

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 saponin 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 trifloroacetic 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*

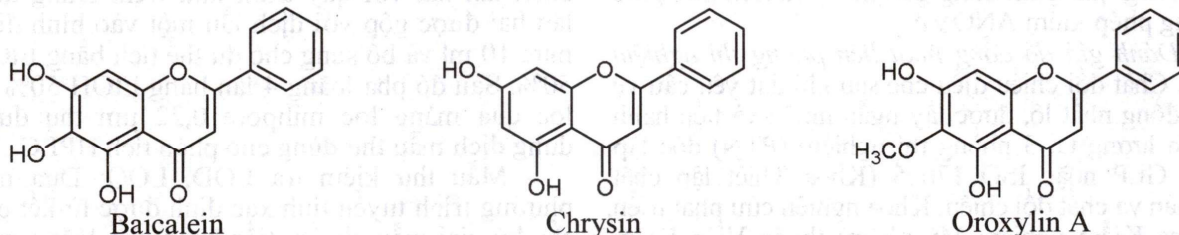
In Vietnam, the stem bark of *Oroxylum indicum* (*Cortex oroxyli*) is an ingredient of many dietary supplements and pharmaceutical products. Baicalein, chrysin and oroxylin A have been determined as the main flavonoids with many proven biological activities. In this study, 1.1 g of baicalein isolated 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 trifloroacetic 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.

1. Đặt vấn đề

Núc nác (*Oroxylum indicum* (L.) Vent.) là dược liệu được sử dụng phổ biến trong y học cổ truyền chữa các bệnh vàng da, dị ứng, mẩn ngứa, ho, viêm họng... [1]. Hai bộ phận dùng của núc nác thường được sử dụng là vỏ thân (Hoàng bá nam) và hạt được sử dụng là thành phần trong các chế phẩm thuốc dược liệu và thực phẩm chức năng [2]. Vỏ thân núc nác (*Cortex oroxyli*) được đưa vào chuyên luận Dược điển Việt Nam V [3]. Thành phần hóa học chính trong núc nác là các flavonoid có nhiều tác dụng sinh học đáng chú ý như chống oxy hóa, kháng khuẩn, kháng viêm,

ức chế tế bào ung thư... [2]. Đối với vỏ thân núc nác, các flavonoid chính được xác định là baicalein, chrysin và oroxylin A (Hình 1), tuy nhiên chuyên luận đánh giá chất lượng dược liệu vỏ thân núc nác trong Dược điển Việt Nam V chỉ dừng ở mức chỉ tiêu hàm lượng chất chiết được, chưa có chỉ tiêu định lượng các thành phần flavonoid chính này. Do đó nghiên cứu thực hiện việc thiết lập chất đối chiếu baicalein từ vỏ thân núc nác và xây dựng phương pháp định lượng đồng thời baicalein, chrysin và oroxylin A bằng HPLC-PDA nhằm nâng cao mức tiêu chuẩn kiểm nghiệm cho dược liệu núc nác.



Hình 1. Cấu trúc hóa học các chất baicalein, chrysin và oroxylin A

2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

2.1. Đối tượng nghiên cứu

Vỏ thân núc nác (*Oroxylum indicum*) thu hái tại Bình Phước vào tháng 3/2022. Mẫu được định danh bởi TS. Trần Thị Vân Anh - Bộ môn Dược liệu, Khoa Dược, Đại học Y Dược tp. Hồ Chí Minh, mẫu lưu kí hiệu NN-BP0322, lưu tại Bộ môn Dược liệu, Đại học Y Dược tp. Hồ Chí Minh. Nguyên liệu sau khi thu hái được phơi khô xay nhỏ rồi rây qua cỡ rây 0,22 mm, bảo quản ở nơi khô mát. 2,2 g baicalein được phân lập từ 3 kg vỏ thân núc nác tại bộ môn Dược liệu, Đại học Y Dược tp. HCM (thông qua các bước bao gồm chiết ngâm kiệt với cồn 96%, kết tủa bằng cách thêm nước, phân tách bằng sắc ký cột pha thuận và tinh chế bằng cách kết tủa lại sau khi làm bay hơi dung môi) và được đánh giá nguyên liệu đầu vào cho việc thiết lập chất đối chiếu (Định tính bằng DSC, IR, UV-Vis, MS, NMR và xác định độ tinh khiết bằng SKLM, HPLC). 1,1g baicalein này được dùng làm nguyên liệu để thiết lập chất đối chiếu.

Dung môi hóa chất: oroxylin A và chrysin cũng được phân lập từ vỏ thân núc nác (có độ tinh khiết 100,0% được xác định bằng HPLC-PDA) được cung cấp bởi bộ môn Dược liệu, Khoa Dược, Đại học Y Dược tp. Hồ Chí Minh; Acetonitrile - ACN, methanol - MeOH (tiêu chuẩn sắc ký lỏng, Merck), acid formic, acid trifloroacetic - TFA (tiêu chuẩn phân tích, Merck), nước cất 2 lần.

