

Chemical Methods for Dietary Supplements and Botanicals. 13. ICH Harmonised Tripartite Guideline (2005), *Validation of analytical procedures: text and methodology*, Q2 (R1), 1 (20), 05. 14. Liang Y., Liu Z., Gao W., Man S. (2012), Determination of nine steroidal saponins in *Paris polyphylla* from different areas of Guizhou province by HPLC, *China Journal of Chinese Materia Medica*, 37(15), 2309-2312. 15. Huang Y., Cui L. J., Liu W. N., Wang Q. (2006), Quantitative analysis of steroidal saponins in Chinese material medica *Rhizoma Paridis* by HPLC-ELSD, *China Journal of Chinese Materia Medica*, 31(15), 1230-1233. 16. Yang Y., Zhang J., Jin H., Zhang J., Wang Y. (2016), Quantitative analysis in combination with fingerprint technology and chemometric analysis applied for evaluating six species of wild *Paris* using UHPLC-UV-MS, *Journal of Analytical Methods in Chemistry*. 17. Huang Y. Y., Liu D. H., Peng H. S., Hao Q. X., Chen M. L., Zhang A. Z., Chen M., Kang L. P., Huang L. Q. (2017), Determination of eight steroidal saponins in 15 kinds of genus *Paris*, *China Journal of Chinese Materia Medica*, 42(18), 3443-3451. 18. Đỗ Thị Hà (2019), Đề tài KHCN cấp Bộ Y tế "Nghiên cứu cây bầy lá một hoa (*Paris polyphylla* var. *chinensis* Smith.) theo hướng hỗ trợ điều trị ung thư vú".

Tạp chí Dược liệu, tập 28, số 1/2023 (Trang 15 - 20)

PHÂN LẬP VÀ THIẾT LẬP CHẤT ĐỐI CHIẾU ORCINOL GLUCOSID TỪ THÂN RỄ SÂM CAU

**Nguyễn Thị Ánh Nguyệt¹, Nguyễn Huỳnh Thanh Tuyền¹, Lê Văn Huân²,
Lê Thị Hương Lan¹, Phan Văn Hồ Nam¹, Trần Thị Vân Anh^{1*}**

¹Khoa Dược - Đại học Y Dược thành phố Hồ Chí Minh;

²Khoa Dược - Trường Đại học Bình Dương

*Email: ttvananh@ump.edu.vn

(Nhận bài ngày 09 tháng 01 năm 2023)

Tóm tắt

Thân rễ sâm cau (*Rhizoma curculiginis*) là vị thuốc sử dụng phổ biến trong y học cổ truyền điều trị chứng liệt dương, yếu sinh lý, đau nhức xương khớp... Nghiên cứu sâm cau ở Việt Nam cho thấy orcinol glucosid (OG) là 1 trong những thành phần hóa học chính. Nghiên cứu này được thực hiện với mục tiêu phân lập và thiết lập chất đối chiếu (CDC) orcinol glucosid (OG) cần thiết cho việc tiêu chuẩn hóa dược liệu sâm cau (*Rhizoma curculiginis*). Hợp chất OG (1,1 g) đã được phân lập từ thân rễ sâm cau bằng các phương pháp sắc kí. Cấu trúc của OG được xác định bằng phổ UV, IR, MS và NMR. Kết quả thiết lập CDC theo ISO Guide 35 và ISO Guide 13528 cho thấy OG đạt hàm lượng với giá trị ấn định là 98,57% (n = 18; s = 0,01; U = 0,02), đủ điều kiện thiết lập chất chuẩn.

Từ khoá: Chuẩn đối chiếu, Sâm cau, Orcinol glucosid.

Summary

Isolation and Establishment of the Reference Standard for Orcinol Glucoside from *Rhizoma curculiginis*

Rhizoma curculiginis is used popularly in traditional medicine for improving physiological function of men and treatment of rheumatism... *Rhizoma curculiginis* in Vietnam has orcinol glucoside as the main constituent. This study was carried out with the aim of isolation and establishment orcinol glucoside (OG) as the reference standard for the standardization of *Rhizoma curculiginis*. Orcinol glucoside (1,1 g) was isolated from *Rhizoma curculiginis* using column chromatographic methods. The chemical structure of OG was elucidated using UV, IR, MS, and NMR spectroscopic techniques. The result of establishment for the reference standard following by ISO Guide 35 and ISO Guide 13528 showed that the content of OG was 98.57% (n = 18; s = 0.01; U = 0.02), meet the requirements of a reference standard.

Keywords: *Rhizoma curculiginis*, Reference standard, Orcinol glucoside.

1. Đặt vấn đề

Sâm cau (*Curculigo orchioides* Gaertn., họ Hypoxidaceae) là một cây thuốc được sử dụng phổ biến trong các bài thuốc cổ truyền của Việt Nam, Trung Quốc, Ấn Độ. Thân rễ sâm cau đã được sử dụng rộng rãi như một loại thuốc bổ để điều trị liệt dương, hen suyễn, tinh trùng lạnh, đau lưng, mỏi gối, và tê chân tay [1]. Các nghiên cứu cho thấy thân rễ sâm cau có các thành phần hóa học gồm saponin cycloartan [2], phenolic glycosid [3],[4] và chlorophenyl glucosid [5],[6].

