

NGHIÊN CỨU XÂY DỰNG TIÊU CHUẨN CHẤT LƯỢNG BỘT CAO KHÔ NGẢI CỨU

Nguyễn Minh Dũng¹, Nguyễn Duy Bắc²,
Nguyễn Văn Thư², Lê Đức Hùng¹

¹Viện Y học cổ truyền Quân đội,

²Học viện Quân Y.

Tóm tắt

Mục tiêu: xây dựng được tiêu chuẩn chất lượng của bột cao khô Ngải cứu. **Phương pháp:** các chỉ tiêu chất lượng của bột cao khô Ngải cứu được đánh giá theo phương pháp chung của Dược điển Việt Nam (DĐVN) V. **Kết quả:** đã khảo sát được các chỉ tiêu chất lượng của bột cao khô Ngải cứu. Từ đó đưa ra tiêu chuẩn chất lượng của sản phẩm, bao gồm các chỉ tiêu sau: tính chất, mất khối lượng do làm khô, định tính, định lượng, tro toàn phần, kim loại nặng, giới hạn nhiễm khuẩn. **Kết luận:** đã xây dựng được tiêu chuẩn chất lượng của bột cao khô Ngải cứu, với tiêu chuẩn chất lượng xây dựng được, có thể kiểm nghiệm bột cao khô Ngải cứu dùng làm nguyên liệu trong sản xuất thuốc và thực phẩm chức năng.

Từ khóa: Cao khô, Tiêu chuẩn chất lượng, Ngải cứu.

Abstract

Objectives: To establish the quality criteria for the dried extract powder of *Artemisia vulgaris* L. **Methods:** The quality control standardization of dried extract powders was assessed under the Vietnamese Pharmacopoeia V. **Results:** The products (dried extract powder) were characterized and standardized based on the description, weight loss due to drying, identification, quantification, total ash, heavy metal and the limit of bacterial infection. **Conclusion:** The quality criteria were established for the quality controlling of the dried extract powder of *A. vulgaris* used as feedstock in manufacturing of drug and functional food.

Keywords: dry extract, quality criteria, *Artemisia vulgaris* L.

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Ngải cứu (*Artemisia vulgaris* L) là dược liệu được dùng khá phổ biến để điều trị một số bệnh như kinh nguyệt không đều, đau dây thần kinh, phong thấp, tiêu

chảy, chữa thấp khớp...[1]. Một số nghiên cứu hiện nay đã chỉ ra rằng Ngải cứu còn có tác dụng lưu thông máu lên não, trị đau đầu, đau dây thần kinh, hạ đường huyết, điều kinh, chống nhiễm trùng, tiêu

độc, lợi tiểu, giảm đau, chống giun sán và được coi là một loại thuốc hữu ích trong điều trị thấp khớp, hen suyễn, ung thư và động kinh [2]. Theo cách sử dụng dân gian, Ngải cứu thường được dùng tươi hay phơi khô tán thành bột, hãm hoặc sắc uống. Với cách sử dụng như vậy sẽ gây bất tiện cho người dùng (tốn thời gian sắc, liều lượng không đồng đều...), đặc biệt với những người sử dụng trong thời gian dài. Để khắc phục những nhược điểm đó, chúng tôi đã nghiên cứu và bào chế được bột cao khô Ngải cứu làm nguyên liệu đầu vào để bào chế các dạng chế phẩm khác như: thuốc bột, viên nang, viên nén... Để đảm bảo chất lượng và tác dụng của những sản phẩm hoàn chỉnh trên, nghiên cứu được thực hiện với mục tiêu xây dựng tiêu chuẩn chất lượng cho sản phẩm này.

II. NGUYÊN VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Nguyên vật liệu

Nguyên liệu: 3 mẫu bột cao khô Ngải cứu lấy từ 3 lô khác nhau (ký hiệu lần lượt là lô NC1, lô NC2 và lô NC3), sản xuất tháng 9/2020 tại Viện Đào tạo Dược, Học viện Quân y. Bột cao khô được bào chế bằng phương pháp chiết có sự hỗ trợ của sóng siêu âm được liệm với ethanol 70%, dịch chiết được cô thu hồi dung môi đến cao 1:1, sau đó tiến hành phun sấy.

