

Thẩm định các loài đại hoàng bằng định lượng đồng thời hoạt chất sinh học và phân tích tổng thể sắc đồ

Chữ Văn Mến*; Trương Ngọc Dương*; Nguyễn Văn Long*
Hoàng Văn Lương; Trịnh Nam Trung*; Jong Seong Kang**

TÓM TẮT

Đại hoàng là một dược liệu cổ truyền quan trọng, có 3 loài *Rheum tanguticum*, *Rheum palmatum* và *Rheum officinale*. Hiệu quả điều trị của dược liệu này phụ thuộc phần lớn vào loài. Việc xác định phân loại loài đối với các mẫu Đại hoàng trên thị trường dựa trên phân tích mô học rất khó khăn. Vì vậy, việc tiêu chuẩn hóa và thẩm định loài khi sử dụng đặc trưng hóa học rất quan trọng. Trong nghiên cứu này, phân tích thẩm định loài đơn giản bằng định lượng đồng thời 5 hoạt chất chính là aloe-emodin, rhein, emodin, chrysophanol và physcion nhằm đánh giá chất lượng Đại hoàng. 5 hoạt chất chính được phân lập trên cột pha đảo Optimapak C18 với pha động gồm 0,1% axit phosphoric trong nước:methanol tỷ lệ 15:85; tốc độ dòng 1,0 ml/phút và bước sóng phát hiện 254 nm. Phân tích tổng thể sắc đồ sử dụng LDA cho thấy các loài Đại hoàng từ những nguồn gốc thực vật khác nhau có thể được phân biệt với độ chính xác tới 100%.

* Từ khóa: Đại hoàng; Sắc ký lỏng hiệu năng cao; Đánh giá chất lượng.

Authentication of rhubarb species by simultaneous quantitation of bioactive components and pattern recognition analysis

SUMMARY

Rhubarb is an important traditional herbal drug containing three species *Rheum tanguticum*, *Rheum palmatum* and *Rheum officinale*. The therapeutic effectiveness of this herb depends significantly on the species. The morphological taxonomical identification between species is too difficult during on-site inspection for species authentication among commercial samples in the market. Thus, the standardization and the species authenticity verification using the chemical characteristics would be very important. In the present study, a simple species authentication by HPLC analysis of five main components like aloe-emodin, rhein, emodin, chrysophanol and physcion from Rhubarb samples was carried out to evaluate the quality of Rhubarb. Five main components were base line separated on a Optimapak C18 column with the mobile phase of 0.1% aqueous phosphoric acid:methanol = 15:85. The flow rate was 1.0 mL/min and detection was carried out at 254 nm. Pattern recognition analysis using LDA revealed that Rhubarb species from different botanical origins could be discriminated with the accuracy of up to 100%.

* Key words: Rhubarb; HPLC; Quality evaluation.

* Học viện Quân y

** Đại học Chung Nam, Hàn Quốc

Phản biện khoa học: PGS. TS. Nguyễn Văn Minh

ĐẶT VẤN ĐỀ

Đại hoàng (Rhubarb) là một tập hợp các loài trong chi *Rheum* thuộc họ Polygonaceae. Có 3 loài của chi *Rheum* được chính thức

công nhận trong Dược điển Việt Nam, Hàn Quốc và Trung Quốc là *R. tanguticum*, *R. palmatum* và *R. officinale* [1, 2, 3]. Dược điển Nhật Bản, ngoài 3 loài trên, còn có thêm *R. coreanum* và những loài lai giữa các loài trên là dược liệu Đại hoàng [4]. Ngoài ra, các loài không chính thức như *R. undulatum*, *R. rhaponticum*, *Rumex crispus*, *Rumex aquatica* và *Reynoutria elliptica* cũng thường bị nhầm như là Đại hoàng khi sử dụng.

Dược liệu Đại hoàng chứa anthraquinone [5, 6] có tác dụng nhuận tràng, lợi gan mật, bảo vệ gan, chống viêm và chống ung thư [7, 8, 9]... Xu hướng hiện nay trên thế giới là thẩm định và đánh giá chất lượng dược liệu dựa vào phân tích các thành phần có hoạt tính sinh học trong dược liệu đó. Trong nghiên cứu này, đánh giá chất lượng 5 hoạt chất chính và thẩm định các loài Đại hoàng bao gồm aloe-emodin, rhein, emodin, chrysophanol và physcion. Phân tích tổng thể sắc đồ sử dụng LDA (Linear Discriminant Analysis) cho các loài Đại hoàng để phân loại 30 mẫu Đại hoàng từ 6 loài khác nhau.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Hóa chất và thiết bị.

