

KHẢO SÁT THÀNH PHẦN CATAPOL VÀ 5-HYDROXYMETHYLFURFURAL TRONG THỰC ĐỊA

Nguyễn Văn Phúc^{1,✉}, Hoàng Minh Chung²

¹Trường Đại học Y Hà Nội

²Trường Đại học Hòa Bình

Trong nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành định tính, định lượng catapol và 5 hydroxymethylfurfural bằng phương pháp sắc ký lớp mỏng và sắc ký lỏng hiệu năng cao của vị thuốc thực địa (*Radix Rehmannia glutinosa praeparata*) sau khi được chế biến trên quy mô công nghiệp 100kg/mẻ theo phương pháp kiểm nghiệm được quy định trong Dược điển Trung quốc 2015 và Dược điển Hàn Quốc VIII. Có đối chiếu với dược liệu sinh địa (*Rehmannia glutinosa Gaertn*), là nguyên liệu đầu vào chế biến thực địa, chất chuẩn catapol và 5 hydroxymethylfurfural. Kết quả thu được cho thấy qua phương pháp sắc ký lớp mỏng mẫu thử sinh địa không có vết tương ứng với vết đối chiếu 5 hydroxymethylfurfural. Mẫu thử thực địa không có vết tương ứng với chất đối chiếu catapol. Với phương pháp sắc ký hiệu năng cao xác định có peak tương ứng với peak catalpol; nhưng không xuất hiện peak tương ứng với peak 5 hydroxymethylfurfural. Hàm lượng 5 hydroxymethylfurfural trong các mẫu thực địa khảo sát tính trên dược liệu khô nằm trong khoảng 0,119 - 0,134 %, đạt theo yêu cầu Dược điển Hàn Quốc VIII (không thấp hơn 0,1%).

Từ khóa: *Rehmannia glutinosa Gaertn*, *Radix Rehmannia glutinosa praeparata*, catapol, 5 hydroxymethylfurfural, sắc ký lỏng hiệu năng cao.

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Sử dụng thuốc cổ truyền đã và đang trở thành một xu hướng phát triển mạnh, không những ở nước ta mà còn ở nhiều nước trên thế giới. Một trong các yếu tố quan trọng làm thuốc cổ truyền phát huy tác dụng tốt và đảm bảo an toàn là phương pháp chế biến, bào chế thuốc cổ truyền. Chế biến các vị thuốc cổ truyền theo phương pháp cổ truyền là quá trình làm thay đổi về chất và lượng của dược liệu thành vị thuốc đã được chế biến theo lý luận và phương pháp của y học cổ truyền hoặc theo kinh nghiệm dân gian, gọi chung là nguyên lý của y học cổ truyền.¹ Vị thuốc cổ truyền là dược liệu được chế biến, bào chế theo lý luận của y học cổ truyền, được sử dụng để phòng bệnh và chữa bệnh, phải đạt các tiêu chuẩn

chất lượng theo quy định.² Hiện nay, phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC), được áp dụng phổ biến để tiêu chuẩn hoá và kiểm tra chất lượng thuốc cổ truyền. Phương pháp HPLC có sử dụng các chất chuẩn đối chiếu (reference standard), việc kiểm nghiệm dược liệu và thuốc cổ truyền một cách thuận tiện và chính xác hơn.^{3,4}

Thực địa là rễ củ đã chế biến của cây Địa hoàng (*Rehmannia glutinosa Gaertn*), họ hoa mõm sói (*Scrophulariaceae*). Catalpol, một glucoside iridoid thu được từ rễ cây địa hoàng (*Rehmannia glutinosa*), có hàm lượng 0,11% trong rễ củ tươi. Catalpol có tác dụng sinh học như hạ đường huyết, giảm đau, kháng viêm, an thần, bảo vệ tế bào gan, và là chất được dùng làm chất đối chiếu để tiêu chuẩn vị thuốc sinh địa.^{5,6} 5 hydroxymethylfurfural là hợp chất không có trong sinh địa mà là chất chuyển hoá được tạo thành trong quá trình chế biến sinh địa thành thực địa. Vì vậy, sử dụng 5