Hóa chất, dung môi: Chất chuẩn eupatilin (98,0%, hãng Sigma); acetonitril: đạt tiêu chuẩn HPLC (Merck); acid acetic, methanol, ethanol: đạt tiêu chuẩn tinh khiết phân tích (Trung Quốc).

2.2. Thiết bị nghiên cứu

Hệ thống HPLC Waters 2695D (Mỹ), detector PDA 2998, cột Eclipse XDB-C18 (150 × 0,46 mm, 5µm, Agilent, Mỹ); bếp cách thủy Memmert (Đức); cân phân tích Mettler, độ chính xác 0,1 mg (Thụy Sĩ)...

2.3. Phương pháp nghiên cứu

Tiến hành khảo sát các chỉ tiêu chất lượng bột cao khô Ngải cứu theo phương pháp chung của ĐVN V [3], bao gồm:

- **Tính chất:** Thử bằng cảm quan

- **Mất khối lượng do làm khô:** Tiến hành thử theo phương pháp xác định mất khối lượng do làm khô, Phụ lục 9.6, ĐVN V.

- **Định tính**

Phản ứng hóa học (định tính nhóm hợp chất flavonoid)

Cân khoảng 0,2 g bột cao khô, hòa tan bằng 10 ml methanol, đun nóng 3-5 phút, để nguội rồi đem lọc và tiến hành các phản ứng.

Phản ứng A: Lấy khoảng 1 ml dung dịch cho vào ống nghiệm, thêm một ít bột Mg, nhỏ từ từ từng giọt dung dịch HCl đậm đặc (TT).

Phản ứng B: Lấy khoảng 1 ml dung dịch cho vào ống nghiệm, thêm 2-3 giọt dung dịch NaOH

10%, sau đó thêm 2-3 giọt nước cất.

Phản ứng C: Lấy khoảng 1 ml dung dịch cho vào ống nghiệm, thêm 2-3 giọt dung dịch FeCl₃ 5% (TT).

Phương pháp HPLC

Tiến hành phân tích mẫu dịch chiết bột cao khô và mẫu dung dịch chuẩn eupatilin ở cùng điều kiện sắc ký như ở mục định lượng.

- **Định lượng:** Phương pháp HPLC (Phụ lục 5.3, ĐĐVN V).

Điều kiện sắc ký: cột Eclipse XDB-C18 (150 × 0,46 mm, 5µm, 100A°); bước sóng phát hiện: 350 nm; tốc độ dòng 1 ml/phút; thể tích tiêm 20 µl; nhiệt độ cột 30°C; pha động: acetonitril : dung dịch acid acetic 0,1% = 38 : 62.

Chuẩn bị mẫu thử và mẫu chuẩn

Chuẩn bị mẫu thử: Cân chính xác khoảng 0,5 g bột cao khô cho vào bình định mức 25 ml, thêm khoảng 20 ml dung môi methanol, lắc siêu âm 30 phút, để nguội, sau đó thêm dung môi vừa đủ đến vạch, lắc đều. Dịch trong bình định mức được lọc qua màng lọc 0,45 µm và dịch lọc được phân tích với hệ thống HPLC.

Chuẩn bị mẫu chuẩn: Hòa tan và pha loãng một lượng chất chuẩn eupatilin trong dung môi methanol để được dung dịch chuẩn có nồng độ 200 µg/ml. Từ dung dịch chuẩn gốc, tiến hành pha dãy chuẩn làm

việc có nồng độ từ 6,25 - 100 µg/ml.

Cách tiến hành:

Kiểm tra khả năng thích hợp của hệ sắc ký: Cân bằng cột bằng hỗn hợp pha động ít nhất 30 phút. Tiêm và ghi sắc ký đồ của dung dịch chuẩn. Độ lệch chuẩn tương đối của diện tích pic trong 6 lần tiêm lặp lại dung dịch chuẩn không được lớn hơn 2,0%.

