CM, CA, CAL lần lượt là 161,78 µg/mL, 59,89 µg/mL và 263,06 µg/mL. Kết quả thu được:

RSD thời gian lưu của CM, CA và CAL trong 6 lần tiêm lặp lại lần lượt là 0,04%, 0,05% và 0,1% < 1,0%. RSD diện tích pic CM, CA và CAL trong 6 lần tiêm lặp lại lần lượt là 0,1%; 0,6% và 0,1% < 2,0%. Số đĩa lý thuyết của cả 3 chất đều lớn hơn 4000, hệ số kéo đuôi xấp xỉ 1,2.

c) Khoảng tuyến tính

Tiến hành phân tích dãy dung dịch chuẩn, ghi lại tín hiệu để xác định khoảng tuyến tính của nồng độ và diện tích pic. Đường chuẩn được đánh giá thông qua hệ số tương quan tuyến tính r. Kết quả thẩm định được trình bày ở Bảng 3.

Trong khoảng nồng độ khảo sát của cả 3 chất CM, CA, CAL có sự phụ thuộc tuyến tính giữa diện tích pic và nồng độ các chất với hệ số tương quan tuyến tính r đều lớn hơn 0,999 (Bảng 3), cho thấy đường chuẩn được xây dựng có độ tuyến tính cao, đảm bảo phép phân tích định lượng CM, CA, CAL. Độ chệch tại mỗi nồng độ trên đường chuẩn đều < 5%.

Sử dụng phần mềm Minitab 21 để phân tích

phương sai của phương trình đường chuẩn xây dựng được, giá trị P_{value} đều lớn hơn 0,05 chứng tỏ sự sai khác giữa giá trị b (trong phương trình $Y = a + bX$) và giá trị 0 là không có ý nghĩa thống kê, do đó phương trình đường chuẩn của CM, CA, CAL xây dựng được không mắc sai số hệ thống.

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

Pha loãng dung dịch mẫu thử thành các dung dịch có nồng độ giảm dần. Tiến hành sắc ký, nồng độ tại đó cho tỷ số tín hiệu/nhiều S/N = 3 thu được giới hạn phát hiện (LOD) của mẫu tiêm sắc ký. Phân tích lặp lại 4 lần. LOQ = 3,3 x LOD. Kết quả trình bày ở Bảng 3.

e) Độ lặp lại và độ chính xác trung gian

Tiến hành phân tích mẫu thử trong 2 ngày, mỗi ngày 6 lần phân tích để đánh giá độ chính xác của phương pháp phân tích. Từ kết quả trình bày ở Bảng 3 nhận thấy giá trị độ lệch chuẩn tương đối của CM, CA và CAL của mỗi ngày và của cả hai ngày đều nằm trong giới hạn cho phép (< 5%). Kết quả so sánh hàm lượng hoạt chất trong 2 ngày khác nhau, cả 3 chất đều có $F_{\text{TN}} < F_{\text{LT}}$: kết quả 2 ngày với 2 người phân tích khác nhau có độ lặp lại giống nhau.

Bảng 3. Kết quả thẩm định chỉ tiêu khoảng tuyến tính, giới hạn định lượng, giới hạn phát hiện và độ lặp lại

	Coumarin (CM)	Acid cinnamic (CA)	Cinnamaldehyd (CAL)
Khoảng tuyến tính			
Khoảng nồng độ (µg/mL)	0,82 - 385,16	1,50 - 119,78	32,88 - 526,11
Phương trình hồi quy	$y = 43650x + 2174,9$	$y = 93740x - 2742,4$	$y = 130563x + 364434$
Hệ số tương quan (r)	1,0000	1,0000	0,9998
P_{value}	0,643	0,766	0,144
Giới hạn phát hiện (LOD)			
HL trong dược liệu (mg/g)	0,007	0,004	0,003
Giới hạn định lượng (LOQ)			
HL trong dược liệu (mg/g)	0,023	0,012	0,010
Độ lặp lại (n=6, ngày 1, người phân tích 1)			
Hàm lượng trung bình (HLTB) (% kl/kl)	0,86	0,12	2,87
RSD (%)	1,4	1,3	1,7
Độ chính xác trung gian (ngày 1, người phân tích 1 n = 6; ngày 2 người phân tích 2 n = 6)			
KNV 2, n = 6			
HLTB (% kl/kl)	0,86	0,12	2,83
RSD (%)	1,0	1,1	1,5
2KNV n = 12			
HLTB (% kl/kl)	0,86	0,12	2,85
RSD (%)	1,1	1,2	1,9
F-test ($F_R = 5,05$)	2,08	4,26	1,34