Nghiên cứu về thành phần hóa học sâm cau ở Việt Nam cho thấy orcinol glucosid là một thành phần hóa học chính bên cạnh các hợp chất curculigosid [7]. Orcinol glucosid (OG) có các tác dụng sinh học đáng chú ý như chống trầm cảm, chống oxy hóa [8] và cải thiện chứng loãng xương ở người già [9]. Một số nghiên cứu cũng đã sử dụng hợp chất này làm chất đánh dấu (marker) để kiểm

tra chất lượng hoặc đánh giá dược tính của dược liệu và chế phẩm từ dược liệu [7],[10],[11]. Vì vậy, mục đích của nghiên cứu là thiết lập chất đối chiếu OG phù hợp yêu cầu của chất chuẩn quốc gia để bổ sung danh mục ngân hàng chất chuẩn tại Việt Nam nhằm phục vụ cho việc xây dựng tiêu chuẩn dược liệu cũng như các chế phẩm từ sâm cau.

2. Nguyên liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Nguyên liệu

Thân rễ sâm cau tươi (35 kg) được thu mua tại Lào Cai vào tháng 3 năm 2021. Mẫu được định danh thuộc loài *Curculigo orchioides* bằng cách phân tích trình tự gene trnH-psbA và rps16 so sánh với dữ liệu trên ngân hàng gen thế giới (NCBI) có mức độ tương đồng 100%. Thân rễ sâm cau tươi được rửa sạch, cắt nhỏ, sấy ở nhiệt độ 55°C, sau đó đem xay thô, thu bột (11 kg) (độ ẩm 9,7%) làm nguyên liệu chiết xuất, phân lập orcinol glucosid (OG).

2.2. Các dung môi, hóa chất, thiết bị

Hóa chất dùng cho chiết xuất, phân lập: Ethyl acetat (EA) (Fisher, PA grade, Mỹ), dicloromethan (DCM) (Fisher, PA grade, Mỹ), cloroform (CHCl_3) (Fisher, PA grade, Mỹ), methanol (MeOH) (Fisher, PA grade, Mỹ) và cồn 96% (Việt Nam), thuốc thử vanillin sulfuric (VS), Bùn mỏng *silica gel* F₂₅₄ (Merck, Đức), *silica gel* (40-63 μm) (Merck, Đức).

Hóa chất dùng cho thiết lập chất đối chiếu: Methanol (Scharlau, HPLC grade, Tây Ban Nha), acid trifluoroacetic (Scharlau, 98-100%, Tây Ban Nha), acetonitril (Merck, HPLC grade, Đức) và acid formic (J.T.Baker, 98-100%, Mỹ).

Thiết bị: Bình chiết ngâm kiệt (30 lít, Việt Nam). Phổ cộng hưởng từ hạt nhân (NMR) được đo bằng máy Bruker Avance Neo 600 MHz-NMR Spectrometer (Đức), Viện Hóa học, Hà Nội. Phổ khối lượng (ESI-MS) được đo trên máy Acquity Arc QDa, đầu dò MS (Water, Mỹ). Hệ thống Acquity UPLC-PDA (Waters, Mỹ), cột Gemini C₁₈ (250 $\times$ 4,6 mm; 5 μm). Máy quét nhiệt vi sai (DSC) 204F1 Phoenix (Netzsch, Mỹ). Máy quang phổ hồng ngoại FTIR IRAffinity-1S (Shimadzu, Nhật).

2.3. Phương pháp nghiên cứu

2.3.1. Chiết xuất, phân lập và xác định cấu trúc hợp chất OG:

Chiết xuất: Bột thân rễ sâm cau (11 kg) được chiết ngâm kiệt với ethanol 96%, thu 100 lít dịch chiết, cô giảm áp, thu được cao cồn toàn phần (1,05 kg). Cao cồn được thêm nước và lắc phân bố lần lượt với các dung môi có độ phân cực tăng dần gồm ether dầu hỏa (PE, 6 lít), dicloromethan (DCM, 6 lít) và ethyl acetat (EA, 17 lít) thu được các cao tương ứng là cao PE (63,0 g), cao DCM (28,9 g), cao EA gồm EA1 (50,9 g) và EA2 (41,5 g). Trong đó, cao EA1 là cao thu được từ lần lắc phân bố đầu tiên với 7,0 lít EA, và cao EA2 thu được từ các lần lắc sau của dịch chiết với 10 lít EA. Cao EA2 được chọn làm nguyên liệu phân lập OG vì từ kết quả phân tích trên SKLM cho thấy cao EA2 giàu hợp chất OG nhưng ít tạp.

Phân lập: Cao EA2 (41,5 g) được phân tách trên sắc ký cột (525 g *silica gel* 40-63 μm ; cột 46 $\times$ 7 cm; triển khai bằng CHCl_3 -MeOH với nồng độ MeOH tăng dần từ 0 - 40%, thể tích hứng 100 mL/lọ) thu được 20 phân đoạn (EA2.1 đến EA2.20); trong đó phân đoạn EA2.15 có kết tủa trắng. Phân tủa được hòa tan trong lượng tối thiểu methanol để bay hơi dung môi từ từ, lọc rửa tủa lần 2 thu được 1,1 g chất 1.