Tác giả liên hệ: Nguyễn Văn Phúc

Trường Đại học Y Hà Nội

Email: nguyenvanphuc@hmu.edu.vn

Ngày nhận: 26/07/2022

Ngày được chấp nhận: 06/09/2022

hydroxymethylfurfural là thuận tiện khi đánh giá quy trình sản xuất có hoàn thiện hay không, mặt khác bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao (có độ chính xác cao) để định lượng đối với hoạt chất 5 hydroxymethylfurfural mang lại độ tin cậy khi kiểm soát quy trình sản xuất cũng như chất lượng sản phẩm.^{7,8} Ngoài ra, 5 hydroxymethylfurfural đã được báo cáo tác dụng đối với bệnh thiếu máu phù hợp với tác dụng của Thục địa theo Y học cổ truyền là vị thuốc bổ huyết.⁹ Chính vì vậy, hoạt chất 5 hydroxymethylfurfural được khuyến cáo trong tài liệu về chất lượng thuốc cổ truyền. Dược điển Hàn Quốc VIII và Tiêu chuẩn chất lượng dược liệu của Hồng Kông quy định hoạt chất 5 hydroxymethylfurfural dùng làm chất đánh dấu để đánh giá chất lượng của thực địa.^{7,10,11} Hiện Dược điển Việt Nam V vẫn chưa áp dụng tiêu chuẩn này. Trên cơ sở hướng dẫn theo Thông tư 30/2017/TT-BYT ngày 11/07/2017 về việc ban hành “*Hướng dẫn phương pháp chế biến các vị thuốc cổ truyền*” áp dụng cho các cơ sở khám chữa bệnh và các cơ sở sản xuất thuốc cổ truyền của Nhà nước và tư nhân, đề tài này được tiến hành chế biến vị thuốc thực địa theo hướng dẫn trên, nhưng triển khai quy mô chế biến công nghiệp với nguyên liệu đầu vào 100kg sinh địa/mẻ và áp dụng theo quy định của dược điển Việt Nam V và Dược điển các nước, với phương pháp kiểm nghiệm hiện đại, có độ tin cậy, khảo sát thành phần hoá học chính được quy định để đánh giá tiêu chuẩn hàm lượng, nhằm đề xuất tiêu chuẩn sau chế biến vị thuốc thực địa với 2 mục tiêu:

1. Định tính bằng phương pháp sắc ký lớp mỏng và sắc ký hiệu năng cao, so sánh với các chất đối chiếu catalpol và 5-hydroxymethylfurfural.

2. Định lượng 5-hydroxymethylfurfural trong thực địa.

II. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP

1. Đối tượng

Dược liệu thực địa được chế theo quy mô 100kg/mẻ từ các lô sinh địa. Sinh địa chế biến thực địa có nguồn gốc từ Hà Nam, Trung Quốc do Công ty cổ phần dược phẩm Khang Minh nhập khẩu trực tiếp theo kế hoạch của dự án sản xuất thử nghiệm thuộc Chương trình khoa học và công nghệ trọng điểm cấp Nhà nước KC 07, đạt tiêu chuẩn ĐĐVN V và được chế biến tại Công ty cổ phần Dược phẩm Khang Minh.

2. Phương pháp

- Lấy mẫu kiểm nghiệm theo phụ lục 12.1 của Dược điển Việt Nam V; 7 mẫu sinh địa và thực địa được khảo sát theo 7 lần chế biến.²

- Định tính bằng phương pháp sắc ký lớp mỏng và sắc ký lỏng hiệu năng cao, so sánh với các chất đối chiếu catalpol và 5-HMF.^{2,4,5,7}

Địa điểm thực hiện

Phòng Kiểm nghiệm, Công ty cổ phần Dược phẩm Khang Minh.

Phương pháp sắc ký lớp mỏng

- Bản mỏng Silicagel GF 254.
- Dung môi khai triển: Cloroform - methanol - nước (14 : 6 : 1).
- Thể tích chấm: 5 µl.
- Phát hiện: Phun dung dịch acid sulfuric 10 % trong ethanol, sấy ở 105°C.
- Dung dịch thử: Cho khoảng 5,0 g dược liệu đã được cắt nhỏ vào cốc có mỏ 250 ml, thêm 100 ml methanol. Phân tán mẫu bằng khuấy từ 5 phút. Siêu âm 10 phút. Lọc, bay hơi đến cạn. Hòa tan cặn trong 1 ml methanol và lọc.
- Dung dịch đối chiếu catalpol: Hòa tan chất đối chiếu catalpol trong methanol để được dung dịch có nồng độ 0,1 mg/ml methanol.
- Dung dịch đối chiếu 5-HMF: Hòa tan chất đối chiếu 5-HMF trong methanol để được dung dịch có nồng độ 0,5 mg/ml.

Phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC)

- Điều kiện sắc ký: Hệ thống sắc ký lỏng cao áp Agilent 1100 LC.

- Cột: ZORBAX SB C18 (4,6 x 250 mm), cỡ hạt 5µm.