f) Độ đúng

Tiến hành phân tích mẫu thử thêm chuẩn: Cân chính xác khoảng 0,125 g bột dược liệu vào bình định mức 25 ml. Tiến hành thêm chuẩn ở 3 mức thấp - trung bình - cao của CM, CA, CAL. Kết

quả thẩm định độ đúng của phương pháp (Bảng 4) cho thấy cả 3 chất đều có độ thu hồi và RSD trong giới hạn cho phép theo yêu cầu của AOAC (đối với CM và CA là 97 - 103%, RSD < 2,7% còn với CAL là 98 - 102%, RSD < 1,9%).

Bảng 4. Kết quả thẩm định độ đúng của phương pháp

Mức nồng độ thêm chuẩn (%)	m _{chuẩn thêm vào} (mg)	m _{thử} (g)	m _{định lượng} (mg)	m _{tìm lại} (mg)	% tìm lại	TB	RSD (%)
Coumarin (nồng độ chuẩn gốc 376,0 µg/mL)							
75	1,1281	0,1230	2017,8	1,1521	102,1	102,09	0,14
	1,1281	0,1238	2024,3	1,1530	102,2		
	1,1281	0,1261	2037,4	1,1499	101,9		

Mức nồng độ thêm chuẩn (%)	m _{chuẩn} thêm vào (mg)	m _{thử} (g)	m _{định lượng} (mg)	m _{tìm lại} (mg)	% tìm lại	TB	RSD (%)
100	1,5042	0,1249	2374,0	1,4949	99,4	100,43	0,91
	1,5042	0,1256	2403,8	1,5198	101,0		
	1,5042	0,1249	2396,6	1,5175	100,9		
125	1,8802	0,1239	2773,4	1,9014	101,1	100,70	0,72
	1,8802	0,1264	2790,8	1,9012	101,1		
	1,8802	0,1250	2757,3	1,8776	99,9		
TB (%)					101,1		
RSD (%)					1,0		
Acid cinnamic (nồng độ chuẩn gốc 149,7 µg/mL)							
66	149,7	0,1253	211,0	146,3	97,7	97,5	0,3
	149,7	0,1285	209,9	145,5	97,2		
	149,7	0,1243	210,3	146,1	97,6		
100	224,6	0,1257	282,9	217,9	97,0	97,1	0,2
	224,6	0,1264	281,9	218,5	97,3		
	224,6	0,1261	280,0	217,8	97,0		
133	299,5	0,1268	364,7	299,1	99,9	98,1	1,6
	299,5	0,1262	355,2	290,8	97,1		
	299,5	0,1244	354,3	291,3	97,3		
TB (%)					97,6		
RSD (%)					0,9		
Cinnamaldehyd (nồng độ chuẩn gốc 1335 µg/mL)							
60	4,008	0,1242	6652,3	3,9566	98,7	99,2	1,0
	4,008	0,1246	6724,4	4,0201	100,3		
	4,008	0,1252	6669,4	3,9520	98,6		
100	6,6797	0,1247	9308,5	6,6020	98,8	99,7	0,8
	6,6797	0,1256	9408,5	6,6824	100,0		
	6,6797	0,1246	9400,8	6,6965	100,3		
120	8,0156	0,1252	10786,5	8,0691	100,7	100,6	0,9
	8,0156	0,1255	10717,1	7,9932	99,7		
	8,0156	0,1250	10843,2	8,1302	101,4		
TB (%)					99,8		
RSD (%)					1,0		

Phương pháp xây dựng đã được thẩm định các chỉ tiêu theo yêu cầu ICH [8] và AOAC 2016 [9], đảm bảo yêu cầu đối với một phương pháp phân tích.