Kiểm tra tinh khiết bằng HPLC-PDA: Hợp chất phân lập (1,0 mg/ml, pha trong methanol) được kiểm tra bằng HPLC-PDA, cột Gemini C₁₈ (250 $\times$ 4,6 mm; 5 μm), nhiệt độ cột 25°C, lượng tiêm mẫu 10 μL , tốc độ dòng 1 mL/phút, pha động là acetonitril - nước với tỉ lệ acetonitril tăng dần

từ 0% đến 100%, thời gian phân tích là 40 phút, hàm lượng (%) của chất phân tích được đo ở chế độ maxplot và được tính dựa trên phần trăm của tổng diện tích pic. Diện tích của pic chính phải trên 95% so với tổng diện tích các pic trên SKĐ. Bỏ qua pic của pha động và pic có S/N < 2/1.

2.3.2. Thiết lập chất đối chiếu orcinol glucosid (OG) phân lập:

Định tính, xác định cấu trúc và thử tinh khiết: OG được kiểm tra tinh khiết bằng SKLM (với 3 hệ dung môi khác nhau), xác định độ âm bằng phép đo nhiệt trọng lượng (TGA), định tính và xác định cấu trúc bằng phổ UV, IR, MS và NMR.

Xác định độ tinh khiết của OG bằng HPLC-PDA: Khảo sát điều kiện sắc kí bao gồm pha động, thời gian phân tích, bước sóng phát hiện, nhiệt độ cột. Quy trình định lượng OG bằng HPLC-PDA được đánh giá theo hướng dẫn của ICH [12] gồm khảo sát về tính tương thích hệ thống, tính đặc hiệu, tính tuyến tính, độ lặp lại và độ đúng. Độ tinh khiết của OG được tính dựa theo phần trăm tổng diện tích pic.

Chuẩn bị mẫu để thử tính đặc hiệu: Dung dịch thử có nồng độ hoạt chất 1,0 mg/mL trong methanol; Dung dịch mẫu trắng: Methanol; Dung dịch phân hủy trong acid: Thêm 1 mL acid hydroclorid 37% vào 10 mL dung dịch thử, trộn đều, để yên 60 phút, trung hòa; Dung dịch phân hủy trong kiềm: Thêm 1 mL natri hydroxyd 40% vào 10 mL dung dịch thử, trộn đều, để yên 60 phút, trung hòa. Dung dịch phân hủy trong hydroperoxid: Thêm 1 mL hydroperoxid 30% vào 10 mL dung dịch thử, trộn đều, để yên 60 phút. Mẫu phân hủy trong ánh sáng: 10 mg mẫu dưới ánh sáng mặt trời trong 24 giờ, pha thành dung dịch 1,0 mg/ml. Mẫu phân hủy trong nhiệt độ: 10 mg mẫu trong tủ sấy 80°C trong 24 giờ; pha thành dung dịch 1,0 mg/ml. Các mẫu được lọc qua màng lọc 0,22 μm trước khi tiêm.

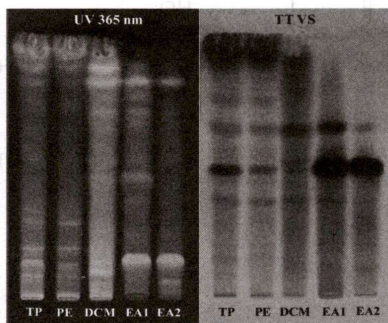
Đóng gói và đánh giá độ đồng nhất lọ trong quá trình đóng gói: OG (1,1 g) được đóng gói tại Viện Kiểm nghiệm Thuốc tp. HCM trong điều kiện tiêu chuẩn (100 lọ thủy tinh màu nâu, mỗi ống 10 mg, có lớp đệm teflon và hàn kín trong Glove-Box chứa khí nitơ 99,99%; nhiệt độ 25°C, độ ẩm tương đối 30%). Đánh giá độ đồng nhất lô theo ISO Guide 35 [13] với hàm lượng (%) của OG có trong 11 lọ ($\sqrt{N} + 1$) được lấy ngẫu nhiên, xác định theo quy trình đã xây dựng.

Xác định giá trị ấn định, độ không đảm bảo đo theo ISO 13528 [14] và giá trị công bố trên phiếu kiểm nghiệm dựa trên kết quả định lượng tại 3 phòng thí nghiệm đạt chuẩn GLP thuộc Viện Kiểm nghiệm thuốc tp. HCM gồm: Khoa thiết lập chất chuẩn và chất đối chiếu (1); Khoa nghiên cứu phát triển (2); Khoa kiểm nghiệm mỹ phẩm (3). Giá trị ấn định ($n=18$) được phân tích sự khác biệt trung bình bằng one-way ANOVA, độ tin cậy 95%.

