

# Phân lập và thiết lập chất đối chiếu physcion từ rễ cây hà thủ ô đỏ (*Radix Polygonum multiflorum* Thunb.)

Trịnh Hoàng Dương<sup>1</sup>, Trương Tấn Sang<sup>2</sup>, Hứa Gia Chi Bảo<sup>2</sup>, Trần Thu Phương<sup>2,\*</sup>



Use your smartphone to scan this QR code and download this article

## TÓM TẮT

Hà thủ ô đỏ (*Polygonum multiflorum*), thuộc họ Rau răm (Polygonaceae), là một loại dược liệu quý đã được đưa vào sách đỏ Việt Nam cần được bảo vệ. Rễ hà thủ ô đỏ được sử dụng rộng rãi trong y học cổ truyền Việt Nam và Trung Quốc, do đó nhu cầu về vị thuốc này là khá lớn. Tuy nhiên, để đảm bảo chất lượng sản phẩm đến với người tiêu dùng, nguồn dược liệu trên thị trường cần được kiểm soát. Một trong những phương pháp chính xác được dùng để quản lý chất lượng dược liệu là sử dụng chất đối chiếu. Chất đối chiếu được phân lập từ nguồn gốc tự nhiên là những vật liệu quan trọng được sử dụng để kiểm định chất lượng và phân tích vết các sản phẩm có chứa cây dược liệu. Ở Việt Nam, cho tới nay vẫn chưa có hợp chất đối chiếu nào cần thiết cho việc kiểm soát chất lượng của dược liệu hà thủ ô đỏ. Bài báo trình bày kết quả phân lập và thiết lập physcion thành hợp chất đối chiếu từ rễ hà thủ ô đỏ (*Radix Polygonum multiflorum* Thunb.). Quá trình phân lập được thực hiện bằng phương pháp sắc ký cột trên silica gel với nhiều hệ dung môi khác nhau. Độ tinh khiết và chất lượng của hợp chất phân lập được đánh giá bằng phổ hồng ngoại (IR), quang phổ tử ngoại (UV), cộng hưởng từ hạt nhân (NMR) và sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC). Ngoài ra, physcion được đánh giá độ đồng nhất và giá trị ổn định để thiết lập chất đối chiếu theo hướng dẫn của các tiêu chuẩn TCVN ISO 17034:2017, Phụ lục 3-báo cáo kỹ thuật số 943:2006 của Tổ chức Y tế Thế giới (WHO) và ISO 13528:2015.

**Từ khoá:** Anthraquinone, chất đối chiếu, physcion, *Polygonum multiflorum* Thunb

<sup>1</sup>Viện Kiểm nghiệm Thuốc Thành phố Hồ Chí Minh, Việt Nam

<sup>2</sup>Khoa Hóa học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQG-HCM, Việt Nam

## Liên hệ

**Trần Thu Phương**, Khoa Hóa học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQG-HCM, Việt Nam

Email: ttphuong@hcmus.edu.vn

## Lịch sử

- Ngày nhận: 18-9-2022
- Ngày chấp nhận: 28-4-2023
- Ngày đăng: 24-5-2023

## DOI:

<https://doi.org/10.32508/stdjns.v7i2.1235>



## Bản quyền

© ĐHQG Tp.HCM. Đây là bài báo công bố mở được phát hành theo các điều khoản của the Creative Commons Attribution 4.0 International license.



## GIỚI THIỆU

Rễ hà thủ ô đỏ (*Radix Polygonum multiflorum* Thunb.) được sử dụng trong các bài thuốc dân gian làm thuốc bổ, hỗ trợ phục hồi đen râu tóc, trị thần kinh suy nhược, các bệnh về thần kinh, ích huyết khô gân cốt<sup>1,2</sup>. Hiện nay rễ hà thủ ô đỏ đã được sử dụng rộng rãi làm dược liệu cũng như nguyên liệu đầu vào để điều chế các dạng chế phẩm phục vụ cuộc sống. Tuy nhiên, việc phân tích kiểm nghiệm đối tượng trên theo Dược điển Việt Nam V còn gặp nhiều khó khăn, đặc biệt đối với chỉ tiêu định lượng anthraquinone hỗn hợp có sử dụng physcion làm chất đối chiếu, nguyên nhân là do hợp chất đối chiếu này chưa được thiết lập ở Việt Nam dẫn đến phải nhập từ nước ngoài với chi phí cao và thời gian vận chuyển dài. Từ nhu cầu thực tế cho thấy việc sản xuất hợp chất đối chiếu physcion để phục vụ nhu cầu kiểm nghiệm trong nước là rất cần thiết. Nghiên cứu trước đây cho biết rễ hà thủ ô đỏ chứa physcion với hàm lượng 0,05–0,34 g trên 1 kg mẫu khô<sup>3</sup>, phù hợp để hợp chất này được lựa chọn phân lập với số lượng lớn và thiết lập làm chất đối chiếu. Các yếu tố nêu trên chính là tiền đề để nghiên cứu phân lập physcion từ rễ hà thủ ô đỏ và thiết lập làm hợp chất đối chiếu được thực hiện, phục vụ cho công tác kiểm tra chất lượng.

## VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

### Đối tượng nghiên cứu

Rễ hà thủ ô đỏ do Công ty cổ phần Dược phẩm OPC cung cấp vào tháng 8/2019, có phiếu phân tích chứng nhận đạt tiêu chuẩn Dược điển Việt Nam V<sup>4</sup>.

### Hóa chất

Sắc ký lớp mỏng được thực hiện trên bản silica gel F<sub>254</sub> (Merck), các cấu tử trên bản mỏng được phát hiện bằng đèn tử ngoại. Sắc ký cột (SKC) sử dụng silica gel (60-200 μm, Merck). Dung môi đạt tiêu chuẩn phân tích hoặc HPLC tùy điều kiện sử dụng: acetone, ethyl acetate, ethanol, methanol. Hóa chất đạt tiêu chuẩn tinh khiết phân tích: phosphoric acid.

### Thiết bị

Bể siêu âm M5800-E (Branson, Mỹ); Máy quang phổ hồng ngoại IS50 (Thermo, Mỹ); Máy quang phổ tử ngoại UV 2700 (Shimadzu, Nhật Bản); Máy NMR Avance II 400 MHz (Bruker, Mỹ); Tủ sấy FDL 115 (Binder, Đức); Lò nung ELF 1/14 (Carbolite, Anh); Máy chuẩn độ Karl Fischer T90 (Mettler Toledo, Thụy Sĩ); Máy HPLC CBM 20A (Shimadzu, Nhật Bản);

**Trích dẫn bài báo này:** Dương T H, Sang T T, Bảo H G C, Phương T T. **Phân lập và thiết lập chất đối chiếu physcion từ rễ cây hà thủ ô đỏ (*Radix Polygonum multiflorum* Thunb.).** *Sci. Tech. Dev. J. - Nat. Sci.*; 2023, 7(2):2599-2607.

Máy HPLC 1260 (Agilent, Mỹ); Máy HPLC Alliance system (Water, Mỹ).

### Phương pháp chiết xuất và phân lập

Rễ hà thủ ô khô (20 kg) được xay thành bột và ngâm với ethanol 96% (30 L, 1 tuần × 3). Gôm các phần dịch chiết lại, cô quay mỗi lần 0,5 L đến khi không còn giọt dung môi hữu cơ ngưng tụ trong bình hứng. Gôm các dịch sau cô quay lại và đun cách thủy bay hơi dung môi thu được cao thô ethanol (1 kg). Cao thô được phân tán hoàn toàn vào nước (1 L), rồi chiết lỏng-lỏng với ethyl acetate (2 L) cho đến khi pha hữu cơ mất màu thì dừng lại. Dịch chiết ethyl acetate được thu hồi dung môi dưới áp suất kém, thu được cao ethyl acetate (256,7 g).

Sắc ký cột cao ethyl acetate trên silica gel với hệ dung môi *n*-hexane : acetone có độ phân cực tăng dần (0-100%) thu được tám phân đoạn (PME1-8). Sắc ký cột phân đoạn PME3 trên silica gel bằng hệ dung môi *n*-hexane : chloroform (5-10%), sau đó tăng độ phân cực bằng hệ dung môi *n*-hexane : ethyl acetate (10-20%) thu được bảy phân đoạn (PME3.1-7). Tinh chế phân đoạn PME3.2 (638 mg) bằng cách kết tinh lại trong acetone, thu được một hợp chất tinh khiết màu vàng cam (419 mg).

### Xác định độ tinh khiết bằng phương pháp sắc ký bản mỏng

Độ tinh khiết của sản phẩm được kiểm tra bằng cách chấm 5  $\mu$ L mẫu thử [0,5 mg/ mL trong hỗn hợp methanol:chloroform (1:1, v/v)] trên bảng silica gel F<sub>254</sub> với 2 hệ dung môi: *n*-hexane : ethyl acetate (9:1, v/v), *n*-hexane:acetone (8:2, v/v) và silica gel RP18 với hệ dung môi acetone : nước (9:1, v/v). Hợp chất được cho là tinh khiết khi các bản mỏng sau khi giải ly, chỉ xuất hiện một vết duy nhất.

### Xác định độ tinh khiết bằng phương pháp HPLC

Pha động: (A) Dung dịch phosphoric acid 0,1% (10%) - (B) Methanol (90%); cột Germini C<sub>18</sub> (25 cm x 4.6 mm; 5  $\mu$ m); Đầu dò PDA với bước sóng phát hiện 265 nm; Tốc độ dòng: 1,0 mL/phút; Thể tích tiêm mẫu: 10  $\mu$ L.

Dung dịch thử được chuẩn bị bằng cách hòa tan 5 mg mẫu thử trong 10 mL hỗn hợp methanol : chloroform (1:1, v/v). Dung dịch mẫu trắng là hỗn hợp methanol : chloroform (1:1, v/v).