Tiêm riêng biệt 20 µl dung dịch chuẩn và thử vào máy sắc ký. Tiến hành sắc ký theo điều kiện đã nêu, ghi thời gian lưu và diện tích pic trong sắc ký đồ dung dịch chuẩn và dung dịch thử. Lập đường chuẩn thể hiện mối tương quan giữa nồng độ và diện tích pic eupatilin thu được trên sắc ký đồ. Tính toán hàm lượng eupatilin của mẫu thử theo đường chuẩn xây dựng được

Tính kết quả: Hàm lượng eupatilin (mg/g) trong bột cao khô Ngải cứu khô kiệt được tính theo công thức:

$$HL \text{ (mg/g)} = \frac{(S-b) \times V \times n \times 100}{m_c \times a \times (100-h) \times 1000}$$

Trong đó:

S: Diện tích pic của mẫu thử (µV*s); a: Hệ số góc của đường chuẩn; b: Hệ số chặn của đường chuẩn; m_c: khối lượng của mẫu thử (g); V: Thể tích dung dịch hòa tan mẫu thử (ml); n: Hệ số pha loãng; h: Hàm ẩm của cao (%).

- **Tro toàn phần:** Tiến hành thử theo phương pháp TCVN 8124:2009.

- **Kim loại nặng:** Tiến hành thử theo phương pháp AOAC 999.11.

- **Giới hạn nhiễm khuẩn:** Xác định tổng số vi sinh vật hiếu khí theo TCVN 4884-1:2015; xác định tổng số bào tử nấm men, mốc theo TCVN 8275-2:2010; xác định nhiễm *Staphylococcus aureus* theo TCVN 4830-2:2005; xác định nhiễm *E. coli* theo TCVN 6846:2007; xác định nhiễm *Salmonella* theo ISO 6579-1:2017.

III. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ BÀN LUẬN

Bảng 1. Kết quả xác định tỷ lệ mất khối lượng do làm khô của bột cao khô Ngải cứu

Mẫu	Lô NC1			Lô NC2			Lô NC3		
	Lần 1	Lần 2	Lần 3	Lần 1	Lần 2	Lần 3	Lần 1	Lần 2	Lần 3
Khối lượng bột sấy (g)	2,13	2,06	2,13	2,07	2,35	2,16	2,48	2,39	2,33
Độ ẩm (%)	4,51	4,23	4,57	4,27	4,42	4,15	3,98	4,13	3,95
TB ± SD	4,44 ± 0,32			4,28 ± 0,14			4,03 ± 0,11		
RSD (%)	4,09			3,16			2,68		

Kết quả cho thấy độ ẩm của 3 lô bột cao khô Ngải cứu khoảng 3,95 – 4,57%. Dựa trên kết quả kiểm nghiệm và tham khảo Dược điển Việt Nam V, đề nghị đưa ra mức giới hạn độ ẩm của bột cao khô Ngải cứu

Bảng 2. Phản ứng hóa học định tính bột cao khô Ngải cứu

Phản ứng	Thuốc thử	Kết quả
A	HCl đậm đặc + Mg	Xuất hiện màu đỏ nâu
B	Dung dịch NaOH 10%	Xuất hiện màu vàng đậm hơn
C	Dung dịch FeCl ₃ 5%	Xuất hiện kết tủa màu xanh đen

Kết quả bảng 2 chứng tỏ: 3 mẫu bột cao khô Ngải cứu đều có chứa nhóm hợp chất flavonoid và

Tính chất

Qua quan sát và mô tả, đề nghị đưa ra đặc điểm nhận dạng của bột cao khô Ngải cứu gồm: dạng bột khô tươi, đồng nhất, màu xanh nâu, dễ hút ẩm ngoài không khí, có mùi thơm đặc trưng của dược liệu, không có mùi nấm mốc, vị đắng.

Mất khối lượng do làm khô

Kết quả xác định tỷ lệ mất khối lượng do làm khô của 3 mẫu bột cao khô Ngải cứu được thể hiện ở bảng 1.

là không quá 5%.

Định tính

Phản ứng hóa học

Kết quả định tính 3 mẫu bột cao khô Ngải cứu bằng phản ứng hóa học được thể hiện ở bảng 2.