3. Kết quả và bàn luận

3.1. Chiết xuất, phân lập OG

Từ nguyên liệu bột rễ sâm cau sau khi chiết ngâm kiệt thu được cao còn toàn phần. Cao còn được phân bố lỏng lỏng thu các phân đoạn cao PE, DCM, EA1 và EA2 (Hình 1). Kết quả kiểm tra trên SKLM cho thấy cao EA2 giàu chất cần



Pha động: EtOAc-MeOH-H₂O (100:17:13)

Hình 1. SKĐ các phân đoạn cao PE, DCM, EA1 và EA2



Pha động: CHCl₃-MeOH (8:2)

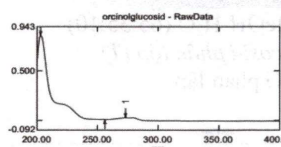
Hình 2. SKĐ của 20 phân đoạn phân lập từ cao EA2

3.2. Thiết lập chất đối chiếu (CDC) orcinol glucosid (OG)

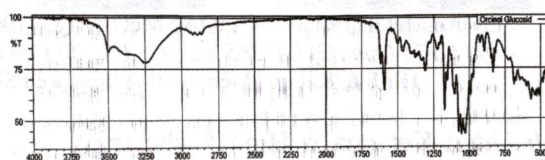
3.2.1. Định tính, xác định cấu trúc và thử tinh khiết:

Chất 1: Bột vô định hình màu trắng, tan tốt trong MeOH. Phổ UV ($\lambda_{\max}$, nm) (10 μ g/ml,

MeOH): 203,0 nm, 220,0 nm và 273,0 nm (Hình 3). Phổ khối ESI-MS (+) m/z : 309,0945 [$M+Na$]⁺, chất 1 có khối lượng phân tử là 286,28 và CTPT dự đoán là C₁₃H₁₈O₇. Phổ IR (KBr, $\nu_{\max}$, cm⁻¹): có các đỉnh 3300 (OH), 3000 (C-H, sp²), 2800 (C-H alkan), 1152 - 1000 (C-O) (Hình 4).



Hình 3. Phổ UV của OG



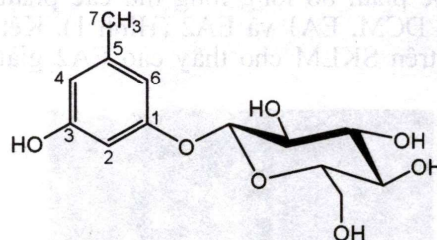
Hình 4. Phổ IR của OG

Phổ ¹H-NMR của hợp chất 1 xuất hiện 3 tín hiệu proton nhân thơm tại δ_H 6,31 (1H, *brs*, H-4); 6,39 (1H, *t*, $J = 2,2$ Hz, H-2) và 6,44 (1H, *brs*, H-6); 1 tín hiệu của nhóm methyl tại δ_H 2,23 (3H, *s*, H-7); 1 tín hiệu của proton anomer đặc trưng của đường *O*- β -glucose [δ_H 4,86 (1H, *d*, $J = 7,5$ Hz, H-1')] cùng 4 tín hiệu proton của đường (4H, δ_H 3,45-3,41, *m*, H-2', 3', 4', 5') và tín hiệu của nhóm -CH₂OH-tại δ_H 3,91 (1H, *dd*, $J = 12,0$; 2,1 Hz, Hb-6') và δ_H 3,73 (1H, *dd*, $J = 12,0$; 1,5 Hz, Ha-6') của đường glucose. Phổ ¹³C-NMR của hợp chất 1 có 13 tín hiệu carbon gồm 2 carbon olefin gần oxi tại δ_C [160,1 (C-1); 159,2 (C-3)] và 1 carbon nhân thơm gần nhóm methyl tại δ_C [141,2 (C-5)]; 3 carbon -CH olefin tại δ_C [102,2 (C-2); 111,2 (C-4); 109,7 (C-6)]; 1 tín hiệu của nhóm -CH₃ tại δ_C 21,6 (C-7)]; 6 tín hiệu của đường pyranose gồm [4 tín hiệu của -CH-O tại δ_C [78,09 - 71,38, C-2', 3', 4', 5']; 1 carbon anomer tại δ_C 102,21 (C-1) và 1 carbon -CH₂-O tại δ_C 62,53 (C-6). Các tín hiệu ¹³C-NMR và ¹H-NMR cho thấy