Thiết bị phân tích: Hệ thống sắc ký lỏng hiệu năng cao HPLC-PDA (Waters Alliance 2695XE đầu dò PDA Waters 2996); Cột sắc ký pha đảo

Hibar C18 (250 x 4,6 mm; 5 μ m); Hệ thống sắc ký lỏng phân tích nhanh UFLC LC 20 - UV (Shimadzu); Cột sắc ký pha đảo Inspire C18 (250 x 4,6 mm; 5 μ m); Hệ thống cộng hưởng từ hạt nhân độ phân giải cao NMR AVANCE NEO 400 MHz (Bruker); máy quang phổ UV-Vis (Thermo); Máy quang phổ hồng ngoại FTIR IR Affinity-1S (Shimadzu), tủ đông ông Labconco Protector Glove Box; Cân phân tích CP-2250 có độ nhạy 0,01 mg (Sartorius); Bể siêu âm T840 DH (Elma); Máy quét nhiệt vi sai DSC 204 F1 Phoenix 180°C đến 700°C (NETZSCH). Máy đo phân tích nhiệt trọng trường (TGA) Metler Toledo.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Thiết lập chất đối chiếu

Xác định độ tinh khiết baicalein bằng HPLC-PDA theo phương pháp qui về 100% diện tích pic: Khảo sát pha động là chương trình dung môi từ tỷ lệ 1:99 đến 99:1 (A:B, v/v), trong đó A là ACN và B là nước hoặc acid formic 0,01% hoặc TFA 0,05%. Lựa chọn pha động phù hợp cho pic baicalein tách hoàn toàn với các tạp chất khác và có thời gian lưu hợp lý (nhỏ hơn 20 phút). Quá trình thực nghiệm lựa chọn pha động là hỗn hợp dung môi (A) acetonitril và (B) TFA 0,05% (30-90%A trong 20 phút, 90%A trong 10 phút, 90-30%A trong 1 phút, 30%A trong 9 phút). Các điều kiện sắc ký khác bao gồm bước sóng phát hiện là 270 nm, tốc độ dòng 1,0 mL/phút, thể tích tiêm mẫu là 10 μ L, nhiệt độ cột 45°C. Mẫu thử: baicalein 0,5 mg/mL trong methanol (500 ppm). Mẫu trắng: Methanol. Mẫu thử phân hủy trong acid/kiềm/hydroperoxid: Thêm 1 mL acid hydroclorid 1 N hoặc 1 mL natri hydroxyd 1 N

hoặc 1 mL dung dịch hydroperoxid 30% tương ứng vào 10 mL dung dịch baicalein 0,5 mg/mL, trộn đều, để yên 60 phút, trung hòa mẫu trước khi tiêm. Thẩm định quy trình theo hướng dẫn của ICH và AOAC gồm các chỉ tiêu: tính tương thích hệ thống, tính đặc hiệu, tính tuyến tính và độ chính xác và độ đúng.

Đóng gói và đánh giá độ đồng nhất lô trong quá trình đóng gói [4]: Chất đối chiếu điều chế được đóng thành lọ (10 mg/lọ), trong môi trường khí Nitơ, độ ẩm 30% RH ở 25°C, sử dụng lọ thủy tinh nâu, hàn kín, có lớp đệm. Lấy ngẫu nhiên các lọ (số lọ = $\sqrt{N} + 1$) để đánh giá độ đồng nhất lô trong quá trình đóng gói, xử lý số liệu thống kê bằng phép kiểm ANOVA.

Đánh giá độ đồng nhất liên phòng thí nghiệm [5]: Chất đối chiếu điều chế sau khi đạt yêu cầu về độ đồng nhất lô, được lấy ngẫu nhiên và tiến hành định lượng tại 3 phòng thí nghiệm (PTN) độc lập đạt GLP hoặc ISO 17025 (Khoa Thiết lập chất chuẩn và chất đối chiếu, Khoa nghiên cứu phát triển, Khoa Kiểm nghiệm Mỹ phẩm) thuộc Viện Kiểm nghiệm thuốc tp. HCM. Mỗi PTN định lượng 6 lọ, mỗi lọ được phân tích hai lần trên cùng quy trình. Tập hợp các kết quả của 3 PTN tham gia (n = 18), đánh giá kết quả theo ANOVA. Xác định giá trị công bố trên phiếu kiểm nghiệm (CoA).

Xây dựng và thẩm định quy trình định lượng baicalein, chrysin và oroxylin A trong vỏ thân núc nác bằng HPLC-PDA

Khảo sát điều kiện sắc ký: Khảo sát bước sóng phát hiện đồng thời 3 chất, pha tĩnh (C8, C18), pha động (loại dung môi; thành phần các acid và nồng độ phù hợp); chương trình pha động (rửa giải đẳng dòng và gradient); tốc độ dòng (0,8 - 1,0 - 1,2 mL/phút); nhiệt độ cột (35 - 40 - 45°C).

Khảo sát quy trình chuẩn bị mẫu: Khảo sát phương pháp chiết xuất (đun hồi lưu và siêu âm), dung môi (EtOH, EtOH 70%; EtOH 50%; EtOH 30%; MeOH; MeOH 70%; EA), nhiệt độ, thời gian, số lần chiết xuất được liệu để thu được hàm lượng 3 chất định lượng cao nhất.

Quy trình định lượng sau khảo sát:

- Dung dịch chuẩn gốc: có nồng độ baicalein 500 µg/mL, chrysin 1000 µg/mL và oroxylin A 1000 µg/mL trong methanol.

- Giai mẫu chuẩn: Pha loãng dung dịch chuẩn gốc của 3 chất bằng MeOH để thu được 7 dung dịch hỗn hợp có 3 chất có các mức nồng độ

250,00 - 125,00 - 62,50 - 31,25 - 10,00 - 5,00 - 1,00 µg/mL.

- Mẫu chuẩn: Pha loãng dung dịch chuẩn gốc của 3 chất bằng MeOH để thu được dung dịch có nồng độ baicalein 50 ppm, chrysin 10 ppm và oroxylin A 10 ppm.