- Pha động : 1 ml/phút, chương trình dung môi:

Thời gian (phút)	A (nước)	B (acetonitril)
0 → 10	99,4%	0,6%
10 → 15	99,4% → 94%	0,6% → 6%
15 → 20	94%	6%

- Detector: dãy diod, đặt ở 2 bước sóng 210 nm và 280 nm.

- Chuẩn bị dung dịch thử: 0,5 g dược liệu (sinh địa hoặc thực địa), thêm 10ml methanol 20%, siêu âm 15 phút, lọc vào bình định mức 25ml; chiết tương tự như vậy thêm 2 lần nữa, mỗi lần 6ml methanol 20%. Thêm methanol 20% đến vạch, lắc đều, lọc qua màng lọc 0,45 µm.

- Thẻ tích mẫu tiêm: 20 µl.

Định lượng 5-HMF trong thực địa

- Điều kiện sắc ký:

+ Cột: ZORBAX SB C18, 4,6 x 150 mm, cỡ hạt 5 µm, giữ ở 30°C.

+ Pha động: Nước – methanol, chương trình rửa giải:

Thời gian (phút)	A % (nước)	B % (methanol)
0 → 2	92	8
2 → 10	92 → 84	8 → 16
10 → 12	84 → 92	16 → 8

- Tốc độ dòng: 1 ml/ phút

- Detector: Dãy diod (DAD), đặt ở bước

sóng 280 nm.

- Thẻ tích mẫu: 20 ml.

- Tiến hành:

+ *Pha giai chuẩn 5-HMF*: Dung dịch chuẩn gốc 5-HMF. Cân chính xác khoảng 10,0mg chất chuẩn 5-HMF hòa tan trong 10 ml methanol 20% (nồng độ 1000 µg/ml). Pha loãng dung dịch chuẩn gốc với methanol 20% để được giai chuẩn có nồng độ lần lượt là 1,0; 5,0; 10,0; 20,0 và 40,0 µg/ml.

+ *Dung dịch thử*: Cho 0,5 g chế phẩm đã được cắt nhỏ vào bình nón 50 ml, thêm 10 ml methanol 20%, siêu âm 30 phút, gạn lọc dịch chiết vào bình định mức 25ml; chiết như vậy thêm lần nữa, gộp dịch chiết vào bình định mức trên; rửa cặn với 3ml methanol 20%, lọc vào bình định mức chung với dịch chiết, thêm methanol 20% đến vạch, lắc đều, lọc qua màng lọc 0,45 µm. Lần lượt tiêm các dung dịch đối chiếu và dung dịch thử vào máy, tiến hành sắc ký theo các điều kiện đã mô tả, ghi nhận kết quả sắc ký, tính toán và xử lý kết quả.

Hóa chất và thiết bị

+ Cân phân tích AND GR200.

+ Tủ sấy J-300S.

+ Trang thiết bị triển khai sắc ký lớp mỏng.

+ Bể siêu âm Daihan.

+ Cô giảm áp HS-2005.

+ Bếp đun soxhlet J-SH3.

+ Sắc ký lỏng cao áp Agilent 1100LC.

Chất chuẩn Catalpol và 5 hydroxymethyl-furfural đạt tiêu chuẩn chất chuẩn tinh khiết, do công ty Chengdu Must Biotechnology Co – Trung Quốc phân phối, Công ty TNHH Chuyển Giao Công Nghệ Flavor Việt Nam cung cấp.

+ Methanol.

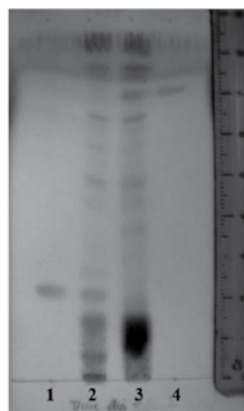
+ Các dụng cụ phòng thí nghiệm.

III. KẾT QUẢ

1. Kết quả định tính bằng phương pháp sắc ký lớp mỏng và sắc ký lỏng hiệu năng cao, so sánh với các chất đối chiếu catalpol và 5-HMF