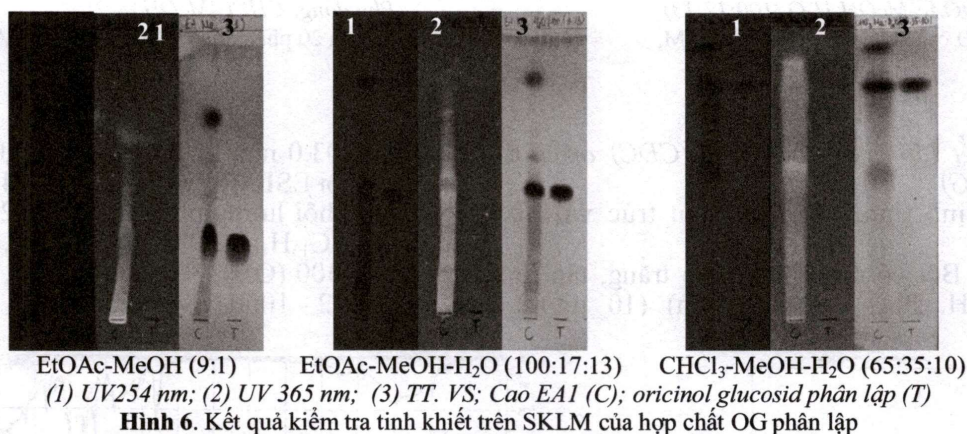
hợp chất 1 được dự đoán là 1 phenolic glycosid. Phân tích dữ liệu phổ 2 chiều HMBC cho thấy nhóm -CH₃ gắn trực tiếp vào vòng thơm tại vị trí C-5 qua tương tác của proton δ_H 2,23 với C-5 (δ_C 141,26), C-4 (δ_C 111,22) và C-6 (δ_C 109,75). Nhóm thế -OH được xác định gắn vào vị trí C-3 thể hiện qua hằng số ghép của proton của H-2 tại δ_H 6,39 (1H, *t*, $J = 2,2$, H-2) và có tương tác HMBC của proton H-2 (δ_H 6,39) với C-1 (δ_C 160,1) và C-3 (δ_C 159,26). Phần đường liên kết với OH tại C-1 qua tương tác HMBC của proton anomer tại δ_H 4,86 (H-1') với C-1 (δ_C 160,1). Biện giải phổ NMR xác định hợp chất 1 là orcinol-1-*O*- β -D-glucosid hay orcinol glycosid. Kết hợp so sánh dữ liệu phổ thực nghiệm với dữ liệu phổ ¹H và ¹³C-NMR của hợp chất đã công bố [15] (Bảng 1), do khác dung môi đo nên các giá trị phổ ¹³C sai lệch khoảng 1-2 ppm, tuy nhiên các giá trị phổ đều tương thích giúp khẳng định cấu trúc của chất 1 chính là orcinol β -D-glucosid. (Hình 5).

Bảng 1. Dữ liệu phổ ^1H và ^{13}C -NMR (MeOD, 600 Hz) của chất 1

Vị trí	Chất 1 (MeOD, 600 MHz)		Orcinol glucosid [15] (CDCl ₃ , 400 MHz)	
	δ_{C}	δ_{H} (J, Hz)	δ_{C}	δ_{H} (J, Hz)
1	160,1		158,7	
2	102,2	6,39 <i>t</i> (2,2)	100,8	6,31 <i>s</i>
3	159,2		157,8	
4	111,2	6,31 <i>brs</i>	108,4	6,27 <i>s</i>
5	141,2		139,9	
6	109,7	6,44 <i>brs</i>	109,8	6,16
7	21,6	2,23 [3H] <i>s</i>	20,3	2,11 [3H] <i>s</i>
1'	102,2	4,86 <i>d</i> (7,5)	100,8	4,74 <i>d</i> (7,6)
2'	78,1	3,45 <i>m</i>	76,7	3,20-3,36 <i>m</i>
3'	74,9	3,44 <i>m</i>	73,5	3,20-3,36 <i>m</i>
4'	71,4	3,41 <i>m</i>	70,0	3,20-3,36 <i>m</i>
5'	78,1	3,45 <i>m</i>	76,6	3,20-3,36 <i>m</i>
6'	62,5	3,91 <i>dd</i> (12,0; 2,1) 3,73 <i>dd</i> (12,1; 5,1)	61,1	3,61 <i>dd</i> (12,1; 4,8) 3,79 <i>dd</i> (12,1; 1,5)



Hình 5. Công thức cấu tạo của chất 1 (OG)

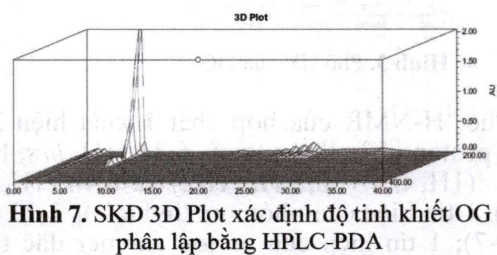


Hình 6. Kết quả kiểm tra tinh khiết trên SKLM của hợp chất OG phân lập

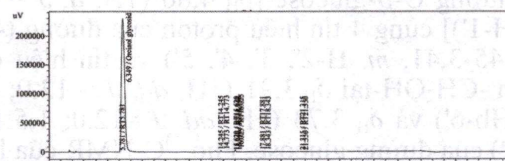
Thử tinh khiết: Kết quả ở Hình 6 cho thấy, hợp chất OG phân lập cho một vết duy nhất trên SKLM với 3 hệ dung môi có độ phân cực khác nhau ở điều kiện phát hiện gồm UV365, 254 nm và thuốc thử VS. Độ ẩm của OG phân lập được xác định là 2,25% (phương pháp TGA).