- Mẫu thử: Cân chính xác khoảng 100 mg mẫu bột vỏ thân núc nác (đã qua rây số...) cho vào ống nghiệm ly tâm (10 ml), thêm 5 ml EtOH 50%, siêu âm 30 phút. Sau đó ly tâm với tốc độ 4500 vòng/phút trong vòng 5 phút, chuyển toàn bộ dịch vào bình định mức 10 ml. Thêm 5 ml EtOH 50% vào phần cặn còn lại và tiến hành chiết lần hai với quy trình như trên. Dung dịch lần hai được gộp với dịch lần một vào bình định mức 10 ml và bổ sung cho đủ thể tích bằng EtOH 50%. Sau đó pha loãng 4 lần bằng EtOH 50% và lọc qua màng lọc milipore 0,22 µm thu được dung dịch mẫu thử dùng cho phân tích HPLC.

- Mẫu thử kiểm tra LOD, LOQ: Dựa trên phương trình tuyến tính xác định được từ kết quả sắc ký giai mẫu chuẩn, tiến hành pha loãng mẫu thử để thu được các dung dịch có nồng độ baicalein 0,5 µg/mL và 1 µg/mL, nồng độ chrysin 0,05 µg/mL và 0,2 µg/mL, nồng độ oroxylin A 0,05 µg/mL và 0,2 µg/mL. Tiến hành sắc ký và tính tỷ số S/N bằng phần mềm Empower 4.0.

- Điều kiện phân tích: Hệ thống sắc ký lỏng hiệu năng cao ghép đầu dò PDA Waters Alliance 2695XE-2996; Cột sắc ký pha đảo Hibar C18 (250 x 4,6 mm; 5 µm); Nhiệt độ cột 45°C; Pha động là acid trifloroacetic 0,05% (A)- 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; Thể tích tiêm mẫu 10 µl; Bước sóng phát hiện 270 nm.

Đánh giá quy trình định lượng: Quy trình định lượng được đánh giá theo hướng dẫn của ICH [6] và AOAC [7] bao gồm: Tính tương thích hệ thống, tính đặc hiệu, khoảng tuyến tính, giới hạn phát hiện (LOD), giới hạn định lượng (LOQ), độ lặp lại, độ chính xác trung gian và độ đúng.

3. Kết quả nghiên cứu

Thiết lập chất đối chiếu baicalein

Xác định độ tinh khiết của baicalein

Qua các khảo sát về hệ dung môi, lựa chọn điều kiện phân tích HPLC xác định độ tinh khiết của baicalein như sau:

Bảng 1. Kết quả thẩm định quy trình định lượng baicalein

Chỉ tiêu	Yêu cầu	Kết quả
Tính tương thích hệ thống	Số đĩa lý thuyết $N \geq 2000$	20930
	Hệ số đối xứng $t \leq 2,0$	1,27
	RSD (thời gian lưu) $\leq 2\%$	0,10
	RSD (diện tích pic) $\leq 2\%$	0,87
Tính đặc hiệu	Mẫu trắng, mẫu phân hủy trong acid, kiềm và peroxid; không ảnh hưởng đến kết quả phân tích mẫu thử.	Đúng

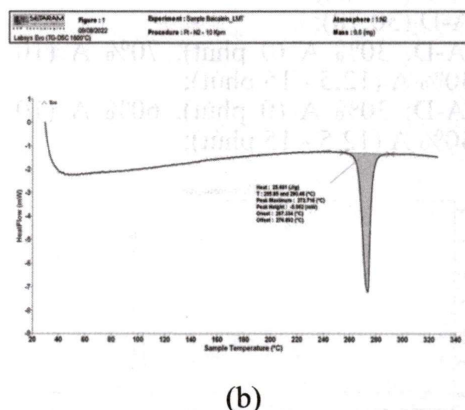
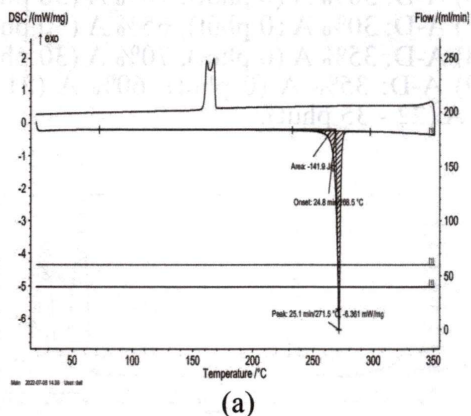
Chỉ tiêu	Yêu cầu	Kết quả
Độ tuyến tính	Phương trình hồi quy tuyến tính xây dựng trên dãy nồng độ 0,06 ; 0,08; 0,10; 0,12; 0,14 mg/mL trong methanol	$\hat{y} = 37912585x$
	Khoảng tuyến tính ($\mu\text{g/mL}$).	60 - 140
	Hệ số tương quan $r \geq 0,998$	0,9999
Độ chính xác	Độ lặp lại RSD ($n=6$) $\leq 2\%$	0,18%
	Độ chính xác trung gian RSD ($n=12$) $\leq 2\%$	0,15%
Độ đúng	Tiến hành sắc ký 9 dung dịch thử độ đúng có nồng độ baicalein thêm vào tương ứng 60%; 100%; 140% so với nồng độ chất baicalein 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%	98,0% - 101,9%

Kiểm tra nguyên liệu đầu vào
 Kết quả đánh giá nguyên liệu đầu vào cho việc thiết lập chất đối chiếu baicalein được trình bày trong Bảng 2, đạt yêu cầu để tiến hành các bước tiếp theo.