Kết quả định tính bằng phương pháp sắc ký lớp mỏng

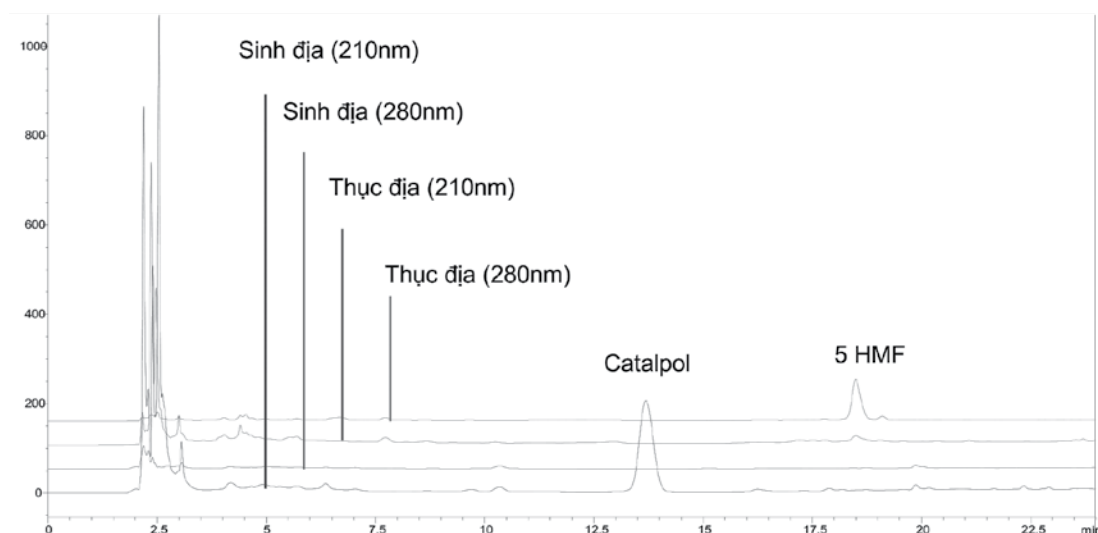
Sau khi phun thuốc thử và sấy cho đến khi các vết hiện rõ, được kết quả: Dung dịch thử Sinh địa không có vết tương ứng với vết chất đối chiếu 5-HMF. Dung dịch thử Thực địa không có vết tương ứng với vết chất đối chiếu catalpol.



Hình 1. Sắc ký đồ mẫu sinh địa, thực địa và chất đối chiếu

1. Chất đối chiếu catalpol.
2. Mẫu sinh địa.
3. Mẫu thực địa.
4. Chất đối chiếu 5-HMF.

Kết quả định tính bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao



Hình 2. Sắc ký đồ HPLC so sánh sinh địa – thực địa

Mẫu thử Sinh địa: Sắc ký đồ ở bước sóng 210nm có peak tương ứng với peak catalpol; sắc ký đồ ở bước sóng 280 nm không xuất hiện peak tương ứng với peak 5-HMF. Mẫu thử Thực địa: Sắc ký đồ ở bước sóng 210nm không có peak tương ứng với peak catalpol; sắc ký đồ ở bước sóng 280 nm có peak tương ứng với peak 5-HMF. Catalpol trong dược liệu đã bị mất đi sau quá trình chế. Từ các kết quả khảo sát trên, chúng tôi không nghiên cứu định lượng

catalpol trong thực địa.

Định lượng 5-HMF trong thực địa

Tính tương thích hệ thống:

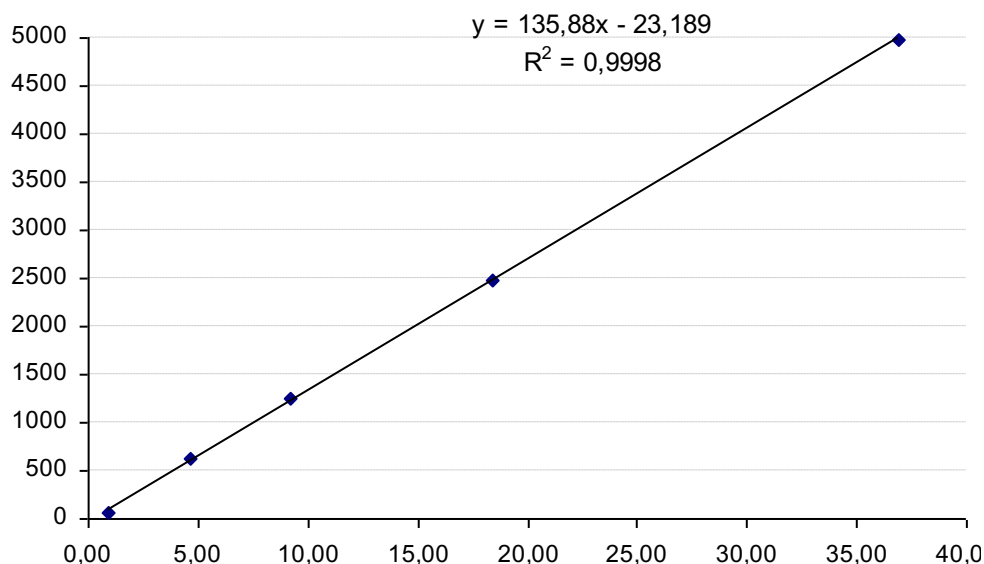
Kiểm tra tính tương thích hệ thống bằng cách tiêm lặp lại 5 lần dung dịch đối chiếu có nồng độ khoảng 10 µg/ml, tiến hành sắc ký theo những điều kiện mô tả, thu thập và xử lý số liệu.