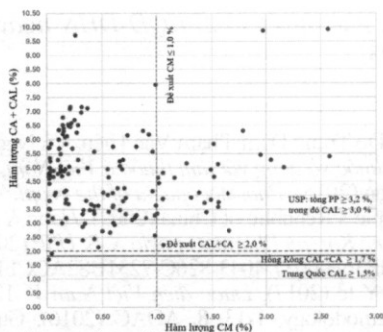
3.3. Ứng dụng phương pháp phân tích mẫu thực

Áp dụng phương pháp đã xây dựng để phân tích các phân tích mẫu vỏ quế gồm 17 mẫu được định danh và 143 mẫu quế thành phẩm (n = 2, lấy giá trị trung bình). Kết quả thể hiện ở Bảng 5 và Hình 4, Hình 5.

Kết quả phân tích các mẫu quế cho thấy, hàm lượng các chất phân tích trong đó tập trung hơn 95% ở khoảng một khoảng rộng, từ 0,01 - 1,66% đối với CM, 2,07 - 7,14% đối với tổng CA và CAL. Vì vậy, việc có một tiêu chuẩn về thành phần chính rất quan trọng trong thực tiễn phù hợp với thực tiễn quế Việt Nam đồng thời có sự hài hòa với các tiêu chuẩn các nước. Kết quả này là cơ sở tiền đề để tiến tới đưa ra tiêu chuẩn cho được liệu quế nhục phù hợp với yêu cầu thực tế.

Bảng 5. Kết quả định lượng CM, CA và CAL của các mẫu quế được định danh

STT	Mẫu	Nguồn gốc	Độ ẩm (%)	HLTB(%), kl/kl, tính theo được liệu khô kiệt)		
				CM	CA	CAL
1	TVO22-08	Lào Cai	13,04	0,032	0,088	2,388
2	TVO22-11	Yên Bái	12,71	0,365	0,064	3,881
3	TVO22-13	Hoà Bình	12,44	0,172	0,071	3,756
4	TVO22-14	Hoà Bình	12,59	0,011	0,074	3,077
5	TVO22-15	Hoà Bình	13,27	0,029	0,122	4,760
6	TVO22-17	Quảng Ninh	12,98	0,288	0,130	5,319
7	TVO22-18	Quảng Ninh	14,55	0,038	0,075	2,797
8	TVO22-19	Quảng Ninh	14,59	0,346	0,036	3,630
9	TVO22-20	Thanh Hoá	13,24	0,019	0,071	4,707
10	TVO22-21	Thanh Hoá	12,60	0,615	0,074	3,684
11	TVO22-28	Thái Nguyên	13,88	0,337	0,055	2,944
12	TVO22-29	Hoà Bình	14,07	0,096	0,030	2,368
13	TVO22-31	Hoà Bình	12,90	0,023	0,098	3,532
14	TVO22-35	Bắc Kạn	12,84	0,415	0,038	3,768
15	TVO22-36	Bắc Kạn	12,31	0,193	0,076	2,338
16	TVO22-43	Hoà Bình	13,03	0,568	0,069	4,081
17	TVO22-44	Hoà Bình	12,76	0,078	0,093	4,160
Trung bình (%)				0,21	0,07	3,60
Giá trị nhỏ nhất (%)				0,01	0,03	2,34
Giá trị lớn nhất (%)				0,61	0,13	5,32



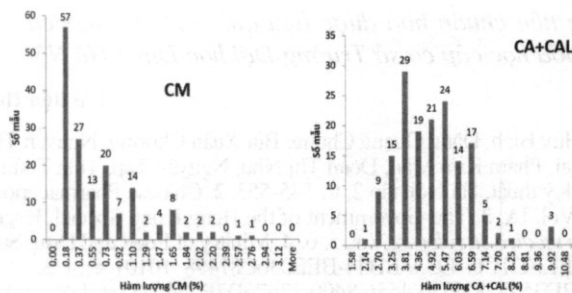
Hình 4. Đồ thị biểu diễn hàm lượng CM và CA + CAL của 160 mẫu quả nghiên cứu

4. Bàn luận

Trong USP 2024, chuyên luận quả chi (*Cinnamomum twig*) sử dụng phương pháp HPLC thông thường với pha động là acetonitril và acid phosphoric, các điều kiện sắc ký này tương đối phù hợp với điều kiện thực nghiệm hiện nay. Tuy nhiên, do nền mẫu khác nhau nên không thể sử dụng được hệ số F của các chất trong chuyên luận quả chi để tính toán kết quả. Do đó, với mục đích tiêu chuẩn hoá dược liệu quả nhục ở Việt Nam, nghiên cứu khảo sát và thẩm định lại phương pháp với đối tượng mẫu quả nhục.