Bảng 2. Kết quả đánh giá nguyên liệu đầu vào của baicalein

Chỉ tiêu	Yêu cầu	Kết quả
	DSC	Đúng (271,5°C)
	IR	Có tín hiệu của nhóm -OH (ở C-5) và C = O (C-4)
Định tính	UV-Vis	$\lambda_{\text{max}} = 270 \pm 2 \text{ nm}$ và $206 \pm 2 \text{ nm}$
	MS	Phù hợp với CTPT $\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_5$, MW: 270,24
	NMR	Phù hợp với TLTK [8] $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO-d_6): δ_{H} (ppm) 6,91(1H, s, H-3), 6,61 (1H, s, H-8), 8,04 (2H, dd, $J = 8,0$; 1,5 Hz, C-2'/6'), 7,55 (2H, d, $J = 8,0$ Hz, C-3'/5'), 7,58 (1H, m, C-4') $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, DMSO -d_6) δ_{C} (ppm): 162,3 (C-2), 103,9 (C-3), 181,5 (C-4), 153,0 (C-5), 128,7 (C-6), 146,3 (C-7), 93,4 (C-8), 149,2 (C-9), 103,9 (C-10), 130,3 (C-1'), 125,7 (C-2'/6'), 128,7 (C3'/5'), 131,2 (C-4') Phổ HMBC có tương tác giữa H-3 với C-2, C-4, C-5, C-1' và H-8 với C-5, C-10, C-7, C-8 và C-4 giúp khẳng định cấu trúc Dữ liệu phổ của chất nguyên liệu hoàn toàn phù hợp với số liệu của TLTK - Đúng cấu trúc Baicalein
Xác định độ tinh khiết	SKLM	Triển khai 3 hệ dung môi, chỉ xuất hiện 1 vết duy nhất. trên sắc ký đồ
	HPLC	% diện tích đỉnh $> 95\%$

Xác định hàm ẩm của nguyên liệu đầu vào baicalein: Kết quả đo DSC và TGA cho thấy mẫu không còn dung môi tồn dư (không có sự giảm khối lượng đồng thời với quá trình thay đổi nhiệt lượng trong khoảng nhiệt $<150^\circ\text{C}$) (Hình 2).



Hình 2. Kết quả đo DSC (a) và TGA (b) của mẫu baicalein nguyên liệu

Đóng gói và đánh giá độ đồng nhất lô trong quá trình đóng gói

Kết quả độ tinh khiết sắc ký khi đánh giá độ đồng nhất lô là 98,18%, RSD (n=10, %) = 0,17 cho thấy các lọ có tính đồng nhất sau đóng gói. Kết quả độ tinh khiết khi đánh giá độ đồng nhất liên phòng thí nghiệm lần lượt là 97,89% (PTN1); 97,94% (PTN2); 98,00% (PTN3). Kết quả phân tích ANOVA ($F_{tn} = 0,028 < F_{0,05} = 3,682$) cho thấy kết quả định lượng giữa 3 phòng thí nghiệm khác biệt không có ý nghĩa thống kê, hàm lượng chất phân tích không phụ thuộc vào phòng thí nghiệm tham gia đánh giá.

Xác định giá trị ấn định, giá trị công bố

Bảng 3. Kết quả tính giá trị ấn định hàm lượng (%) của baicalein (n=18)

	Chu kỳ 0 DL gốc (%)	Chu kỳ 1 xi*1	Chu kỳ 2 xi*2	Chu kỳ 3 xi*3
x*-δ		97,85	97,86	97,86
x*+δ		98,31	98,35	98,35
Trung bình	98,11			
SD	0,1427			
x*	98,08	98,11	98,11	98,11

Bảng 4. Kết quả khảo sát các điều kiện sắc ký khác nhau để tách baicalein, oroxylin A và chrysin trong vỏ thân núc nác

Điều kiện sắc ký		Baicalein			Chrysin			Oroxylin A		
Pha tĩnh	Pha động	RT	R _s	A _s	RT	R _s	A _s	RT	R _s	A _s
C8	1	22,081	-	-	22,448	-	-	-	-	-
C18	1	17,388	-	1,37	46,279	14,47	1,17	51,172	1,73	1,10
	2	16,769	-	2,18	43,358	11,72	1,69	48,461	1,61	1,68
	3	9,642	-	1,30	12,249	7,98	1,17	12,795	1,54	1,10
	4	10,732	-	1,42	14,187	8,43	1,26	14,940	1,65	1,24
	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	6	11,356	-	1,30	16,633	9,38	1,19	17,827	1,99	1,16
	7	8,635	-	1,32	12,962	8,50	1,21	14,009	1,92	1,20
	8	9,062	-	1,32	14,129	8,67	1,20	15,350	1,99	1,20
	9	8,527	-	1,46	13,514	8,08	1,24	14,764	2,01	1,17

Chú thích: (-) không thu được các thông số sắc ký; R_s: Độ phân giải chỉ tính so với pic phía trước.