Các lần tiêm mẫu cho thấy hệ thống có độ lặp lại tốt, độ lệch chuẩn tương đối của các

thông số thời gian lưu (t_R) và diện tích peak đều nhỏ hơn 2%. Các peak đối xứng tốt (hệ số đối xứng 1,02 – 1,03). Số đĩa lý thuyết tính tại peak 5-HMF đều trên 15.000.

Thiết lập đường chuẩn 5-HMF:

Lần lượt tiêm các dung dịch của giai chuẩn 5-HMF vào máy, tiến hành sắc ký, thu thập và xử lý số liệu.



Hình 3. Đường biểu diễn sự tương quan giữa nồng độ 5-HMF và diện tích peak

Phương trình hồi quy : $y = 135,88x - 23,189$

Hệ số tương quan: $r^2 = 0,9998$

Kết quả định lượng 5-HMF trong các mẫu thực địa:

Tiến hành định lượng 5-HMF trong các mẫu thực địa, kết quả trình bày ở bảng 1.

Bảng 1. Kết quả định lượng 5-HMF trong các mẫu thực địa

Mẫu	KL cân (g)	Độ ẩm	Diện tích peak	Hàm lượng 5-HMF
1	0,5086	8,9%	2967,029	0,119%
2	0,5206	12,5%	3022,271	0,123%
3	0,5232	15,9%	3112,448	0,131%
4	0,5281	15,3%	2838,712	0,118%
5	0,5448	14,9%	3342,698	0,134%
6	0,5503	15,9%	3351,358	0,134%
7	0,5466	11,7%	3501,651	0,134%

Các mẫu thực địa khảo sát có hàm lượng 5-HMF tính trên được liệu khô trong khoảng 0,119 % - 0,134 %.

IV. BÀN LUẬN

Trên thế giới, mỗi nước có một phương pháp chế biến khác nhau và có đặc thù riêng của từng nước. Tháng 11/2007, Tổ chức Y tế thế giới họp phiên đầu tiên bàn về tiêu chuẩn hóa phương pháp chế biến các vị thuốc theo phương pháp cổ truyền bao gồm các nước Trung Quốc, Hàn Quốc, Nhật Bản và Việt Nam để từ đó có thể đưa ra được phương pháp chế biến chung nhất cho khu vực để đảm bảo kiểm soát chất lượng thuốc y học cổ truyền trong khu vực. Hiện nay, khoa học hiện đại ngày càng phát triển, công nghệ hiện đại đã và đang chứng minh ảnh hưởng của việc chế biến đến các thành phần có trong thuốc và tác dụng sinh học của nó. Đồng thời ngày càng cải tiến các dạng thuốc cổ truyền góp phần nâng cao hiệu quả điều trị, đảm bảo an toàn và dễ sử dụng. Thực hiện phương châm hiện đại hoá thuốc cổ truyền nhưng không làm mất bản sắc của thuốc cổ truyền.^{3,8}

Vì vai trò quan trọng đó mà Bộ Y tế đã ban hành Thông tư số 30/2017/TT-BYT ngày 8/10/2010 về việc Ban hành “*Hướng dẫn phương pháp chế biến các vị thuốc cổ truyền*” áp dụng cho các cơ sở khám chữa bệnh và các

cơ sở sản xuất thuốc Y học cổ truyền của Nhà nước và tư nhân, trong 103 quy trình chế biến có quy trình chế biến thực địa.¹ Hiện tại, trong các cơ sở y tế đa số chế biến thực địa thực hiện theo hướng dẫn của Bộ Y tế, tuy nhiên quy mô còn nhỏ (10 - 40 kg/mẻ), chỉ áp dụng cho các cơ sở tự chế biến và sử dụng tại cơ sở nên việc thực hiện quy trình và đảm bảo chất lượng sau chế chưa đảm bảo đồng nhất. Vị thuốc sau chế biến tuy đã được xây dựng tiêu chuẩn nhưng còn thấp.³ Để đáp ứng nhu cầu sử dụng trong công nghiệp và góp phần tiêu chuẩn hoá vị thuốc sau chế biến. Đề tài thực hiện khảo sát một số ảnh hưởng các nhóm hoạt chất trước và sau chế biến của vị thuốc thực địa, ở quy mô công nghiệp 100kg/mẻ, với phương pháp hiện đại, sử dụng các chất đối chiếu theo quy định trong chuyên luận vị thuốc thực địa, sinh địa của Dược điển Việt Nam và Dược điển Trung Quốc, Dược điển Hàn Quốc.^{2,5,7}

Kết quả thực hiện quy trình hoàn thiện chế biến thực địa (7 mẻ), mỗi mẻ 100 kg sinh địa, các thông số cho quy trình chung thực địa như bảng 2.