* *Hóa chất và nguyên liệu:*

Hóa chất: chất chuẩn aloe-emodin, rhein, emodin, chrysophanol, physcion được chiết xuất, phân lập, tinh chế và xác định cấu trúc, methanol, nước cất, axit phosphoric đạt tiêu chuẩn cho sắc ký lỏng hiệu năng cao; các hóa chất khác đạt tiêu chuẩn phân tích.

Mẫu Đại hoàng thu hái từ các vùng khác nhau của Trung Quốc và Hàn Quốc, được GS. Jae Hyun Lee, Khoa Y học Cổ truyền,

Đại học Dongguk thẩm định và lưu trữ tại Khoa Dược, Đại học Quốc gia Chungnam, Hàn Quốc.

* *Thiết bị:*

Máy sắc ký lỏng hiệu năng cao Shimadzu, gồm bơm LC-20AD, detector SPD-20A UV/Vis, hệ thống tiêm mẫu tự động SIL-20A, bộ phận ổn nhiệt CTO-20A (Shimadzu, Nhật Bản). Phân tích thực hiện trên cột C18 (4,6 x 250 mm, 5 μ m, Optimapak, RStech Corp, Hàn Quốc).

2. Phương pháp nghiên cứu.

* *Điều kiện sắc ký:* theo phương pháp của Dược điển Trung Quốc (2005) [2].

Cột phân tích pha đảo Optimapak C18 (250 x 4,6; 5 μ m) của công ty RStech (Hàn Quốc); bước sóng phát hiện 254 nm; pha động gồm dung dịch axit phosphoric 0,1% trong nước và methanol với tỷ lệ 15:85; tốc độ dòng 1 ml/phút; thể tích tiêm 10 μ l.

* *Chuẩn bị dung dịch chuẩn và thử:*

Mẫu chuẩn: cân chính xác một lượng phù hợp aloe-emodin, rhein, emodin và physcion, hòa tan trong methanol để được dung dịch gốc tương ứng có nồng độ 80 μ g/ml với aloe-emodin, rhein, emodin, chrysophanol và 40 μ g/ml với physcion. Lấy chính xác 2 ml mỗi dung dịch gốc trên trộn lẫn để được dung dịch chuẩn có nồng độ 16 μ g/ml với aloe-emodin, rhein, emodin, chrysophanol và 8 μ g/ml với physcion [2].

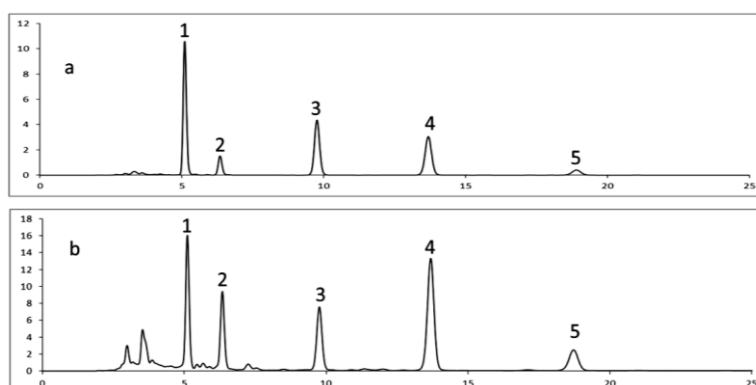
Mẫu thử: cân chính xác một lượng 0,15 g bột dược liệu, cho vào bình nón có nắp, bổ sung 25 ml methanol và cân. Chiết xuất hồi lưu trong thời gian 60 phút, để nguội, cân lại, bổ sung lượng methanol bị mất do bay hơi, trộn đều và lọc. Lấy chính xác 5 ml dịch lọc cho vào bình nón, loại dung môi, thêm 10 ml dung dịch HCl 8%, siêu âm trong 2 phút, thêm 10 ml chloroform. Tiếp tục chiết

hồi lưu trong 60 phút, để nguội, chuyển sang bình gạn, rửa lại bình nón với một lượng nhỏ chloroform, kết hợp dịch rửa vào bình gạn. Tách lấy lớp chloroform, chiết lặp lại 3 lần, mỗi lần 10 ml chloroform. Kết hợp dịch chiết chloroform và cất thu hồi chloroform trong bình cất quay chân không tới khô. Hòa tan cặn trong methanol, chuyển sang bình định mức 10 ml, thêm methanol tới đúng thể tích và lắc đều [2].

KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ BÀN LUẬN

Với điều kiện sắc ký và phương pháp xử lý mẫu đã lựa chọn, trên sắc ký đồ thu được, các pic tách rõ ràng, nhiễu nền thấp thể hiện qua sắc ký đồ của mẫu thử Đại hoàng và hỗn hợp chuẩn. Trên sắc ký đồ,

mẫu thử có thời gian lưu trùng với thời gian lưu của pic aloe-emodin, rhein, emodin, chrysophanol, physcion trong sắc ký đồ của mẫu chuẩn lần lượt là 5,10; 6,34; 9,76; 13,68; 18,72 phút (hình 1). Tại thời gian lưu của pic aloe-emodin, rhein, emodin, chrysophanol, physcion trên các sắc đồ mẫu thử và mẫu chuẩn, chúng tôi so sánh phổ hấp thụ UV. Kết quả cho thấy: phổ mẫu thử và mẫu chuẩn trùng khít lên nhau với hệ số phù hợp lần lượt là 0,9996; 0,9999; 0,9997; 0,9994 và 0,9995, chứng tỏ: pic thu được trên sắc ký đồ của mẫu thử tinh khiết và các thành phần khác có trong mẫu thử không ảnh hưởng đến quá trình phân tích 5 chất đối chiếu aloe-emodin, rhein, emodin, chrysophanol, physcion, qua đó cho phép tiến hành định tính và định lượng.



Hình 1: Sắc ký đồ và so sánh phổ của mẫu chuẩn (a) và mẫu thử (b). (1): aloe-emodin, (2): rhein, (3): emodin, (4): chrysophanol, (5): physcion.

1. Tính thích hợp của hệ thống sắc ký.

Để đánh giá tính thích hợp của hệ thống sắc ký, pha mẫu chuẩn, tiêm 6 lần mẫu chuẩn vào hệ thống HPLC, tiến hành sắc ký với điều kiện đã chọn.

Bảng 1: Kết quả khảo sát tính thích hợp của hệ thống sắc ký.

HOẠT CHẤT	RSD CỦA THỜI GIAN LƯU	RSD CỦA DIỆN TÍCH PIC	SỐ ĐĨA LÝ THUYẾT TRUNG BÌNH (n)	HỆ SỐ BẤT ĐỐI TRUNG BÌNH (T)
-----------	-----------------------	-----------------------	---------------------------------	------------------------------

Aloe-emodin	0,11	0,12	12560	1,11
Rhein	0,12	0,17	13444	1,06
Emodin	0,15	0,18	14426	1,12
Chrysophanol	0,17	0,21	14500	1,09
Physcion	0,18	0,23	15124	1,07

Với điều kiện sắc ký đã lựa chọn phù hợp và đảm bảo độ ổn định của phép phân tích định tính và định lượng aloe-emodin, rhein, emodin, chrysophanol, physcion.

2. Kết quả định lượng.

Tiến hành định lượng các mẫu Đại hoàng theo phương pháp trên. Kết quả cho thấy: tất cả các mẫu giả đều đạt tiêu chuẩn đặt ra của Dược điển Trung Quốc, ngoại trừ

hai mẫu 1019R và 1020E tương ứng với hai loài *R. crispus* và *R. elliptica* (bảng 2). Hàm lượng hoạt chất chính trong các mẫu Đại hoàng biến động nhiều trong tất cả các mẫu (hình 2), không thấy sự khác biệt giữa các loài Đại hoàng thật và giả. Như vậy, phân tích định lượng đơn thuần các thành phần hoạt chất chính trong dược liệu Đại hoàng không đủ để phân biệt các loài Đại hoàng.