Điều kiện sắc ký: (A): ACN; (B): MeOH; (C): acid formic 0,1% pH=2,6; (D) TFA 0,05% pH=2,5

- (1) A-C (60:40);
- (2) A-D (30:70);
- (3) A-D: 30% A (0 phút), 70% A (10 - 12 phút), 30% A (12,5 - 15 phút);
- (4) A-D: 30% A (0 phút), 60% A (10 - 12 phút), 30% A (12,5 - 15 phút);

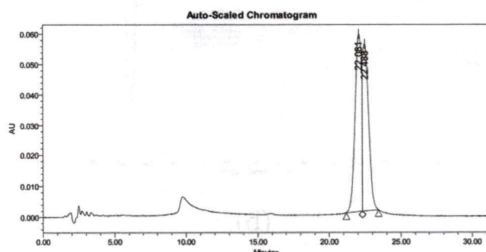
	Chu kỳ 0 DL gốc (%)	Chu kỳ 1 xi*1	Chu kỳ 2 xi*2	Chu kỳ 3 xi*3
s*	0,1557	0,1601	0,1601	0,1601
δ	0,23	0,24	0,24	0,24

Sau ba lần thay đổi, s* = 0,1601 và x* = 98,11 không thay đổi ở số thứ ba sau dấu phẩy, khi đó x* được chọn là 98,11%. Từ kết quả trên, tính Z-score cho thấy tất cả 18/18 giá trị có |x| < 2,0. Như vậy mẫu baicalein đủ điều kiện để đăng ký chuẩn quốc gia với hàm lượng được xác định 98,11% tính theo nguyên trạng, độ không đảm bảo đo là 0,0472, độ lệch chuẩn 0,1601. Tiến hành lập hồ sơ chất chuẩn, dán nhãn lọ chuẩn và kèm theo phiếu kiểm nghiệm. Bảo quản ở nhiệt độ 0 - 8°C, tránh ánh sáng.

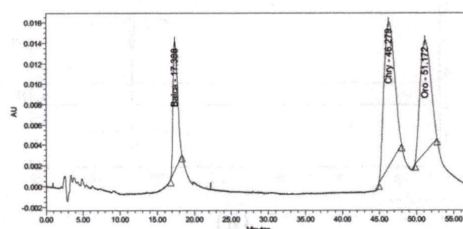
Quy trình định lượng đồng thời baicalein, oroxylin A và chrysin trong vỏ thân núc nác

Dựa vào quy trình phân lập 3 hợp chất phân tích, và đặc điểm của nhóm hợp chất flavonoid, một số điều kiện sắc ký được khảo sát như bảng 4, điều kiện sắc ký 9 được lựa chọn cho thấy các pic cần định lượng tách hoàn toàn, đạt độ tinh khiết pic và các thông số sắc ký (Hình 3).

- (5) B-D: 30% B (0 phút), 60% B (10 - 12 phút), 30% B (12,5 - 15 phút);
- (6) A-D: 30% A (0 phút), 70% A (30 phút);
- (7) A-D: 30% A (0 phút), 65% A (30 phút);
- (8) A-D: 35% A (0 phút), 70% A (30 phút);
- (9) A-D: 35% A (0 phút), 60% A (21 phút), 80% A (22 - 35 phút);

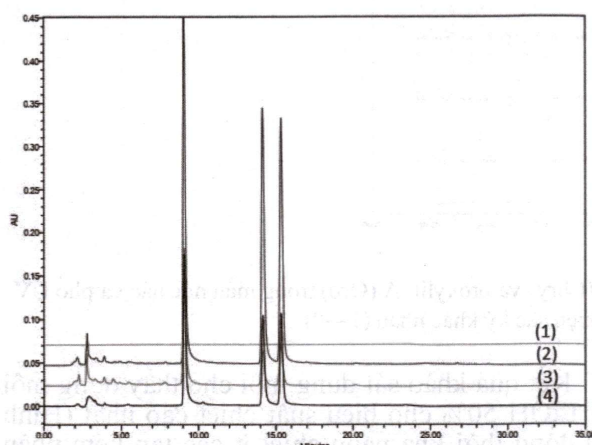


(1)



(2)

Chỉ tiêu	Yêu cầu		Kết quả		
			Baicalein	Chrysin	Oroxylin A
	Diện tích pic ($\mu V \cdot s$)	Trung bình $RSD \leq 2\%$	5725517 1,51	773484 1,51	966975 1,48
	Độ phân giải (so với pic phía trước)	$\geq 1,5$	-	15,1	3,2
	Hệ số bất đối	0,8-1,2	1,4	1,3	1,3
	Số đĩa lý thuyết	≥ 2000	14172	21387	24844
Tính đặc hiệu	Mẫu thử và thử thêm chuẩn có các pic cùng thời gian lưu với mẫu chuẩn trong khi mẫu trắng không có. Mẫu thử thêm chuẩn có diện tích pic các chất phân tích tăng lên so với các pic tương ứng trong mẫu thử		Đạt (Hình 5)		
	Độ tinh khiết pic (trên sắc ký đồ mẫu thử)	Purity angle < Purity threshold	0,18 < 0,26	0,38 < 0,47	0,24 < 0,40
Tính tuyến tính	Phương trình hồi quy		$\hat{y} = 37306x$	$\hat{y} = 74151x$	$\hat{y} = 58499x$
	Hệ số tương quan		0,9954	0,9986	0,9981
	Khoảng tuyến tính ($\mu g/mL$)		1 - 250	1 - 250	1 - 250
LOD-LOQ	LOD ($\mu g/mL$)		0,5	0,05	0,05
	LOD (mg/g được liệu)		0,2	0,02	0,02
	S/N		2,54	2,78	3,41
	LOQ ($\mu g/mL$)		1	0,2	0,2
	LOQ (mg/g được liệu)		0,4	0,08	0,08
	S/N		9,31	15,56	16,23
Độ lặp lại	Hàm lượng % trung bình (n=6)		2,583	0,452	0,670
	RSD (n=6) $\leq 2\%$		1,75	1,08	1,85
Độ chính xác trung gian	Hàm lượng % trung bình (n=12)		2,585	0,455	0,665
	RSD (n=12) $\leq 2\%$		1,48	1,10	1,74
Độ đúng	Độ hồi phục ở 3 mức thêm chuẩn 80-100-120% đối với baicalein là 92,0-105,0% và đối với Chrysin / Oroxylin A là 90,0-108,0%		93,3% - 101,1%	95,7% - 106,1%	101,9% - 106,9%