Bảng 2. Quá trình chế biến thực địa quy mô 100kg sinh địa/mẻ

Bước tiến hành	Thiết bị	Các thông số
Chưng thực địa từ sinh địa	Nồi 2 vỏ NU 200	- Thời gian chưng: 3 ngày. - 2 ngày đầu chưng với 20 lít rượu và dịch nấu gừng - sa nhân. - Ngày thứ 3 chưng tiếp với 10 lít rượu và dịch còn sa nhân. - Nhiệt độ chưng: 95 - 100°C.
Tắm, ủ	Tủ sấy hoặc băng chuyền sấy HG-16B	- Thời gian tắm, ủ: 2 giờ/lần. - Số lần tắm ủ: 2.
Sấy	Tủ sấy hoặc băng chuyền sấy HG-16B	- Nhiệt độ sấy: 50 - 60°C. - Thời gian sấy: 3 giờ /lần. - Số lần sấy: 3 lần.

Bước tiến hành	Thiết bị	Các thông số
Đóng gói	Máy đóng gói rút chân không	- Thời gian rút chân không + Túi 1 kg: 15 giây. + Túi 2 kg: 20 giây. - Thời gian gia nhiệt ép miệng 1 túi: 1,5 giây. - Thời gian đóng gói/ mẻ: 150 phút.
Tỷ lệ hư hao		- Tỷ lệ hư hao qua quá trình chưng thực không cao hơn 10 %.

Theo quy định, tiêu chuẩn chất lượng dược liệu, thuốc cổ truyền là văn bản quy định về đặc tính kỹ thuật của dược liệu, thuốc cổ truyền bao gồm chỉ tiêu chất lượng, mức chất lượng, phương pháp kiểm nghiệm và các yêu cầu kỹ thuật, quản lý khác có liên quan đến chất lượng dược liệu, thuốc cổ truyền. Vị thuốc sau khi chế biến cũng cần được xây dựng tiêu chuẩn chất lượng hay gọi là tiêu chuẩn vị thuốc sau chế biến.^{1,2}

Định tính sắc ký là việc sử dụng các phương pháp sắc ký như sắc ký lớp mỏng, sắc ký khí, sắc ký lỏng hiệu năng cao... để phát hiện một số thành phần có trong dược liệu; so sánh với chất chuẩn hay thành phần có trong dược liệu chuẩn. Nhờ sự ưu điểm nổi bật, HPLC nhanh chóng được áp dụng rộng rãi trong lĩnh vực dược học, đặc biệt trong nghiên cứu về dược liệu. Do dược liệu có nhiều thành phần khác nhau, việc định tính chúng bằng phương pháp HPLC có thể được thực hiện dựa vào các hoạt chất chính (active substances) của dược liệu hay dựa vào các chất đánh dấu (markers). Để kết luận dương tính, kết quả phân tích HPLC của một dược liệu phải cho thấy nó chứa các hoạt chất hay các chất đánh dấu trong thành phần khi so sánh với kết quả HPLC trong cùng điều kiện thực nghiệm của các chất chuẩn hoạt chất hay chất đánh dấu tương ứng. Ngoài ra, HPLC có ưu điểm ưu việt để định lượng nhiều loại hợp chất khác nhau, cho phép phân tích

các thành phần có hàm lượng thấp, thậm chí các thành phần dưới dạng vết trong các hỗn hợp phức tạp.⁴

Về thành phần hoá học, sinh địa có Iridoid glycosid như Catalpol, rehmaniosid A, rehmaniosid B, rehmaniosid C, rehmaniosid D, ajugol, aucubin, melitosid. Ngoài ra, còn có các iridoid như rehmaglutin A, rehmaglutin B, rehmaglutin C, rehmaglutin D và các loại carbohydrate. Việc quy định chất chuẩn đánh dấu và đối chiếu là hết sức cần thiết, đối với các phương pháp kiểm soát chất lượng dược liệu, thuốc cổ truyền, chất đối chiếu được dùng trong các phép thử định tính và định lượng bằng phương pháp sắc ký.