Tiêm lần lượt dung dịch thử và dung dịch mẫu trắng vào hệ thống sắc ký và ghi lại sắc ký đồ. Bỏ qua tất cả các pic phụ trong dung dịch thử có thời gian lưu tương ứng với các pic trong dung dịch mẫu trắng và

các pic có diện tích nhỏ hơn LOQ trong phần thẩm định phương pháp khi xem sắc ký đồ ở bước sóng phát hiện của sản phẩm tinh chế. Hợp chất được cho là tinh khiết khi tỷ lệ diện tích pic chính trong sắc ký đồ dung dịch thử đạt > 95%.

### Thẩm định phương pháp HPLC<sup>5</sup>

- Quy trình phân tích: thực hiện tương tự như mục "Xác định độ tinh khiết bằng phương pháp HPLC".

- Chuẩn bị các dung dịch: Dung dịch mẫu trắng: methanol : chloroform (1:1, v/v); Dung dịch thử: Dung dịch có nồng độ hoạt chất 0,5 mg/mL trong methanol : chloroform (1:1, v/v); Các dung dịch thử độ đặc hiệu bao gồm 5 mL dung dịch thử + 3 giọt HCl 37%, 5 mL dung dịch thử + 3 giọt H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30%, 5 mL dung dịch thử + 3 giọt NaOH 20%. Trộn đều, để yên 60 phút; Các dung dịch thử độ tuyến tính: Sử dụng dãy dung dịch có nồng độ hoạt chất là 0,05; 0,125; 0,25; 0,50; 0,625 và 0,750 mg/mL trong methanol : chloroform (1:1, v/v); Các dung dịch thử độ chính xác (độ lặp lại và độ tái lập trung gian): Sử dụng dung dịch có nồng độ hoạt chất 0,5 mg/mL trong methanol : chloroform (1:1, v/v); Các dung dịch thử độ đúng: Sử dụng dãy dung dịch có nồng độ hoạt chất là 0,05; 0,5; và 0,75 mg/mL trong methanol : chloroform (1:1, v/v).

### Xây dựng tiêu chuẩn đánh giá chất lượng nguyên liệu<sup>5</sup>

Gồm các chỉ tiêu: Cảm quan, định tính, mất khối lượng do làm khô, xác định tro sulfate, độ tinh khiết sắc ký.

### Kiểm tra chất lượng nguyên liệu

Tiến hành kiểm tra và kết luận chất lượng nguyên liệu theo tiêu chuẩn được xây dựng nêu trên.

### Thiết lập chất đối chiếu

**Đóng lọ:** Lượng mẫu nhất định được chia vào các lọ thủy tinh màu nâu trong môi trường khí trơ với độ ẩm < 30%RH, sau đó dập nắp kín.

**Xác định độ đồng nhất của quá trình đóng lọ ISO 17034<sup>6</sup>:** Các mẫu được lấy ngẫu nhiên từ 10 đến 30 đơn vị bằng phần mềm Excel. Việc xác định độ tinh khiết của các chất được tiến hành theo phương pháp HPLC đã xây dựng và thẩm định, mỗi lọ được xác định 2 lần. Việc xác nhận độ đồng nhất của quá trình đóng lọ được dựa trên hướng dẫn của ISO 13528<sup>7</sup>.

**Đánh giá độ đồng nhất liên phòng thí nghiệm:** Nguyên liệu sau khi đóng gói và đánh giá độ đồng nhất lọ đạt yêu cầu sẽ được lấy mẫu ngẫu nhiên và tiến hành xác định độ tinh khiết HPLC tại ba phòng thí nghiệm độc

lập đạt GLP hoặc ISO/IEC 17025. Việc đánh giá đồng nhất lọ liên phòng thí nghiệm được thực hiện bằng phép phân tích phương sai một yếu tố ANOVA ( $P=0,95$ )<sup>7</sup>.

*Xác định giá trị ổn định và độ không đảm bảo đo:* Việc xác định giá trị ổn định trên phiếu kiểm nghiệm physician và độ không đảm bảo đo được thực hiện theo hướng dẫn của ISO 13528:2005 dựa theo đánh giá kết quả của các phòng thí nghiệm<sup>7</sup>.

Theo quy trình thường quy và theo hướng dẫn của Dược điển Quốc tế (IP) và của Tổ chức Y tế Thế giới (WHO), hàm lượng nguyên trạng được xác định phương pháp cân bằng khối lượng (mass-balance) theo công thức<sup>8,9</sup>: Hàm lượng nguyên trạng = Độ tinh khiết sắc ký  $\times$  (100 - % tạp bay hơi - % tạp vô cơ)/100.

## KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

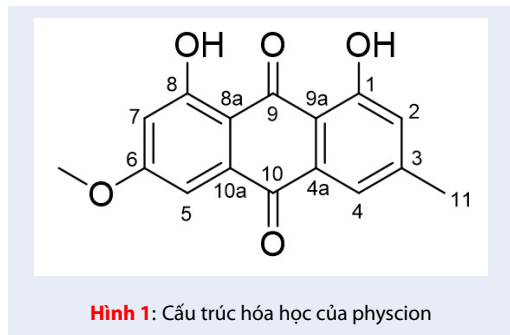
### Xác định cấu trúc

Từ cao EtOAc của rễ hà thủ ô đỏ, đã phân lập được một hợp chất tinh khiết dạng bột màu vàng cam. Phổ hấp thụ phân tử (UV-Vis) cho đỉnh hấp thụ cực đại tại 223, 254, 265, 286 và 433 nm. Phổ IR cho tín hiệu hấp thụ đáng trưng ( $\text{cm}^{-1}$ ) tại 1674 (nối C=O); 1612 (nối C=C vòng). Phổ <sup>1</sup>H NMR và <sup>13</sup>C NMR (Bảng 1) cho các tín hiệu cộng hưởng ứng với sự hiện diện của hai hydroxy kiềm nối [ $\delta_H$  12,31 (1H; s; 8-OH) và 12,12 (1H; s; 1-OH)]; hai vòng benzene 1,2,3,5-tứ hoán [ $\delta$  7,61 (1H; d; 1,1 Hz; H-4); 7,35 (1H; d; 2,5 Hz; H-5); 7,07 (1H; dd; 1,7 và 0,9; H-2); 6,68 (1H; d; 2,6 Hz; H-7)] và [ $\delta_C$  166,7 (s; C-8); 165,3 (s; C-1); 162,6 (s; C-6); 148,6 (s; C-3); 135,4 (s; C-10a); 133,4 (s; C-4a); 113,8 (s; C-9a); 110,4 (s; C-8a); 124,6 (d; C-4); 121,4 (d; C-2); 108,3 (d; C-5); 106,7 (d; C-7)], Ngoài ra còn có tín hiệu của một nhóm methoxy [ $\delta_H$  3,95 (3H; s; 6-OCH<sub>3</sub>) và  $\delta_C$  56,2 (q; 6-OCH<sub>3</sub>)] và một nhóm methyl [ $\delta_H$  2,46 (3H; s; C-11) và  $\delta_C$  22,3 (q; C-11)]. Các số liệu phổ trên cho phép dự đoán đây là một anthraquinone, có công thức phân tử là C<sub>16</sub>H<sub>12</sub>O<sub>5</sub> và độ bất bão hòa là 11. Kết hợp so sánh với tài liệu tham khảo<sup>10</sup> cho thấy hợp chất này là physcion (hay 1,8-dihydroxy-3-methoxy-6-methylanthraquinone) (Hình 1).

### Xác định độ tinh khiết

*Sắc ký bản mỏng:* Tất cả các hệ dung dịch thử đều cho 1 vết duy nhất trên bản mỏng.

*HPLC:* Xác định được độ tinh khiết của sản phẩm > 95,0% (Hình 2).



Hình 1: Cấu trúc hóa học của physcion

Bảng 1: Số liệu phổ <sup>1</sup>H (400 MHz) và <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz) của physcion trong CDCl<sub>3</sub> (J tính bằng Hz)

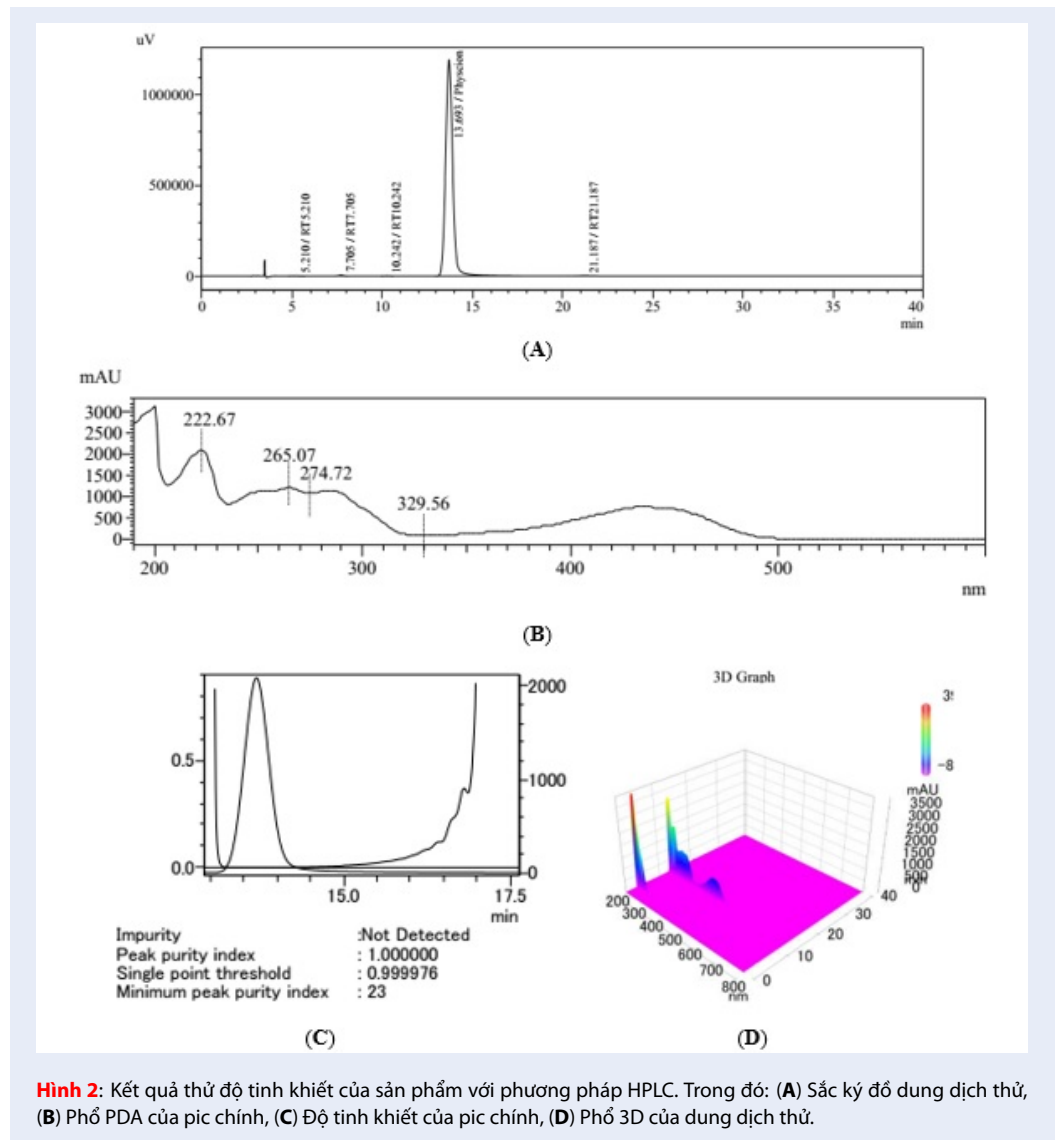
Vị trí	$\delta_H$ (ppm)	$\delta_C$ (ppm)
1		165,3
2	7,07 dd (1,7; 0,9)	121,4
3		148,6
4	7,61 d (1,1)	124,6
5	7,35 d (2,6)	108,3
6		162,6
7	6,68 d (2,6)	106,9
8		166,7
9		190,9
10		182,2
4a		133,4
8a		110,4
9a		113,8
10a		135,4
11	2,46 s	22,3
1-OH	12,12 s	
8-OH	12,31 s	
6-OCH <sub>3</sub>	3,95 s	56,2