Hình 5. Sắc ký đồ triển khai các mẫu trắng (1), mẫu thử thêm chuẩn (2). Mẫu thử (3) và mẫu chuẩn (4) khi tiến hành kiểm tra độ đặc hiệu của quy trình định lượng đồng thời baicalein, chrysin và oroxylin A trong vỏ thân núc nác

4. Bàn luận

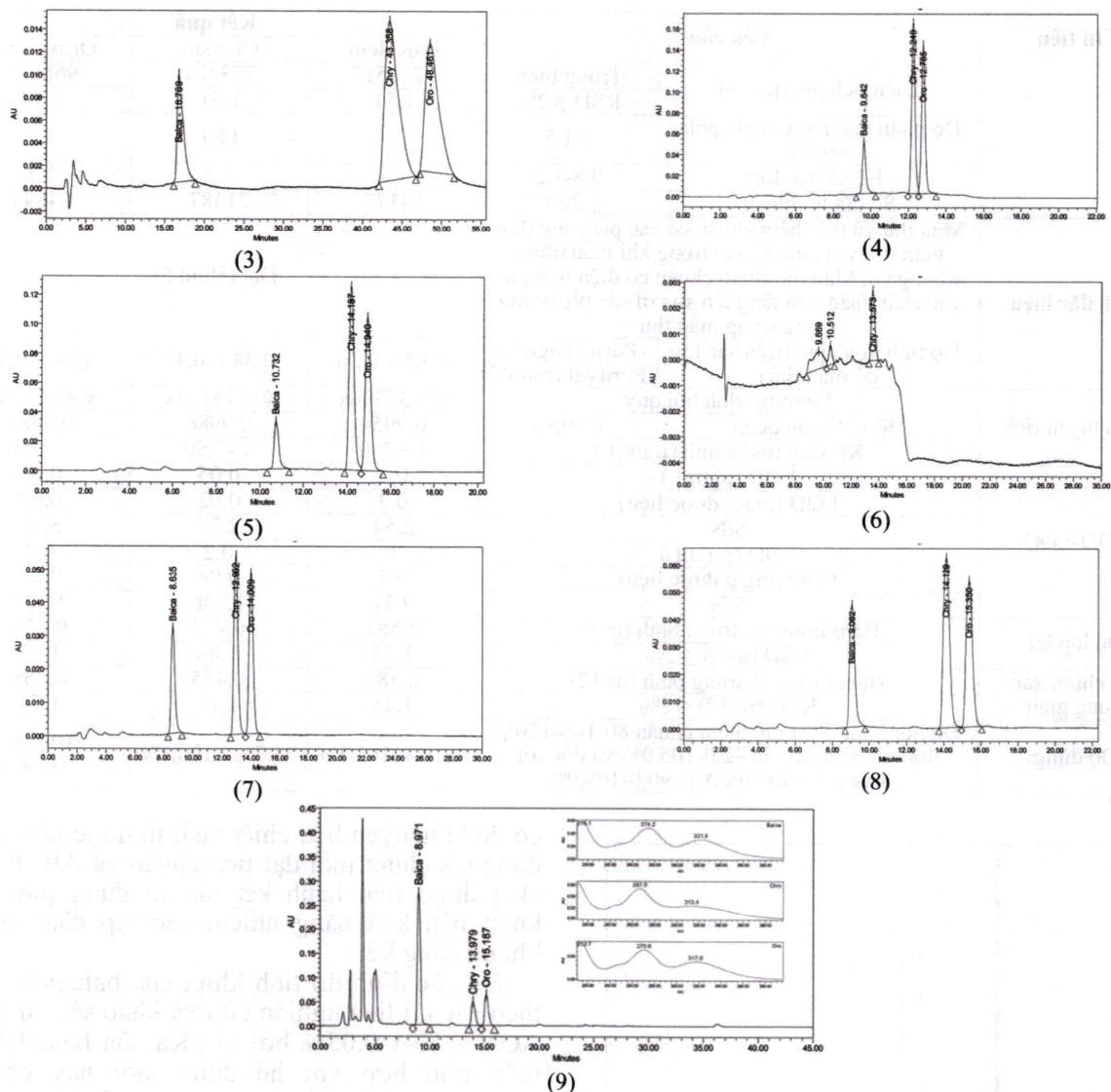
Trong vỏ thân núc nác, baicalein là thành phần có hàm lượng cao nhất [8] do đó sau khi phân lập thu được lượng baicalein đáng kể so với chrysin hay oroxylin A có trong vỏ thân. Vì có nhiều tác dụng dược lý, sinh học cũng như phân lập được một lượng chất tương đối, baicalein được chọn để tiến hành thiết lập chất đối chiếu. Các kết quả kiểm tra nguyên liệu đầu vào baicalein đều đạt theo các chỉ tiêu định tính (điểm chảy, UV, IR, NMR), độ ẩm, tuy nhiên về tạp vô

cơ do là nguyên liệu chiết xuất từ dược liệu và sử dụng các dung môi đạt tiêu chuẩn và AR, PA và chất được tiến hành kết tủa từ dung môi tinh khiết nên khả năng nhiễm các tạp chất vô cơ không đáng kể.