Phương pháp xây dựng với xử lý mẫu đơn giản, chương trình phân tích sử dụng hệ thống sắc ký lỏng hiệu năng cao, cột C_{18} là loại cột thông thường phổ biến trong các phòng phân tích kiểm nghiệm, chương trình pha động ổn định, kết quả phân tích cho đáp ứng tốt, các pic tách tốt, gọn, các thông số sắc ký đều đạt yêu cầu của một phương pháp phân tích. Với 3 chất đánh dấu đã lựa chọn là CM, CA và CAL phương pháp phân tích đã xây dựng cho pic gọn gàng đặc biệt tách hoàn toàn các chất phân tích với các chất có thể có trong mẫu thử với độ phân giải tốt (Resolution > 2). Phương pháp đã được thẩm định các chỉ tiêu theo hướng dẫn của ICH và AOAC đảm bảo giá trị sử dụng trong thực tế.

Sử dụng phương pháp đã thẩm định để định lượng CM, CA và CAL có trong mẫu quả ở Việt Nam. Đối với mặt hàng quả, hiện nay nông dân thông thường mua giống từ các trung tâm kiểm lâm địa phương nên thống nhất về giống. Trong nghiên cứu sử dụng 17 mẫu vỏ quả định danh *Cinnamomum cassia* (L.) Presl. từ các địa phương ở rất nhiều vùng gồm Hòa Bình, Thái Nguyên, Bắc Kạn, Cao Bằng, Lào Cai, Yên Bái, Quảng Ninh, Thanh Hóa cùng với 143 mẫu thu mua tại các vùng trồng quả chính ở Việt Nam gồm Quảng Ninh (20 mẫu), Quảng Nam (48 mẫu), Yên Bái (69 mẫu), Thanh Hoá (6 mẫu). Kết quả nghiên cứu cho thấy, phương pháp xây dựng đã định lượng được thành phần CM, CA và



Hình 5. Biểu đồ phân bố mẫu theo hàm lượng CM và CA+CAL

CAL trong các mẫu vỏ quả. Hàm lượng CM trong mẫu thử đều thấp hơn 2,5%, có hơn 98% số mẫu có tổng hàm lượng CA và CAL trong mẫu lớn 2,0%. Kết quả này cho thấy chất lượng mẫu quả không cho thấy sự khác biệt rõ rệt về vùng trồng. Khi đối chiếu với chuyên luận Quả trong các dược điển thì 100% mẫu nghiên cứu đều đạt tiêu chuẩn của dược điển Trung Quốc và dược điển Hồng Kông, 96,88% số mẫu đạt theo dược điển Hàn Quốc và 86,77% mẫu đạt chỉ tiêu CAL trong dược điển Mỹ. Điều này cho thấy các mẫu quả trồng ở Việt Nam có chất lượng tốt, tuy nhiên khi muốn vào các thị trường khó tính giá thành cao như Mỹ thì cần kiểm soát chất lượng sản phẩm chặt chẽ.

Căn cứ vào kết quả của nghiên cứu và sự hài hòa với các tiêu chuẩn khác, nghiên cứu đưa ra đề xuất tiêu chuẩn đối với vỏ quả Việt Nam là tổng hàm lượng CA và CAL không dưới 2,0% và hàm lượng CM không lớn hơn 1,0%.

5. Kết luận

Với phương pháp xử lý mẫu đơn giản, kỹ thuật phân tích HPLC phổ biến, phương pháp đã định lượng được đồng thời CM, CA và CAL trong vỏ thân quả. Quy trình phân tích đã được thẩm định đạt yêu cầu theo hướng dẫn của ICH [8] và AOAC [9], có độ đặc hiệu phù hợp, độ chính xác cao, độ đúng tốt, khoảng tuyến tính phù hợp. Phương pháp phân tích phù hợp để đánh giá hàm lượng 3 chất trên trong dược liệu quả nhục. Phương pháp đã được ứng dụng để phân tích 143 mẫu vỏ quả thành phẩm tại những vùng địa phương có diện tích vùng trồng lớn ở Việt Nam. Nghiên cứu này là cơ sở tiền đề, định hướng để có các bước tiếp sau nhằm nâng cấp chuyên luận quả của Dược điển Việt Nam.