### Xây dựng tiêu chuẩn chất lượng

#### Thẩm định phương pháp xác định độ tinh khiết sắc ký

*Tính tương thích hệ thống:* Tiến hành sắc ký lặp lại 6 lần dung dịch thử. Kết quả thu được pic physcion có thời gian lưu khoảng 13,6 phút; số đĩa lý thuyết N= 5900; hệ số đối xứng t= 1,1; độ lệch chuẩn thời gian lưu RSD= 0,3%; độ lệch chuẩn diện tích pic RSD= 0,1%.

*Độ đặc hiệu:* Kết quả phân tích độ đặc hiệu được trình bày trong Hình 3 cho thấy mẫu trắng không



có pic trùng với pic physcion của dung dịch thử, pic physcion trong dung dịch thử có độ tinh khiết pic = 1,000. Các pic phụ trong dung dịch thử và các dung dịch phân hủy tách hẳn ra khỏi pic chính.

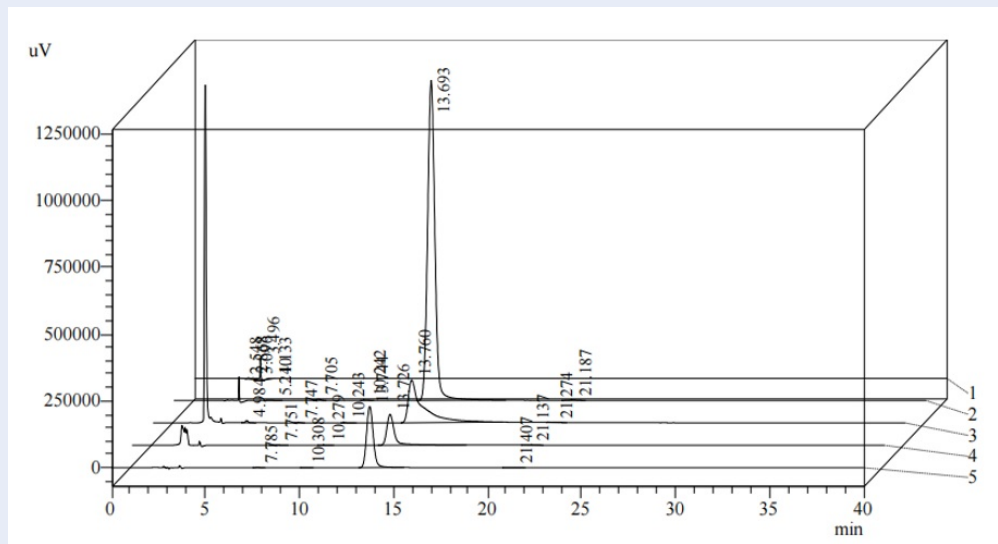
**Độ tuyến tính:** Tiến hành sắc ký dây dung dịch thử độ tuyến tính. Kết quả thu được (Hình 4) phương trình hồi quy:  $\hat{y} = 67830392x$ , hệ số tương quan:  $R = 0,9999$  cho thấy có sự tương quan chặt chẽ giữa nồng độ physcion và diện tích pic. Từ đường hồi quy tuyến tính tính được giới hạn phát hiện của phương pháp 0,00004 mg/mL (0,008%), giới hạn định lượng của phương pháp 0,0001 mg/mL (0,02%) và khoảng tuyến tính của phương pháp trong nghiên cứu này là 0,0001–0,75 mg/mL.