Để xác định độ tinh khiết của baicalein, dựa theo các tài liệu nghiên cứu và khảo sát, sử dụng ACN - TFA 0,05% bởi vì pKa của baicalein là 6,76 phù hợp với hệ dung môi này có pH khoảng 2,4 - 2,6. Hơn nữa pH acid sẽ giúp cho baicalein phân cực hơn và có thời gian lưu ngắn hơn. Do đó lựa chọn ACN - TFA 0,05% là pha động phù hợp.

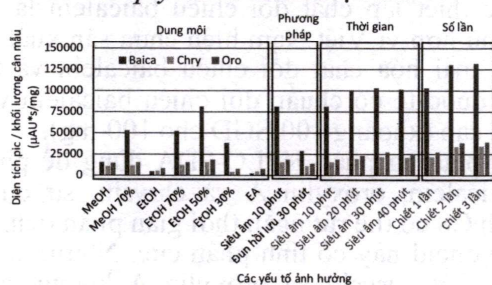
Việc thiết lập chất đối chiếu baicalein là vô cùng phù hợp vì Việt Nam hiện chưa sản xuất và thương mại hóa chất đối chiếu baicalein và thị trường quốc tế có chuẩn đối chiếu baicalein với giá khá cao (khoảng 100 SGD cho 100 mg).

Với phương pháp HPLC-PDA dùng để phân tích baicalein, oroxylin A và chrysin, sử dụng pha tĩnh C8 có thể rút ngắn thời gian phân tích, vì các flavonoid này có tính phân cực. Nhưng thực tế, hai chất chrysin và oroxylin A không tách được bằng cột C8. Do đó, pha tĩnh C18 phù hợp hơn. Sử dụng hệ dung môi ACN - TFA 0,05% với chế độ đẳng dòng, các chất tương tác mạnh với pha tĩnh nên thời gian phân tích kéo dài đến 60 phút, chân pic giãn rộng và hai chất chrysin và oroxylin A chưa thật sự phân tách tốt. Sử dụng chế độ rửa giải gradient đã cải thiện được vương mắc này.



Hình 3. Sắc ký đồ khi phân tách 3 chất baicalein (Baica), chrysin (Chry) và oroxylin A (Oro) trong mẫu núc nác và phổ UV tương ứng của 3 chất bằng các điều kiện sắc ký khác nhau (1→9)

Khảo sát quy trình chuẩn bị mẫu



Hình 4. Các biểu đồ kết quả khảo sát quy trình chiết mẫu

Kết quả khảo sát dung môi cho thấy dung môi là EtOH 50% cho hiệu suất chiết cao nhất (Hình 4) đồng thời khả năng chiết ít các tạp kém phân cực, phù hợp với sắc ký pha đảo hơn. Phương pháp chiết siêu âm cho kết quả tốt hơn phương pháp đun hồi lưu. Hàm lượng các hoạt chất tăng khi tăng thời gian chiết đến 30 phút, không thay đổi nhiều nếu tăng lên 40 phút. Kết quả cũng cho thấy diện tích pic các chất không tăng đáng kể (<1,5%) sau khi chiết 2 lần (Hình 4).

Quy trình định lượng được đánh giá theo hướng dẫn của ICH và AOAC cho thấy đáp ứng phù hợp với các quy định (Bảng 5).

Bảng 5. Kết quả đánh giá quy trình định lượng đồng thời baicalein, chrysin và oroxylin A trong vỏ thân núc nác.

Chỉ tiêu	Yêu cầu		Kết quả		
			Baicalein	Chrysin	Oroxylin A
Tính phù hợp hệ thống	Thời gian lưu (phút)	Trung bình	9,043	14,100	15,286
		RSD < 2%	0.45	0.38	0.35

3 hợp chất phân tích có nhóm -OH tự do ở vị trí số 7 do đó có thể tan trong những dung môi phân cực như MeOH, EtOH hay EtOH-H₂O theo các tỉ lệ khác nhau. Dung môi chiết xuất được lựa chọn là EtOH 50% có khả năng chiết chọn lọc các hợp chất flavonoid này do phù hợp về tính tan và độ phân cực, ngoài ra dung môi này cũng hạn chế hoà tan các tạp kém phân cực khác giúp mẫu thử ít tạp kém phân cực, giúp thời gian khai triển sắc ký được rút gọn hơn. Về phương pháp chiết, các aglycon flavonoid này có trọng lượng phân tử không quá cao, cấu trúc các vòng đơn giản, bền với nhiệt do đó có thể dễ dàng chiết xuất bằng các phương pháp như siêu âm và đun hồi lưu trong thời gian ngắn. Với thời gian siêu âm 20 phút, hàm lượng các chất chiết được tăng lên đáng kể, lần lượt 6,8 - 4,6 - 3,8 lần đối với baicalein, chrysin, oroxylin A, so với đun hồi lưu trong 30 phút. Hàm lượng hoạt chất hầu như không tăng sau khi chiết thêm 10 phút, tỷ lệ gia tăng hàm lượng 3 chất theo thứ tự sau khi siêu âm 30 phút là 2,09, 12,07 và 13,75%, sau đó đồng loạt giảm khi siêu âm 40 phút. Sử dụng sóng siêu âm hình thành các bọt khí siêu nhỏ giúp lôi kéo các hoạt chất ra khỏi tế bào để hòa tan vào dung môi, do vậy đường như hiệu suất chiết đã tăng tới đa đến mức dung môi chiết suất đạt trạng thái bão hòa hoạt chất sau 30 phút, hiệu quả hơn nhiều so với đun hồi lưu. Như vậy, phương pháp siêu âm chiếm ưu thế do hiệu suất chiết cao, ít tổn dung môi và thời gian chiết xuất không quá dài.