Lời cảm ơn: Trân trọng cảm ơn Hội đồng Dược Điển Việt Nam đã cung cấp các chất chuẩn và một số mẫu vỏ quả thành phẩm để thực hiện nghiên cứu này. Nghiên cứu này được hoàn thành với sự hỗ trợ kinh phí từ đề tài "Xây dựng phương pháp định lượng acid cinnamic, cinnamaldehyd, chrome-2-on (coumarin) trong vỏ thân quả (*Cinnamomum cassia* (L.)) định

Tài liệu tham khảo

1. Đỗ Huv Bích, Đặng Quang Chung, Bùi Xuân Chương, Nguyễn Thượng Dong, Đỗ Trung Đàm, Phạm Văn Hiền, Vũ Ngọc Lộ, Phạm Duy Mai, Phạm Kim Mẫn, Đoàn Thị Nhu, Nguyễn Tập, Trần Toàn (2006), *Cây thuốc và động vật làm thuốc ở Việt Nam*, NXB Khoa học và Kỹ thuật, Hà Nội, tập 2, tr. 545-553.
2. Chinese Pharmacopoeia Commission (2015), *Pharmacopoeia of the people's republic of china*, Vol. 1A.
3. The Government of the Hong Kong Special, Region of the People's Republic of China (2009), *Hong Kong Chinese materia medica standards*, Vol. 5, 6.
4. Ministry of Food and Drug Safety (2016), *The Korean Pharmacopoeia X*.
5. USP (2022), GUID-A6E28F13-D1CC-493A-BB44-BEE036C87498_10101_en-US, GUID-8940E36B-6037-4043-826C-7251B82ACCFB_1_en-US, GUID-2D357928-6650-4556-8400-13676D7B7446_1_en-US; USP 2024.
6. Bộ Y tế (2017), *Dược điển Việt Nam V*, 1296.
7. ICH GUIDELINE (2018), Q2 (R1) validation of analytical procedures: text and methodology, 1-13.
8. AOAC (2016), Guidelines for standard method performance requirements, Appendix F.
9. Zhang C., Fan L., Fan S., Wang J., Luo T., Tang Y., Chan Z., Yu L. (2019), *Cinnamomum cassia* Presl: A review of its traditional uses, phytochemistry, pharmacology and toxicology, *Molecules* 24(19), 3473.
10. Shi-Lei Geng; Zhao-Xue Cui; Bin Shu; Sheng Zhao; Xin-Hua Yu; (2012), Histochemistry and cell wall specialization of oil cells related to the essential oil accumulation in the bark of *Cinnamomum cassia* Presl. (Lauraceae), *Plant Production Science*, 15(1), pp. 1 - 09.
11. Patel Rakesh Jakhetia Vaibhavi, Khatri Pankaj, et al. (2010), Cinnamon: a pharmacological review, *Journal of Advanced Scientific Research*, 1(02), 19-23.
12. Bùi Thị Lan Phương, Ngô Quang Trung Trịnh Tuấn Nam, Nguyễn Thị Hà Ly, Nguyễn Thị Kiều Anh (2022), Nghiên cứu định lượng coumarin và một số phenylpropanoid trong quế bằng HPLC-PDA và bước đầu phục vụ phân loại quế theo vùng trồng, *Nghiên cứu Dược và Thông tin thuốc*. 13(6), 26-35.
13. EFSA (2008), Coumarin in flavourings and other food ingredients with flavouring properties: Scientific opinion of the panel on food additives, flavourings, processing aids and materials in contact with food (AFC), *European Food Safety Authority* 793, 1-15, doi: <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2008.793>.