**Độ chụm** (bao gồm độ lặp lại, độ tái lập trung gian): Xác định độ tinh khiết sắc ký của physcion dung dịch

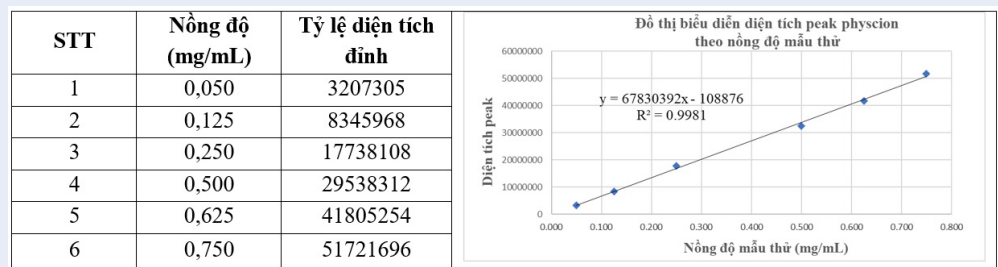
thử, loại trừ pic của dung môi pha mẫu và các pic có diện tích nhỏ hơn giới hạn định lượng của phương pháp, kết quả được trình bày ở Bảng 2. Độ lệch chuẩn tương đối RSD (%) độ tinh khiết sắc ký của nguyên liệu thiết lập chuẩn physcion ứng với mỗi phòng thí nghiệm ( $n = 6$ ) có giá trị  $0,01\% < 2,0\%$  và của cả hai phòng thí nghiệm ( $n = 12$ ) là  $0,07\% < 3,0\%$ .

**Độ đúng:** Kết quả thử độ đúng 99,7% đạt yêu cầu quy định 98,0% - 102,0% (Bảng 3).

Thông qua việc đánh giá các tiêu chí thẩm định nêu trên cho thấy phương pháp nêu trên đạt yêu cầu để áp dụng phân tích độ tinh khiết sắc ký của physcion.



**Hình 3:** Kết quả thử độ đặc hiệu của phương pháp. 1: Mẫu trắng 2: Mẫu thử 3: Mẫu thử và H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 4: Mẫu thử và HCl 5: Mẫu thử và NaOH.



**Hình 4:** Kết quả thử độ tuyến tính của phương pháp

**Bảng 2:** Kết quả xác định độ lặp lại và độ tái lập trung gian

STT	Ngày 1		Ngày 2	
	Độ tinh khiết sắc ký (%)	Tổng tạp (%)	Độ tinh khiết sắc ký (%)	Tổng tạp (%)
1	99,46	0,54	99,46	0,54
2	99,44	0,56	99,44	0,56
3	99,45	0,55	99,45	0,55
4	99,44	0,56	99,44	0,56
5	99,43	0,57	99,42	0,58
6	99,43	0,57	99,43	0,57
TB	99,44	0,56	99,43	0,57
RSD %	0,01		0,01	
Trung bình (n = 12) 99,43%; RSD (n = 12) 0,07%				

**Bảng 3: Kết quả xác định độ đúng**

STT	Mức thực hiện độ đúng so với nồng độ thử tinh khiết	Nồng độ đo ở các mức (mg/mL)	Nồng độ tính từ phương trình hồi quy (mg/mL)	Tỷ lệ phục hồi (%)
1	10%	0,0500	0,0494	98,8
2		0,0500	0,0493	98,6
3		0,0501	0,0491	98,0
4	100%	0,5000	0,4983	99,7
5		0,5015	0,4973	99,2
6		0,5012	0,4984	99,4
7	150%	0,7500	0,7650	102,0
8		0,7523	0,7546	100,3
9		0,7518	0,7614	100,3
Tỷ lệ phục hồi (%):				99,7
RSD (%):				1,4

**Bảng 4: Kết quả đánh giá physcion**

STT	Chỉ tiêu	Phương pháp	Mức chất lượng	Kết quả
1	Tính chất	Cảm quan	Bột màu vàng cam	Bột màu vàng cam
2	Định tính	Phổ IR	Phù hợp với phổ IR physcion với cực đại hấp thụ tại 1674 (nối C=O); 1612 (nối C=C vòng)	Phù hợp
		Phổ UV-Vis	Có các cực đại hấp thụ tại bước sóng 463, 286, 265, 254, 223 nm	Phù hợp
		Phổ NMR	Phù hợp với phổ <sup>1</sup> H và <sup>13</sup> C NMR physcion	Phù hợp
3	Mất khối lượng do làm khô	TGA	Không quá 0,5%	0,08%
4	Tro sulfate	Phương pháp nung	Không quá 0,1%	0,05%
5	Độ tinh khiết sắc ký	Phương pháp HPLC	Không ít hơn 99,0%	99,43%

**Tiêu chuẩn chất lượng và kết quả kiểm tra chất lượng sản phẩm**

Tiến hành thử nghiệm theo các điều kiện được nêu trong phần phương pháp nghiên cứu thu được kết quả theo Bảng 4. Kết quả cho thấy hai chất này có độ tinh khiết >95%, đủ điều kiện để thiết lập chất đối chiếu.