Bảng 2: Kết quả phân tích hàm lượng hoạt chất trong các mẫu Đại hoàng.

KÝ HIỆU	LOẠI	NGUỒN GỐC	HÀM LƯỢNG (mg/g)					TỔNG (mg/g)	TỔNG (%)	≥ 1,5%
			(1)	(2)	(3)	(4)	(5)			
1001T	<i>R. tanguticum</i>	TQ	8.43	33.25	9.12	23.57	17.22	91.6	9.16	Đạt
1002P	<i>R. palmatum</i>	TQ	1.39	7.49	1.94	8.95	4.24	24.01	2.4	Đạt
1003P	<i>R. palmatum</i>	TQ	1.66	15.54	4.06	8.97	4.4	34.63	3.46	Đạt
1004P	<i>R. palmatum</i>	TQ	1.92	21.58	2.83	8.42	4.44	39.2	3.92	Đạt
1005P	<i>R. palmatum</i>	TQ	2.14	14.51	6.18	13.88	6.1	42.81	4.28	Đạt
1006T	<i>R. tanguticum</i>	TQ	2.21	21.11	1.48	4.77	1.91	31.47	3.15	Đạt
1007T	<i>R. tanguticum</i>	TQ	2.06	24.62	1.16	3.97	2.39	34.19	3.42	Đạt
1008T	<i>R. tanguticum</i>	TQ	2.14	26.35	2.56	5.85	2.29	39.19	3.92	Đạt
1009O	<i>R. officinale</i>	TQ	2.52	4.28	0.88	10.3	4.98	22.95	2.3	Đạt
1010O	<i>R. officinale</i>	TQ	3.24	9.94	2.04	6.49	3.4	25.12	2.51	Đạt
1011O	<i>R. officinale</i>	TQ	3.96	22.24	10.83	18.92	9.83	65.78	6.58	Đạt
1012O	<i>R. officinale</i>	TQ	3.44	11	1.37	12.26	6.72	34.79	3.48	Đạt
1013P	<i>R. palmatum</i>	TQ	2.25	33.4	3.33	9.47	2.97	51.42	5.14	Đạt
1014U	<i>R. undulatum</i>	HQ	1.23	0.8	1.88	13.56	8.64	26.12	2.61	Đạt
1015U	<i>R. undulatum</i>	HQ	3.66	7.11	2.22	20.44	9.61	43.04	4.3	Đạt
(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)	(9)	(10)	(11)
1016U	<i>R. undulatum</i>	HQ	1.81	10.11	2.82	28.4	15.07	58.21	5.82	Đạt
1017U	<i>R. undulatum</i>	HQ	1.49	0.58	1.99	15.6	10.34	30	3	Đạt
1018R	<i>Rumex crispus</i>	HQ	0.78	4.03	2.79	5.82	4.24	17.67	1.77	Đạt

1019R	Rumex crispus	HQ	0.06	0.04	2.15	5.36	4.32	11.92	1.19	Không đạt
1020E	R. elliptica	HQ	0.07	0.29	6.62	0.18	5.18	12.35	1.24	Không đạt
1021P	R. palmatum	TQ	2.56	23.54	3.76	9.54	4.6	44.01	4.4	Đạt
1022T	R. tanguticum	TQ	2.13	27.5	3.05	6.28	3.65	42.61	4.26	Đạt
1023T	R. tanguticum	TQ	1.65	18.14	2.03	7.61	3.84	33.27	3.33	Đạt
1024T	R. tanguticum	TQ	2.96	31.13	2.53	9.83	4.9	51.34	5.13	Đạt
1025T	R. tanguticum	TQ	2.24	22.04	2.5	11.29	4.02	42.09	4.21	Đạt
1026T	R. tanguticum	TQ	1.74	23.01	3.2	9.85	4.37	42.18	4.22	Đạt
1027T	R. tanguticum	TQ	3.61	24.69	1.97	3.99	3.14	37.41	3.74	Đạt
1028P	R. palmatum	TQ	1.92	18.59	3	18.33	9.61	51.45	5.15	Đạt
1029O	R. officinale	TQ	2.75	5.5	0.79	9.18	5.36	23.57	2.36	Đạt
1030U	R. undulatum	TQ	1.47	1.76	2.09	20.83	13.09	39.24	3.92	Đạt