Tạp chí Dược liệu, tập 29, số 4/2024 (Trang 228 - 234)

ĐẶC ĐIỂM THỰC VẬT VÀ HOẠT TÍNH KHÁNG VIÊM CỦA CÁC CAO PHÂN ĐOẠN LOÀI DUỐI Ô RÔ TRÊN DÒNG TẾ BÀO BV2

Đỗ Thị Hằng^{1,3}, Lý Tú Loan², Mã Chí Thành^{3,*}

¹Trường Đại học Y Dược Buôn Ma Thuột; ²Khoa Dược, Đại học Tôn Đức Thắng;

³Khoa Dược, Đại học Y Dược thành phố Hồ Chí Minh

*Email: mcthanh@ump.edu.vn

(Nhận bài ngày 04 tháng 4 năm 2024)

Tóm tắt

Duối ô rô có tên khoa học là *Streblus ilicifolius* (S. Vidal) Corner, thuộc chi *Streblus*, họ Dâu tằm (Moraceae), được dân gian sử dụng làm thuốc tiêu độc, trị mụn nhọt. Nghiên cứu gần đây cho thấy một số loài thuộc chi này có tác dụng dược lý tiềm năng như kháng viêm, kháng khuẩn và ức chế enzym tyrosinase. Hiện chưa có nhiều tài liệu nghiên cứu về hình thái, giải phẫu và hoạt tính kháng viêm của loài này ở Việt Nam. Khảo sát hình thái và các đặc điểm vi học cung cấp cơ sở dữ liệu góp phần cho việc định danh loài. Ở các nồng độ 10, 20 và 40 µg/mL, các cao ethanol toàn phần, *n*-hexan, ethyl acetat, *n*-butanol cho thấy hoạt tính kháng viêm mạnh qua việc ức chế sự sản sinh nitric oxid (NO) trên dòng tế bào BV2 với IC₅₀ lần lượt là 25,3 ± 1,9; 20,2 ± 0,12; 20,7 ± 0,49 và 32,3 ± 3,6 µg/mL. Nghiên cứu này xác định hoạt tính kháng viêm của loài này thông qua tác dụng ức chế sự biểu hiện của các protein COX-2 và iNOS.

Từ khoá: *Streblus ilicifolius*, Đặc điểm thực vật, Kháng viêm, Sự sản sinh nitric oxid, Enzym iNOS, Enzym COX-2.

Summary

Botanical Characteristics and Anti-Inflammatory Effects of the Extracts from *Streblus ilicifolius* (S. Vidal) Corner in BV2 Cells

Streblus ilicifolius (S. Vidal) Corner is a species in the Moraceae family, which is used as antidotal and anti-furuncle herb in folk medicine. Some recent studies showed the potential pharmacological activities of this plant, such as anti-inflammation, antimicrobial, and tyrosinase inhibitory effects. The investigation of morphological and taxonomical characteristics provides a database for the identification of *Streblus ilicifolius*. At concentrations of 10, 20, and 40 µg/mL, the ethanol, *n*-hexane, ethyl acetate, and *n*-butanol extracts potentially exhibited anti-inflammatory effects against NO production in BV2 cells with IC₅₀ values of 25.3 ± 1.9, 20.2 ± 0.12, 20.7 ± 0.49, and 32.3 ± 3.6 µg/mL, respectively. This study demonstrates the anti-inflammatory activity of this species is due to the inhibition of COX-2 and iNOS expression in BV2 cells.

Keywords: *Streblus ilicifolius*, Taxonomical, Anti-inflammatory activity, Nitric oxide production, iNOS enzyme, COX-2 enzyme.

1. Mở đầu

Việt Nam nằm trong vùng nhiệt đới gió mùa nên có nguồn tài nguyên cây thuốc phong phú. Do vậy việc định danh và nghiên cứu các cây thuốc theo hướng khoa học hiện đại đang là nhu cầu cần thiết để phát triển ngành dược liệu tiềm năng. Chi *Streblus* có khoảng 25 loài, phân bố chủ yếu ở vùng nhiệt đới châu Á [1]. Trong đó, duối ô rô (*Streblus ilicifolius*) là một loài thuộc

họ Moraceae, dạng cây bụi, phân bố ở các nước Đông Nam Á, Trung Quốc, Ấn Độ. Ở nước ta, cây gặp phổ biến ở miền bắc, Tây Nguyên, mọc rất nhiều ở thung lũng đá vôi hoặc các vùng núi có nhiều đá [2]. Theo Y học cổ truyền Việt Nam, duối ô rô được dùng làm thuốc kháng viêm, tiêu độc, mụn nhọt [3]. Tuy nhiên, những công bố về thực vật học và hoạt tính kháng viêm của loài này còn ít, chỉ có một vài nghiên cứu chứng minh tác