Trên thế giới, việc kiểm nghiệm chất lượng dược liệu sinh địa, thực địa sử dụng chất chuẩn Catalpol trong đánh giá chất lượng sinh địa và 5-HMF trong đánh giá các yếu tố ảnh hưởng đến quá trình chế biến cũng như xây dựng tiêu chuẩn chất lượng thực địa.^{5,6,8,9} Catalpol thuộc nhóm glucoside iridoid, có hàm lượng 0,11% trong sinh địa. Catalpol có nhiều tác dụng sinh học như tác dụng hạ đường huyết, giảm đau, an thần, bảo vệ gan, còn là chất được dùng để tiêu chuẩn hoá vị thuốc sinh địa.⁶ 5-HMF được sử dụng làm chất đánh dấu hóa học để đánh giá chất lượng của (*Radix Rehmannia glutinosa praeparata*) đã qua chế biến.^{8,10,11} Ngoài ra 5-HMF còn có tác dụng có lợi trong các bệnh thiếu máu.⁹ Mặc dù Thực địa và Sinh

địa có cùng nguồn gốc nhưng Sinh địa và Thực địa là 2 vị thuốc thuộc 2 nhóm thuốc khác nhau, tính vị khác nhau, vì vậy trong y học cổ truyền sử dụng cũng khác nhau. Trong chế biến Thực địa từ Sinh địa đã sử dụng các phụ liệu có tính ấm, vị cay bao gồm Sa nhân, Sinh khương, rượu trắng, ethanol đã được sử dụng kết hợp với phương pháp chưng/nấu để làm thay đổi tính, vị của vị thuốc, đồng thời thay đổi thành phần hóa học và tác dụng sinh học.

Trong các mẫu thử sinh địa, qua phương pháp sắc ký lớp mỏng, kết quả các mẫu thử sinh địa không có vết tương ứng với vết đối chiếu 5-HMF. Mẫu thử thực địa không có vết tương ứng với chất đối chiếu catapol. Với phương pháp HPLC, các mẫu sinh địa xác định có peak tương ứng với peak catalpol; nhưng không xuất hiện peak tương ứng với peak 5-HMF. Còn các mẫu thử Thực địa thì kết quả không có peak tương ứng với peak catalpol; nhưng có peak tương ứng với peak 5-HMF. Như vậy, catapol bị biến đổi trong quá trình chế biến thực địa. Các mẫu thực địa khảo sát có hàm lượng 5-HMF tính trên dược liệu khô trong khoảng 0,119% - 0,134%. Dược điển Việt Nam V chưa quy định chỉ tiêu này. Qua khảo sát Dược điển các nước (Nhật Bản, Trung Quốc, Hàn Quốc), chỉ có Dược điển Hàn Quốc áp dụng mức chỉ tiêu hàm lượng 5-HMF trong thực địa là không ít hơn 0,1%, tính trên dược liệu khô. Kết quả đề tài đề nghị áp dụng mức chỉ tiêu theo quy định của Dược điển Hàn Quốc VIII, hàm lượng 5-HMF trong thực địa không ít hơn 0,1%, tính trên dược liệu khô khi xây dựng tiêu chuẩn chế biến thực địa trên qui mô chế biến công nghiệp vị thuốc thực địa. Trong quy trình chế biến này, chúng tôi đã khắc phục nhược điểm của chế biến truyền thống là phải cần nắng khi chế Thực địa “Phi thái dương bất thành Thực địa” (không có nắng không chế được thực địa). Với quy trình chế biến thực địa theo quy mô công nghiệp đã

chuẩn hóa các thông số và thực hiện trên các thiết bị sản xuất của nhà máy đạt chuẩn GMP (Good Manufacturing Practices) của WHO (*World Health Organization*) với công suất 100 kg/mẻ nên Thực địa được chế biến mà không phụ thuộc vào thời tiết. Sản phẩm chế biến đạt các tiêu chuẩn chất lượng đề ra.

V. KẾT LUẬN

Về định tính: kết quả thu được cho thấy các mẫu thử thực địa sắc ký đồ không có peak tương ứng với peak catalpol; trong khi đó sắc ký đồ có peak tương ứng với peak 5-HMF, trong quá trình chế biến từ sinh địa thành thực địa, catapol bị biến đổi, phát hiện 5-HMF có trong thực địa, không có trong sinh địa.

Về định lượng: Hàm lượng 5-HMF trong các mẫu thực địa tính trên dược liệu khô nằm trong khoảng 0,119 - 0,134 %, đạt theo yêu cầu Dược điển Hàn Quốc (không thấp hơn 0,1%). Kết quả thu được là cơ sở gợi ý một số nhóm chất thay đổi trong quá trình chế biến thực địa, và nâng cấp quy mô chế biến cùng tiêu chí định lượng trong chuyên luận thực địa (*Radix Rehmannia glutinosa praeparata*) theo quy định trong Dược điển Hàn Quốc VIII có sử dụng chất chuẩn với phương pháp HPLC.