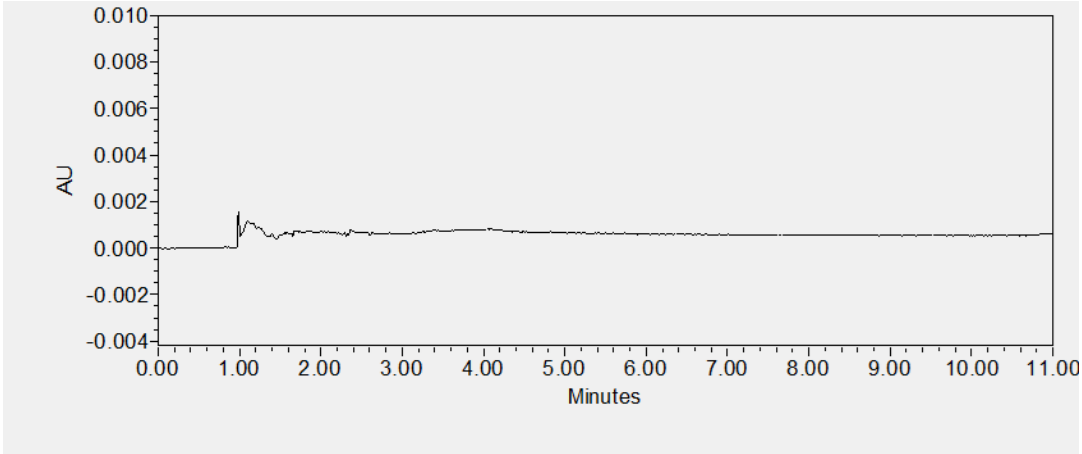
có thể sử dụng 3 phản ứng ở bảng 2 để định tính nhóm hợp chất này trong bột cao khô Ngải cứu.

Phương pháp HPLC

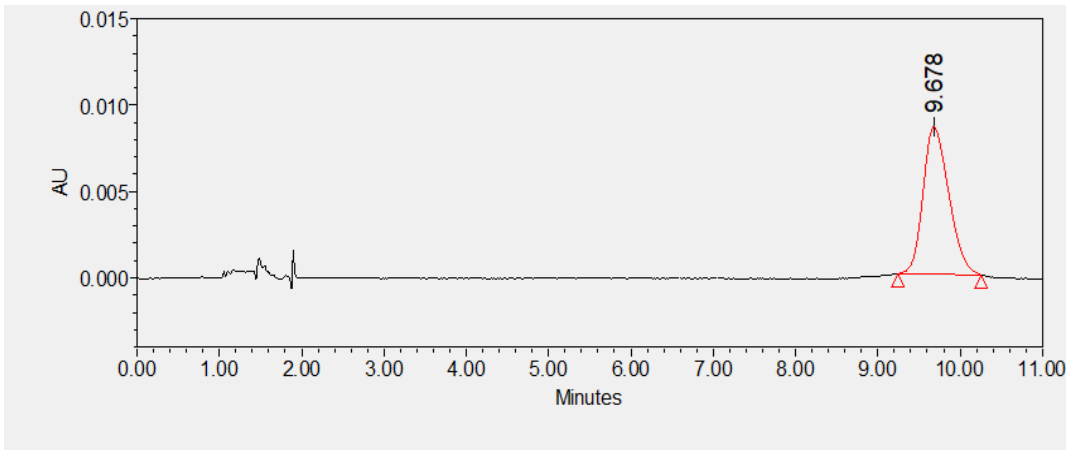
Sắc ký đồ khi phân tích

HPLC các mẫu: mẫu trắng, dung

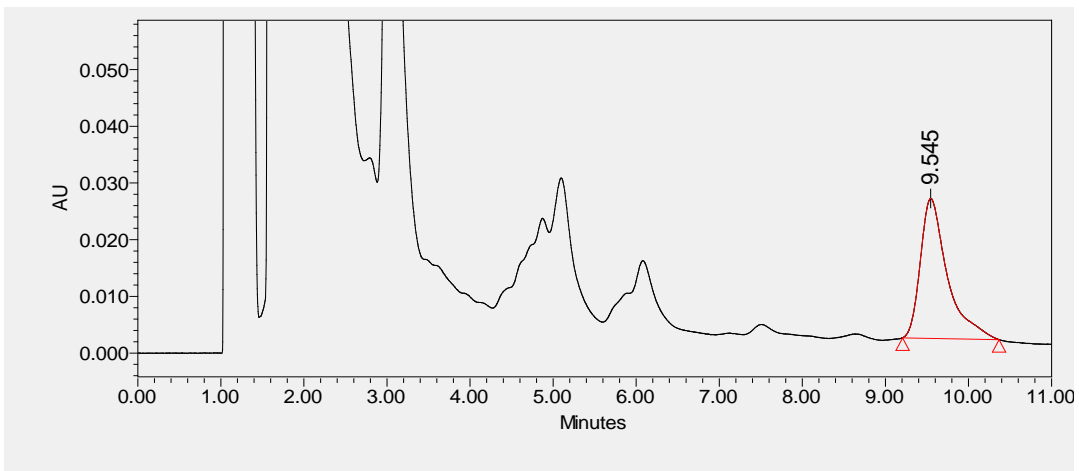
dịch chuẩn và mẫu thử được minh
họa qua các hình 1-3.