3.2.2. Xác định độ tinh khiết của hợp chất OG phân lập bằng HPLC-PDA:

Điều kiện phân tích trên HPLC-PDA: OG (100 $\mu\text{g/ml}$) pha trong methanol, được phân tích trên cột Gemini C₁₈ (250 $\times$ 4,6 mm; 5 μm), tốc độ dòng 1 mL/phút; thể tích tiêm mẫu 10 μl ; nhiệt độ cột 45°C. Thăm dò pha động là chương trình dung môi H₂O-ACN (tỷ lệ từ 99:1 đến 1:99 trong 60 phút). Kết quả khảo sát cho thấy pic OG xuất hiện ở phút thứ 9, do đó sử dụng tỷ lệ dung môi H₂O-ACN (92:8) chạy chế độ đẳng dòng, sau 10 phút tăng tỷ lệ ACN đến 90% trong 20 phút để rửa giải toàn bộ tạp (nếu có) trong mẫu. Bước sóng phát hiện được chọn là 204 nm do độ hấp thụ của OG và các tạp có mẫu là cao nhất dựa theo sắc ký đồ 3D (Hình 7).



Hình 7. SKĐ 3D Plot xác định độ tinh khiết OG phân lập bằng HPLC-PDA



Hình 8. SKĐ xác định hàm lượng OG phân lập bằng HPLC-PDA ở bước sóng 204 nm

Như vậy điều kiện phân tích OG được xác định như sau: cột Gemini C₁₈ (250 $\times$ 4,6 mm; 5 μm), tốc độ dòng 1 mL/phút; thể tích tiêm mẫu 10 μl ; nhiệt độ cột 45°C; pha động gồm nước (A) và acetonitril (B) với chương trình gồm: 8% B (10 phút), 90% B (20 phút), 8% B (1 phút), 8% B (9 phút); bước sóng phát hiện 204 nm.

Kết quả độ tinh khiết của OG phân lập được xác định là 98,36% (Hình 8).

Đánh giá quy trình xác định độ tinh khiết OG

theo hướng dẫn của ICH: Kết quả trình bày ở Bảng 2 cho thấy qui trình định lượng orcinol glucosid đạt theo các yêu cầu theo hướng dẫn của ICH.

Bảng 2. Kết quả thẩm định qui trình định lượng orcinol glucosid

Chỉ tiêu thẩm định	Yêu cầu	Kết quả
Độ đặc hiệu	Mẫu trắng, mẫu phân hủy trong acid, kiềm và peroxid, mẫu chịu ảnh hưởng của ánh sáng và nhiệt độ, không ảnh hưởng đến kết quả phân tích mẫu thử	Đạt yêu cầu
Độ tương tích hệ thống	Hệ số bất đối xứng (A_s) đạt $0,8 \leq A_s \leq 1,5$	$A_s = 1,27$
	Diện tích pic: $RSD \leq 2\%$ ($n = 6$)	$RSD = 0,71\%$
	Thời gian lưu: $RSD \leq 2\%$ ($n = 6$)	$RSD = 0,09\%$
Độ tuyến tính	Xây dựng đường tuyến tính từ 6 dung dịch có nồng độ hoạt chất 0,6003-1,4007 mg/mL Yêu cầu: $r \geq 0,998$	$\hat{y} = 44831794,1x$ $R = 0,9999$
Độ lặp lại	Độ lặp lại $RSD (n = 6) \leq 2\%$	$R = 0,12\%$
	Độ chính xác trung gian $RSD (n = 12) \leq 2\%$	$R = 0,2\%$
Độ đúng	Tiến hành sắc ký 9 dung dịch thử độ đúng có nồng độ chất 1 thêm vào tương ứng 60%; 100%; 140% so với nồng độ chất 1 được pha (1,0 mg/ml) (mỗi nồng độ 3 mẫu). Tính lượng chuẩn tìm lại tương ứng bằng cách suy ra từ đường tuyến tính, từ đó tìm được tỷ lệ phục hồi tương ứng. Độ phục hồi từ 98,0% đến 102,0%	99,4%

3.2.3. Kết quả thiết lập CDC orcinol glucosid phân lập

Đánh giá độ đồng nhất lô và liên phòng thí nghiệm (PTN): Kết quả ở Bảng 3 cho thấy, 100 lọ OG phân lập (số lô 010522) có độ tinh khiết (% HPLC-PDA) của 11 lọ là 98,58% ($RSD = 0,03\%$). Độ tinh khiết của OG được xác định tại 3

PTN ($n = 18$) được kiểm định trung bình bằng ANOVA có $F_m (1,692) < F_{tc} (3,682)$ cho thấy kết quả định lượng giữa 3 PTN khác biệt không có ý nghĩa thống kê. Quy trình phân tích có độ lặp lại cao, hàm lượng chất phân tích không phụ thuộc vào phòng thí nghiệm tham gia đánh giá (Bảng 4).