**Thiết lập chất đối chiếu**

**Đóng lọ và kiểm tra độ đồng nhất**

Đóng lọ theo điều kiện được nêu trong phần phương pháp nghiên cứu thu được 95 lọ physcion, mỗi lọ 5 mg. Tiến hành lấy ra 10 lọ ngẫu nhiên cho mỗi loại

để đánh giá độ đồng nhất. Dữ liệu phân tích xác định độ đồng nhất lọ được trình bày trong Bảng 5. Dựa vào kết quả phân tích ANOVA cho thấy các lọ đóng gói có hàm lượng không khác biệt về mặt thống kê ( $F < F_{crit}$ ) với khoảng tin cậy 95% chứng tỏ các lọ đồng nhất do đó tiếp tục gửi các phòng thí nghiệm để đánh giá liên phòng.

**Đánh giá liên phòng thí nghiệm và xác nhận giá trị ấn định**

Kết quả phân tích của các phòng thí nghiệm được trình bày trong Bảng 6. Tiến hành phân tích ANOVA

**Bảng 5: Kết quả đánh giá đồng nhất lô physcion**

STT	Mã lọ	Độ tinh khiết (%)
1	90	99,30; 99,43
2	41	99,30; 99,45
3	75	99,35; 98,70
4	26	99,20; 99,07
5	27	98,20; 99,45
6	11	99,41; 98,66
7	31	99,03; 99,00
8	16	97,99; 99,45
9	78	99,44; 98,64
10	39	99,43; 98,61
ANOVA 1 yếu tố		F= 0,14; F <sub>crit</sub> = 4,41; P= 95%

cho thấy kết quả phân tích của các phòng thí nghiệm khác biệt không có ý nghĩa thống kê với khoảng tin cậy 95%, quy trình phân tích có độ lặp lại cao, độ tinh khiết chất phân tích không phụ thuộc vào phòng thí nghiệm tham gia đánh giá. Tiếp tục xử lý dữ liệu thu được bằng phân tích Robustness theo hướng dẫn ISO 13528 thu được giá trị ấn định tinh khiết sắc ký của physcion là 98,8%.

**Bảng 6: Kết quả đánh giá liên phòng thí nghiệm physcion**

STT	Độ tinh khiết sắc ký (%)		
	PTN1	PTN2	PTN3
1	99,44	98,89	98,77
2	99,20	98,85	98,78
3	98,56	98,69	98,78
4	98,61	98,87	98,80
5	98,95	98,96	98,83
6	98,88	98,87	98,80
TB= 98,8%; s*=0,002			

Hàm lượng chất đối chiếu tính trên nguyên trạng = Độ tinh khiết sắc ký × (100 - % tạp bay hơi - % tạp vô cơ). Từ đó suy ra được giá trị ấn định hàm lượng trên chế phẩm nguyên trạng của physcion là 98,7%. Độ không đảm bảo đo U (k=2) = 0,1% (P=95%).

### KẾT LUẬN

Từ cao ethyl acetate của rễ hà thủ ô đỏ, hợp chất physcion đã được phân lập và xác định cấu trúc hóa

học. Quy trình xây dựng và thẩm định phương pháp xác định độ tinh khiết của physcion, xây dựng tiêu chuẩn để xác định chất lượng nguyên liệu đã được thực hiện, đồng thời áp dụng phương pháp đã xây dựng vào việc đánh giá chất lượng các nguyên liệu liên quan. Bài báo trình bày việc đã thiết lập thành công hợp chất đối chiếu hóa học physcion nhằm phục vụ việc kiểm nghiệm chất lượng các sản phẩm có chứa rễ hà thủ ô đỏ được lưu hành ở Việt Nam.

### DANH MỤC TỪ VIẾT TẮT

- d: Mũi đôi - doublet
- HPLC: Sắc ký lỏng hiệu năng cao - High performance liquid chromatography
- IP: Dược điển Quốc tế - International pharmacopoeia
- IR: Quang phổ hồng ngoại - Infrared
- LOD: Giới hạn phát hiện - Limit of detection
- LOQ: Giới hạn định lượng - Limit of quantity
- NMR: Cộng hưởng từ hạt nhân - Nuclear magnetic resonance
- PDA: Đầu dò dãy diode quang - Photodiode array detection
- RSD: Độ lệch chuẩn - Relative standard deviation
- s: Mũi đơn - singlet
- UV: Quang phổ tử ngoại - Ultraviolet
- TGA: Phân tích nhiệt trọng lượng - Thermogravimetric analysis

### XUNG ĐỘT LỢI ÍCH

Nhóm tác giả cam đoan không có xung đột lợi ích.