Hình 1. Sắc ký đồ mẫu trắng



Hình 2. Sắc ký đồ mẫu chuẩn



Hình 3. Sắc ký đồ mẫu thử

Kết quả 3 hình trên cho thấy: Tại thời điểm khoảng 9,6 phút không thấy pic xuất hiện trên sắc ký đồ mẫu trắng; ngược lại, xuất hiện pic của eupatilin trên sắc ký đồ của

mẫu chuẩn và mẫu thử.

Định lượng

Kết quả xác định hàm lượng eupatilin của 3 mẫu bột cao khô Ngải cứu được thể hiện ở bảng 3.

Bảng 3. Kết quả định lượng eupatilin trong bột cao khô Ngải cứu

Mẫu	Lô NC1			Lô NC2			Lô NC3		
	Lần 1	Lần 2	Lần 3	Lần 1	Lần 2	Lần 3	Lần 1	Lần 2	Lần 3
Khối lượng bột cân (g)	0,4986	0,5017	0,5005	0,4987	0,5012	0,5004	0,4994	0,5008	0,4992
Diện tích pic ($\mu V*s$)	584554	609258	607852	579986	609059	605986	584605	608969	589070
HL (mg/g)	0,88	0,91	0,91	0,87	0,91	0,91	0,87	0,91	0,88
TB\pmSD	0,90 \pm 0,02			0,90 \pm 0,03			0,89 \pm 0,02		
RSD (%)	2,40			2,86			2,38		

Kết quả bảng 3 cho thấy: hàm lượng eupatilin trong 3 mẫu bột cao khô Ngải cứu trong khoảng 0,89 – 0,90 mg/g (tính theo bột cao khô kiệt). Dựa theo kết quả kiểm nghiệm, đề nghị đưa ra mức giới hạn hàm lượng eupatilin trong mẫu

bột cao khô Ngải cứu không dưới 0,5 mg/g.

Tro toàn phần

Kết quả xác định tỷ lệ tro toàn phần của 3 mẫu bột cao khô Ngải cứu được thể hiện ở bảng 4.

Bảng 4. Kết quả xác định tro toàn phần của bột cao khô Ngải cứu

Mẫu	Tro toàn phần		
	Lô NC1	Lô NC2	Lô NC3
1	11,32	11,12	10,18
2	10,48	10,28	10,56
3	11,25	11,14	11,03
$\bar{X} \pm SD$	11,02 \pm 0,47	10,85 \pm 0,49	10,59 \pm 0,43
RSD (%)	4,23	4,53	4,02

Kết quả bảng 4 cho thấy: Tỷ lệ tro toàn phần trong 3 mẫu bột cao khô Ngải cứu trong khoảng từ

10,59% - 11,02%. Dựa trên kết quả kiểm nghiệm, đề nghị đưa ra mức giới hạn tỷ lệ tro toàn phần của bột

cao khô Ngải cứu là không quá 12%.

Kim loại nặng

Kết quả xác định hàm lượng kim loại nặng của 3 mẫu bột cao khô Ngải cứu được thể hiện ở bảng 5.