Bảng 3. Kết quả đánh giá độ đồng nhất lô (11 lọ mẫu ngẫu nhiên) ($n = 11$)

STT lọ	Độ tinh khiết ($n=2$, TB%)	STT lọ	Độ tinh khiết ($n=2$, TB%)
44	98,61	84	98,55
8	98,60	18	98,56
68	98,59	12	98,55
59	98,59	90	98,55
76	98,60	2	98,57
17	98,59		
TB (RSD%)		98,58 (0,03%)	

Bảng 4. Kết quả đánh giá liên phòng thí nghiệm ($n = 18$)

STT	Độ tinh khiết sắc ký (%)		
	PTN 1	PTN 2	PTN 3
1	98,58	98,58	98,54
2	98,58	98,57	98,58
3	98,57	98,58	98,57
4	98,57	98,55	98,55
5	98,57	98,48	98,56
6	98,59	98,56	98,54
TB	$98,58 \pm 0,008$	$98,55 \pm 0,04$	$98,56 \pm 0,01$

Bảng 5. Kết quả tính giá trị ấn định độ tinh khiết OG ($n = 18$)

	x^*_0	x^*_1	x^*_2	x^*_3
δ	-	0,02	0,02	0,02
$x^* - \delta$	-	98,55	98,54	98,54
$x^* + \delta$	-	98,59	98,59	98,59
TB	98,56	98,57	98,57	98,57
SD	0,025	0,013	0,013	0,013
x^* mới	98,57	98,57	98,57	98,57
s^* mới	0,0148	0,0151	0,0151	0,0151

Giá trị ấn định: Sau ba lần thay đổi, $s^* = 0,0151$ không thay đổi, khi đó x^* được chọn là 98,6%. Từ kết quả tính z-score, 17/18 giá trị có $|x| < 2,0$, trung bình 17 giá trị này có hàm lượng là 98,57% (tính trên chế phẩm làm khan) với độ lệch chuẩn 0,01 và độ không đảm bảo đo $U = 0,02$ ($k = 2$) (Bảng 5).

4. Kết luận

Từ 11,0 kg thân rễ sâm cau (*Curculigo orchoides* Gaertn.) đã chiết xuất và phân lập được 1,1 g orcinol glucosid, chất này được dùng làm nguyên liệu thiết lập chất chuẩn đối chiếu. Phương pháp định lượng hợp chất OG phân lập được thẩm định đầy đủ các tiêu chí của chất chuẩn theo hướng dẫn của ISO 13528 và ISO 35 với độ tinh khiết được xác định là 98,57% (tính trên chế phẩm làm khan, hàm ẩm 2,25%) ($s = 0,01$; $U = 0,02$). Chất chuẩn OG đã thiết lập có thể được ứng dụng trong kiểm nghiệm nguyên liệu và cao chiết từ dược liệu sâm cau.

Lời cảm ơn: Đề tài được sự hỗ trợ kinh phí của Sở Khoa học & Công nghệ tỉnh Đắk Nông.

1. Soni N., Lal V., Agrawal S., Verma H. (2011), Pharmacognostical and phyto physico-chemical profile of *Curculigo orchoides* (Gaertn), *Advance Research Pharmaceuticals and Biologicals*, 1, 130-138.
2. Xu J. P., Xu R. S. (1992), Cycloartane-type saponinins and their glycosides from *Curculigo orchoides*, *Phytochemistry*, 31(7), 2455-2458.
3. Valls J., Richard T., Larronde F., Leblais V., Muller B., Delaunay J. C., Monti J. P., Ramawat K., Mérillon J. M. (2006), Two new benzylbenzoate glucosides from *Curculigo orchoides*, *Fitoterapia*, 77(6), 416-419.
4. Zuo A. X., Shen Y., Jiang Z. Y., Zhang X. M., Zhou J., Lü J., Chen J. J. (2010), Three new phenolic glycosides from *Curculigo orchoides* G, *Fitoterapia*, 81(7), 910-913.
5. Yokosuka A., Sato K., Mimaki Y. (2010), Cycloartane glycosides from the rhizomes of *Curculigo orchoides*, *Phytochemistry*, 71(17-18), 2174-2181.
6. Zuo A. X., Shen Y., Jiang Z. Y., Zhang X. M., Zhou J., Lü J., Chen J. J. (2012), Two new triterpenoid glycosides from *Curculigo orchoides*, *Journal of Asian natural products research*, 14(5), 407-412.
7. Nguyen Thi Ha Ly, Nguyen Dinh Quan, Nguyen Thi Phuong, Nguyen Van Khiem, Nguyen Minh Khoi, Phuong Thien Vuong (2019), Development of an analysis method using HPLC-UV for simultaneous quantification of orcinol glycoside and curculigoside in *Rhizoma Curculiginis*, *Journal of Medicinal Materials*, 24(3), 144-148.
8. Wu Q., Fu D. X., Hou A. J., Lei G. Q., Liu Z. J., Chen J. K., Zhou T. S. (2005), Antioxidative phenols and phenolic glycosides from *Curculigo orchoides*, *Chemical Pharmaceutical Bulletin (Tokyo)*, 53(8), 1065-7.
9. Gong W., Liu M., Zhang Q., Zhang Q., Wang Y., Zhao Q., Xiang L., Zheng C., Zhang Q., Qin L. (2022), Orcinol glucoside improves senile osteoporosis through attenuating oxidative stress and autophagy of osteoclast via activating Nrf2/Keap1 and mTOR signaling pathway, *Oxidative Medicine Cellular Longevity*, 2022, 5410377.
10. Lv T. T., Ju C. G., Liu B. N., Ren X. H., Shan G. S., Jia T. Z. (2019), Determination of orcinol glucoside by LC-MS in *Curculigo orchoides* and its application to a pharmacokinetic study, *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 29(6), 744-748.
11. Bian Q., Yang H., Chan C. O., Jin D., Mok D. K. W., Chen S. (2013), Fingerprint analysis and simultaneous determination of phenolic compounds in extracts of *Curculiginis Rhizoma* by HPLC-diode array detector, *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 61(8), 802-808.
12. ICH Guideline (2005), *Validation of Analytical Procedures: Methodology*.
13. ISO Guide 35 (2006), Reference materials - General and statistical principles for certification.
14. ISO Guide 13528 (2005), Statistical methods for use in proficiency testing by interlaboratory comparisons.
15. Di L., Wang K. J., Zhu C. C., Li N. (2010), Chemical constituents from Rhizomes of *Curculigo capitulata*, *Bulletin of the Korean Chemical Society*, 31(10), 2999-3002.