### ĐÓNG GÓP CỦA CÁC TÁC GIẢ

Tác giả Trịnh Hoàng Dương tiến hành thiết kế thí nghiệm, thu thập số liệu, xử lý kết quả và viết bản thảo. Các tác giả Trương Tấn Sang, Hứa Gia Chi Bảo phân lập hợp chất, thực hiện thí nghiệm. Tác giả Trần Thu Phương đưa ý tưởng, lên kế hoạch nghiên cứu và hoàn chỉnh nội dung bản thảo.

### TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Đỗ TL. Những cây thuốc và vị thuốc Việt Nam, NXB Y học. 2004; 833-835.
2. Phạm HH. Cây cỏ Việt Nam, Quyển 1, NXB Trẻ. 1999; 744.
3. Nguyen THL, Ta TT, Phan VT, Phuong TT. Quality evaluation of Fallopia multiflora in Vietnam based on HPLC-FLD and chemometrics. Nat. Prod. Chem & Res. 2018; 6(6):1-7; Available from: <https://www.iomcworld.com/open-access/quality-evaluation-of-fallopia-multiflora-in-vietnam-based-on-hplc-fld-and-chemometrics-2329-6836-1000346.pdf>.
4. Hội đồng Dược điển Việt Nam. Dược điển Việt Nam V, NXB Y học. 2017; 1180-1181.
5. International conference on harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use, ICH harmonised tripartite guideline, validation of analytical procedures: text and methodology q2(r1). 2013.
6. Tiêu chuẩn Việt Nam. Yêu cầu chung về năng lực của nhà sản xuất mẫu chuẩn. 2017.

7. International Organization for Standardization. ISO13528: Statistical methods for use in proficiency testing by interlaboratory comparison. 2015;
8. World Health Organization. General guidelines for the establishment, maintenance and distribution of chemical reference substance-WHO technical series 943. 2006;
9. World Health Organization. The international pharmacopoeia. 2017;
10. Ulfa SM, Shirako S, Sato M, Dwijayanti DR, Okuyama T, Horie S, Watanabe J, Ikeya Y, Nishizawa M. Anti-inflammatory effects of anthraquinones of Polygonum multiflorum roots. *Bioact. Compd. Health Dis.* 2022; 5(6):136-148; Available from: <https://doi.org/10.31989/bchd.v5i6.948>.



# Isolation and establishment of Physcion as a chemical reference substance from *Radix Polygonum multiflorum* thunb.

Trinh Hoang Duong<sup>1</sup>, Truong Tan Sang<sup>2</sup>, Hua Gia Chi Bao<sup>2</sup>, Tran Thu Phuong<sup>2,\*</sup>



Use your smartphone to scan this QR code and download this article

## ABSTRACT

*Polygonum multiflorum* (Family: Polygonaceae) is a precious medicinal species listed in the IUCN Red Book of Vietnam and needed to be protected. *Radix Polygonum multiflorum* has been widely used in traditional Vietnamese and Chinese medicines and it is consequently utilised in a great demand. However, to guarantee the quality of medicinal herbs in the market, they are required to have the pharmacopoeial testing and control in general. One of methods used to achieve accurately analytical results is the use of chemical reference substances. Chemical reference substances isolated from natural sources are important materials that are used to verify the quality and trace analysis of medicinal products containing medicinal plants. In Vietnam, there have not been any reference standard compounds for the quality control of *Polygonum multiflorum*. This paper reported the isolation of physcion from *Radix Polygonum multiflorum* Thunb. which was subsequently established as a reference substance. The isolation was performed using column chromatography on silica gel with different eluents. The compound purity and quality determination were validated by infrared spectroscopy (IR), ultraviolet (UV), nuclear magnetic resonance (NMR) and high-performance liquid chromatography (HPLC). In addition, the compound was evaluated for the homogeneity and assigned value to establish as the reference substance based on the standards of TCVN ISO 17034:2017, Appendix 3 of World Health Organization (WHO technical series 943:2006) and statistical methods for use in proficiency testing by inter-laboratory comparison ISO 13528:2015.

**Key words:** Anthraquinone, chemical reference substance, physcion, *Polygonum multiflorum* Thunb

<sup>1</sup>Institute of Drug Quality Control Ho Chi Minh City, Vietnam

<sup>2</sup>Faculty of Chemistry, University of Science, VNU-HCM, Vietnam

## Correspondence

**Tran Thu Phuong**, Faculty of Chemistry, University of Science, VNU-HCM, Vietnam

Email: ttpuong@hcmus.edu.vn

## History

- Received: 18-9-2022
- Accepted: 28-4-2023
- Published: 24-5-2023

## DOI :

<https://doi.org/10.32508/stdjns.v7i2.1235>



## Copyright

© VNUHCM Press. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International license.



**Cite this article :** Duong T H, Sang T T, Bao H G C, Phuong T T. Isolation and establishment of Physcion as a chemical reference substance from *Radix Polygonum multiflorum* thunb.. *Sci. Tech. Dev. J. - Nat. Sci.*; 2023, 7(2):2599-2607.