Chưa thấy có bài báo công bố về thiết lập chất đối chiếu baicalein. Xây dựng tiêu chuẩn đánh giá nguyên liệu và thiết lập chất đối chiếu baicalein sẽ cung cấp quy trình chuẩn để sản xuất và cung cấp chất đối chiếu baicalein nhằm phục vụ việc nâng cao chất lượng dược liệu núc nác, cũng như góp phần nghiên cứu thành phần hóa học các dược liệu khác có chứa baicalein được dễ dàng hơn nhờ có chuẩn so sánh.

Trên thế giới, các flavonoid trong vỏ thân núc nác đã được nghiên cứu định lượng thường là baicalein và chrysin; các phương pháp định lượng thường áp dụng HPLC-PDA [9] hoặc điện di mao quản [10]. Ngoài ra, chưa có nghiên cứu nào định lượng đồng thời 3 flavonoid chính là baicalein, chrysin và oroxylin A trong vỏ thân núc nác tại Việt Nam nói riêng. Hàm lượng baicalein (2,58%), chrysin (0,46%) và oroxylin A (0,67%) có trong vỏ thân núc nác thu hái tại Bình Phước cao hơn rất nhiều so với trong rễ [9]. Trên sắc ký đồ thu được, 3 hợp chất này chiếm hơn 95% diện tích pic của mẫu thử, do đó việc lựa chọn và xây dựng quy trình định lượng 3 hợp chất này trong vỏ thân núc nác sẽ giảm chi phí nhưng vẫn góp phần nâng cao chất lượng dược liệu và các chế phẩm có nguồn gốc từ núc nác mà hiện nay đang rất phổ biến trên thị trường so với định lượng thêm hispidulin trong rễ núc nác như công bố trước đây [9].

5. Kết luận

Baicalein phân lập từ vỏ thân núc nác đã được tiến hành thiết lập chất đối chiếu theo hướng dẫn ISO Guide 35. Kết quả đã đóng được 100 lọ chuẩn baicalein (10 mg/lọ) đủ điều kiện để đăng ký chuẩn quốc gia với độ tinh khiết được xác định 98,11% (tính theo phần trăm diện tích pic bằng phương pháp HPLC-DAD). Baicalein chuẩn cùng 2 chất tinh khiết phân lập từ núc nác là chrysin và oroxylin A đã được sử dụng để xây dựng quy trình HPLC-PDA định lượng đồng thời 3 thành phần flavonoid trong vỏ thân núc nác. Quy trình đã được thẩm định theo hướng dẫn của ICH và AOAC và đạt yêu cầu nên có thể sử dụng trong việc nâng cao tiêu chuẩn kiểm nghiệm dược liệu vỏ thân núc nác.

Lời cảm ơn: Nhóm tác giả trân trọng cảm ơn Viện Kiểm nghiệm thuốc thành phố Hồ Chí Minh hỗ trợ phần thiết lập chất đối chiếu.

Tài liệu tham khảo

1. Đỗ Huy Bích, Đặng Quang Chung, Bùi Xuân Chương, Nguyễn Thượng Dong, Đỗ Trung Đàm, Phạm Văn Hiến, Vũ Ngọc Lô, Phạm Duy Mai, Phạm Kim Mãn, Đoàn Thị Nhu, Nguyễn Tập, Trần Toàn (2004), *Cây thuốc và động vật làm thuốc ở Việt Nam*, Tập 2, NXB Khoa học và Kỹ thuật, 481-484.
2. Dinda B., SilSarma I., Dinda M., Rudrapaul P. (2015), *Oroxylum indicum* (L.) Kurz, an important Asian traditional medicine: from traditional uses to scientific data for its commercial exploitation, *Journal of Ethnopharmacology*, 161, 255-78.
3. Bộ Y tế (2017), Dược Điển Việt Nam V, Tập 2, 1285-1286.
4. International Organization for Standardization (2017), ISO Guide 35:2017 Reference materials - Guidance for characterization and assessment of homogeneity and stability.
5. International Organization for Standardization (2015), ISO 13528:2015 Statistical methods for use in proficiency testing by interlaboratory comparison, 13 - 30.
6. International Conference on Harmonisation of Technica Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use (ICH) (2005), Validation of analytical procedures: Text and methodology Q2(R1), 1 - 17.
7. Association of Official Analytical Chemists (2012), Appendix K: Guidelines for Dietary Supplements and Botanicals, in *AOAC Official Methods Analysis*, 1-32.
8. Dinda B., Mohanta B. C., Arima S., Sato N., Harigaya Y. (2007). Flavonoids from the stem-bark of *Oroxylum indicum*. *Natural Product Sciences*.13, 190-194.
9. Yadav A., Manika N., Guru B., Madan M. G. (2013), Simultaneous determination of flavonoids in *Oroxylum indicum* by RP-HPLC. *Medicinal Chemistry Research*, 22:2222-2227.
10. Krüger A., Ganzera M. (2014), *Oroxylum indicum* seeds-analysis of flavonoids by micellar electrokinetic chromatography, *Chromatography*, 1(1),1-8.