Bảng 5. Kết quả xác định hàm lượng kim loại nặng của bột cao khô Ngải cứu

TT	Chỉ tiêu	Đơn vị tính	Kết quả
1	Hàm lượng chì (Pb)	ppm	0,05 – 0,08
2	Hàm lượng cadimi (Cd)	ppm	Không phát hiện
3	Hàm lượng asen (As)	ppm	Không phát hiện
4	Hàm lượng thủy ngân (Hg)	Ppm	Không phát hiện

Dựa trên kết quả kiểm nghiệm và tham khảo tài liệu [4], đề nghị đưa ra mức giới hạn kim loại nặng như sau: Hàm lượng Pb ≤ 3,0 ppm; hàm lượng Cd ≤ 1,0 ppm; hàm lượng As ≤ 1,0 ppm;

hàm lượng Hg ≤ 0,1 ppm.

Giới hạn nhiễm khuẩn

Kết quả xác định chỉ tiêu vi sinh vật của 3 mẫu bột cao khô Ngải cứu được thể hiện ở bảng 6.

Bảng 6. Kết quả xác định chỉ tiêu vi sinh vật của bột cao khô Ngải cứu

TT	Chỉ tiêu	Đơn vị tính	Kết quả
1	Tổng số vi sinh vật hiếu khí	CFU/g	Không phát hiện
2	Tổng số bào tử nấm men, mốc	CFU/g	Không phát hiện
3	<i>Staphylococcus aureus</i>	CFU/g	Không phát hiện
4	<i>E. coli</i>	MPN/g	0
5	<i>Salmonella</i>	/25 g	Không phát hiện

Kết quả bảng 6 cho thấy bột cao khô Ngải cứu có độ nhiễm khuẩn đạt yêu cầu giới hạn nhiễm khuẩn theo Phụ lục 13.6, ĐĐVN V. Dựa trên kết quả kiểm nghiệm và tài liệu tham khảo, đề nghị đưa ra mức giới hạn nhiễm khuẩn của bột cao khô Ngải cứu theo Phụ lục 13.6, ĐĐVN V.

Từ những kết quả nghiên cứu trên, đề xuất tiêu chuẩn cơ sở cho bột cao khô Ngải cứu gồm những chỉ tiêu và yêu cầu sau:

- *Tính chất:* Khối bột khô to, đồng nhất, màu xanh nâu, dễ hút ẩm ngoài không khí, có mùi thơm đặc trưng của dược liệu, không có mùi nấm mốc, vị đắng.

- *Mất khối lượng do làm khô:* Không quá 5%.

- *Định tính:* Dịch chiết bột cao khô phải dương tính với phản ứng định tính nhóm hợp chất flavonoid và phải xuất hiện pic eupatilin trên sắc ký đồ HPLC.

- *Định lượng:* Hàm lượng

eupatlin trong bột cao khô Ngải cứu không dưới 0,5 mg/g tính theo bột khô kiệt.

- *Tro toàn phần*: Không quá 12,0%.

- *Kim loại nặng*: Pb \leq 3,0ppm;
Cd \leq 1,0ppm; As \leq 1,0ppm; Hg \leq 0,1ppm.

- *Giới hạn nhiễm khuẩn*: Đạt yêu cầu theo Phụ lục 13.6, DDVN V.

V. KẾT LUẬN

Đã xây dựng được tiêu chuẩn chất lượng của bột cao khô Ngải cứu với một số chỉ tiêu gồm: Tính chất, mất khối lượng do làm khô, định tính, định lượng, tro toàn phần, kim loại nặng và giới hạn nhiễm khuẩn. Tiêu chuẩn này có thể áp dụng để kiểm tra và đánh giá tiêu chuẩn chất lượng của những mẫu bột cao khô Ngải cứu

được bào chế bằng phương pháp tương tự.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. **Viện Dược liệu (2006)**, *Cây thuốc và động vật làm thuốc ở Việt Nam*, NXB. Khoa học và Kỹ thuật, Hà Nội, tập 2.

2. **Abiri R., Silva A. L. M., de Mesquita L. S. S., et al. (2018)**, *Towards a better understanding of Artemisia vulgaris: Botany, phytochemistry, pharmacological and biotechnological potential*. Food Research International., pp. 109:403–415.

3. **Bộ Y tế (2017)**, *Dược điển Việt Nam V*. NXB. Y học, Hà Nội.

4. **Bộ Y tế (2011)**, “*QCVN 8-1:2011/BYT, Thông tư ban hành quy chuẩn kỹ thuật quốc gia đối với giới hạn ô nhiễm hóa học trong thực phẩm*”, Công báo số 535+536, ngày 25/10/2011.