Lời cảm ơn

Xin gửi lời cảm ơn sự giúp đỡ của Bộ Khoa học và công nghệ, Cục quản lý Y Dược cổ truyền; Viện kiểm nghiệm thuốc Trung Ương; Công ty cổ phần dược Khang Minh đã giúp đỡ thực hiện dự án chương trình KH&CN trọng điểm cấp nhà nước KC/07.DA 03/11-15; Xin chân thành cảm ơn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Bộ Y tế. Thông tư 30/2017 ngày 11 tháng 7 năm 2017. *Hướng dẫn phương pháp chế biến các vị thuốc cổ truyền*. 2017.
2. Bộ Y tế. *Dược điển Việt Nam V*. Nhà

xuất bản Y học. 2018.

3. Trần Thị Hồng Phương. Hệ thống văn bản quản lý và tình hình chất lượng dược liệu. Tài liệu hội nghị tổng kết công tác y dược cổ truyền năm 2016. 2010.

4. Nguyễn Minh Đức. *Sắc ký hiệu năng cao và một số ứng dụng vào nghiên cứu, kiểm nghiệm dược phẩm, dược liệu và hợp chất tự nhiên*. Nhà xuất bản Y học. 2006.

5. Chinese Pharmacopoeia Commission. *Pharmacopoeia of the People's Republic of China (English edition 2015)*. Chemical Industry press. Beijing, China. 2015.

6. Bai Y, Zhu R, Tian Y, et al. Catalpol in diabetes and its complications: A review of pharmacology, pharmacokinetics, and safety. *Molecules*. 2019; 24(18): 3302. Published 2019 Sep 11. doi:10.3390/molecules24183302.

7. The Korea food and drug administration. *8th edition Korean Pharmacopoeia*. 2012.

8. Li SL, Song JZ, Qiao CF, et al. A novel strategy to rapidly explore potential chemical

markers for the discrimination between raw and processed Radix Rehmanniae by UHPLC-TOFMS with multivariate statistical analysis. *J Pharm Biomed Anal*. 2010;51(4):812-823. doi:10.1016/j.jpba.2009.10.002.

9. Zhou L, Xu JD, Zhou SS, et al. Chemomics-based marker compounds mining and mimetic processing for exploring chemical mechanisms in traditional processing of herbal medicines, a continuous study on Rehmanniae Radix. *J Chromatogr A*. 2017;1530:232-240. doi:10.1016/j.chroma.2017.11.036.

10. The department of health of the Hong Kong (2005), The Hong Kong Chinese *Materia Medica Standards* (HKCMMS), vol II, pp 223-233.

11. W.T. Chang, U. Thissen, K.A. Ehlert, M.M. Koek, R.H. Jellema, T. Hankemeier, J. vander Greef, M. Wang (2006), Effects of Growth Conditions and Processing on *Rehmannia glutinosa* L. Using Fingerprint Strategy. *Planta Medica*, 72(5): 458-467.

Summary

ASSAY OF CATAPOL AND 5-HYDROXYMETHYLFURFURAL COMPOSITIONS IN RADIX REHMANNIE PRAEPARATUS

We conducted a qualitative and quantitative determination of catapol and 5 hydroxymethylfurfural by thin-layer chromatography and high-performance liquid chromatography for Radix Rehmanniae praeparatus processed on an industrial scale of 100kg/batch according to the Chinese Pharmacopoeia 2015 and the Korean Pharmacopoeia VIII test methods. *Rhemannia glutinosa* Gaertn-input material for field processing was also tested; catapol and 5 hydroxymethylfurfural were used as standards. By thin layer chromatography, the biogeochemical sample had no trace corresponding to the 5 hydroxymethylfurfural reference spot . Unstained field specimens corresponded to the catapol reference. With high-performance liquid chromatography, there was a peak corresponding to the catalpol peak, but there was no peak corresponding to 5 hydroxymethylfurfural. The content of 5 hydroxymethylfurfural in the Radix Rehmannia glutinosa praeparata surveyed samples was in the range of 0.119 - 0.134% based on dried medicinal herbs, meeting the requirements of the Korean Pharmacopoeia VIII (equal or greater than 0.1%). Based on aforementioned results, we suggest to upgrade the quantitative criteria in the Radix Rehmanniae praeparatus processed on an industrial scale.

Keywords: *Rhemannia glutinosa* Gaertn, *Radix Rehmanniae praeparatus*, catapol, 5 hydroxymethylfurfural (5-HMF), high-performance liquid chromatography.