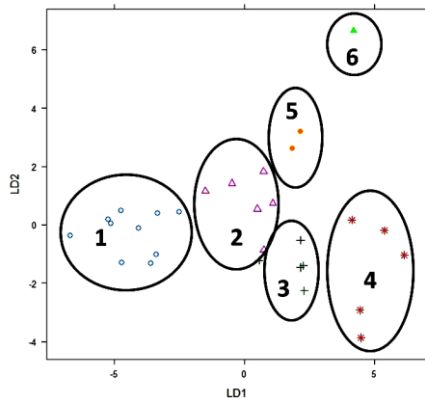
(Ghi chú: (1): aloe-emodin, (2): rhein, (3): emodin, (4): chrysophanol, (5): physcion. TQ: Trung Quốc, HQ: Hàn Quốc.)



Hình 2: Phân bố hoạt chất trong các loài Đại hoàng (mg/g).
(1): aloe-emodin, (2): rhein, (3): emodin, (4): chrysophanol, (5): physcion.

3. Phân tích tổng thể sắc đồ (pattern recognition analysis).

Tiến hành phân tích toàn bộ sắc đồ: tỷ lệ tương đối giữa các pic trên sắc ký đồ sẽ tương đồng trong cùng một loài, đặc trưng cho loài đó và khác biệt với các loài khác. Kết quả phân tích trên LDA dựa vào 5 pic và 6 pic chung cho kết quả phân biệt các loài với độ chính xác tương ứng là 93,10% và 100% (hình 3). Như vậy, phân tích tổng thể sắc đồ cho thấy, các loài Đại hoàng thật (gồm *R. tanguticum*, *R. palmatum* và *R. officinale*) không những phân biệt được với các loài Đại hoàng giả (*R. undulatum*, *R. elliptica* và *R. crispus*) mà còn phân biệt chi tiết từng loài cụ thể với độ chính xác cao.



Hình 3: Kết quả phân tích LDA của các loài Đại hoàng: *R. tanguticum* (1), *R. palmatum* (2), *R. officinale* (3), *R. undulatum* (4), *R. crispus* (5) và *R. elliptica* (6).

KẾT LUẬN

Bằng định lượng đồng thời 5 hoạt chất chính trong Đại hoàng kết hợp với phân tích tổng thể sắc đồ, các loài Đại hoàng được phân loại với độ chính xác cao. Phân tích tổng thể sắc đồ cần kết hợp với phân tích định lượng các hoạt chất chính trong dược liệu nói chung và trong Đại hoàng nói riêng để đánh giá đầy đủ chất lượng của dược liệu.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Dược điển Việt Nam IV. 2010.
2. Pharmacopoeia of the People's Republic of China. 2005.
3. Korean Pharmacopoeia. 2007.
4. The Japanese Pharmacopoeia. 2001.
5. Yoshiki Kashiwada, Gen-ichiro Nonaka, and Itsuo Nishioka. Studies on Rhubarb (Rhei Rhizoma). XV. Simultaneous determination of phenolic constituents by high-performance liquid chromatography. Chem. Pharm. Bull. 1989, 37 (4), pp.999-1004.
6. Komatsu K, Nagayama Y, Tanaka K, Ling Y, Cai SQ, Omote T, Meselhy MR. Comparative study of chemical constituents of Rhubarb from different origins. Chem Pharm Bull. 2006, 54 (11), pp.1491-1499.

7. Li Z, Li LJ, Sun Y, Li J. Identification of natural compounds with anti-hepatitis B virus activity from *Rheum palmatum* L. ethanol extract. *Chemotherapy*. 2007, 53 (5). Pp.320-326.

8. Chang CH, Lin CC, Yang JJ, Namba T, Hattori M. Anti-inflammatory effects of emodin from *ventilago leiocarpa*. *Am J Chin Med*. 1996, 24, pp.139-142.

9. Kang SC, Lee CM, Choung ES, Bak JP, Bae JJ, Yoo HS, Kwak JH, Zee OP. Anti-proliferative effects of estrogen receptor modulating compounds isolated from *Rheum palmatu*. *Arch Pharm Res*. 2008, 31 (6), pp.722-726.