Tạp chí Dược liệu, tập 28, số 1/2023 (Trang 20 - 27)

THIẾT LẬP CHẤT ĐỐI CHIẾU BAICALEIN VÀ XÂY DỰNG QUY TRÌNH ĐỊNH LƯỢNG ĐỒNG THỜI BAICALEIN, OROXYLIN A, CHRYSIN TRONG VỎ THÂN NÚC NÁC BẰNG PHƯƠNG PHÁP HPLC-PDA

**Trần Thị Vân Anh, Nguyễn Thị Phương Linh, Lê Thị Hương Lan,
Nguyễn Thị Ngọc Dung, Phan Văn Hồ Nam***

Khoa Dược - Đại học Y Dược thành phố Hồ Chí Minh

*Email: phanvanhonam@ump.edu.vn

(Nhận bài ngày 10 tháng 01 năm 2023)

Tóm tắt

Ở Việt Nam, vỏ thân núc nác (*Cortex Oroxyli*) là thành phần trong nhiều chế phẩm thuốc dược liệu và thực phẩm chức năng. Thành phần flavonoid chính trong vỏ núc nác là baicalein, chrysin và oroxylin A có nhiều hoạt tính dược lý đã được chứng minh. Trong nghiên cứu này, 1,1 g baicalein phân lập từ núc nác được tiến hành thiết lập chất đối chiếu theo hướng dẫn ISO guide 35; độ tinh khiết được công bố là 98,11%. Sau đó, quy trình định lượng đồng thời 3 hợp chất baicalein, chrysin và oroxylin A được xây dựng để đánh giá hàm lượng các chất này trong nguyên liệu vỏ thân núc nác. Phương pháp định lượng sử dụng cột Hibar C₁₈ (250 x 4.6 mm; 5 µm), pha động là hỗn hợp acid trifluoroacetic 0,05% (A) và acetonitril (B) theo chương trình dung môi: 35-60% B (21 phút); 60-80% B (1 phút); 80% B (13 phút), tốc độ dòng 1,2 mL/phút và phát hiện ở bước sóng 270 nm. Phương pháp phân tích được đánh giá tính tương thích hệ thống, độ đặc hiệu, độ tuyến tính, độ đúng, độ chính xác, giới hạn phát hiện (LOD) và giới hạn định lượng (LOQ). Kết quả chứng minh phương pháp định lượng các flavonoid bằng HPLC-PDA có thể dùng để nâng cao tiêu chuẩn đánh giá dược liệu núc nác.

Từ khóa: Núc nác, *Oroxylum indicum*, Baicalein, Chrysin, Oroxylin A, Chất đối chiếu, Định lượng HPLC.

Summary

Establishment Baicalein as a Reference Compound and Development HPLC-PDA Method for Simultaneous Quantification of Baicalein, Chrysin and Oroxylin A in *Cortex oroxyli*

In Vietnam, the stem bark of *Oroxylum indicum* (*Cortex oroxyli*) is an ingredient of many dietary supplements and pharmaceutical products. Baicalein, chrysin and oroxylin A have been determined as the main flavonoids with many proven biological activities. In this study, 1.1 g of baicalein isolated from *Oroxylum indicum* was established as reference compound according to ISO Guide 35. Then, a HPLC-PDA method was established for simultaneous quantification of baicalein, chrysin and oroxylin A in *Cortex Oroxyli*. The analysis was carried out using Hibar C₁₈ (250 x 4.6 mm; 5 µm) column; gradient mobile phase trifluoroacetic acid 0.05% (A) - acetonitrile (B) - gradient: 35 - 60% B (21 minutes); 60 - 80% B (1 minutes); 80% B (13 minutes), at flow rate 1.2 mL/min and detector wavelength 270 nm. The analytical method was validated for the system suitability, specificity, linearity, precision, accuracy, limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ). These results have indicated the flavonoid quantification method by HPLC-PDA could be used for improving the quality control of *O. indicum*.

Keywords: *Oroxylum indicum*, Baicalein, Chrysin, Oroxylin A, Reference compound, Quantification, HPLC.