

XÂY DỰNG VÀ THẨM ĐỊNH QUY TRÌNH ĐỊNH LƯỢNG ĐỒNG THỜI BỐN HỢP CHẤT POLYMETHOXYFLAVON TRONG DƯỢC LIỆU NGẢI ĐEN BẰNG PHƯƠNG PHÁP HPLC

Nguyễn Văn Bình^{1, #}, Nguyễn Thị Vân^{1, #}, Lê Quang Thảo¹, Lê Đình Chi²,
Đỗ Thị Hà³, Đoàn Cao Sơn^{1, *}

¹Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương; ²Trường Đại học Dược Hà Nội;

³Viện Dược liệu

[#]: Đồng tác giả chính

*Email: doancaoson.nidqc@gmail.com

(Nhận bài ngày 17 tháng 02 năm 2023)

Tóm tắt

Ngải đen (*Kaempferia parviflora* Wall. Ex Baker) là một loài cây thân thảo thuộc họ Gừng (Zingiberaceae). Thành phần chính tạo nên hoạt tính sinh học của ngải đen là các polymethoxyflavon, trong đó, bốn hợp chất gồm 5,7-dimethoxyflavon (DMF); 3,5,7-trimethoxyflavon (3,5,7-TMF); 5,7,4'-trimethoxyflavon (5,7,4'-TMF) và 3,5,7,4'-tetramethoxyflavon (TTMF) được lựa chọn làm chất đánh dấu định tính và định lượng cho dược liệu ngải đen. Các polymethoxyflavon được chiết từ thân rễ ngải đen và định lượng đồng thời bằng phương pháp sắc ký lỏng pha đảo (RP-HPLC) sử dụng cột C₁₈ (4,6 mm x 250 mm, 5 µm), detector UV (264 nm) với hệ pha động gồm methanol và nước rửa giải theo chương trình gradient. Phương pháp được thẩm định theo hướng dẫn của ICH-(Q2R1) và AOAC 2016 với độ đặc hiệu phù hợp, độ chính xác cao, độ đúng tốt, khoảng tuyến tính rộng. Quy trình phân tích được ứng dụng để định lượng đồng thời bốn hợp chất polymethoxyflavon trong năm mẫu ngải đen thu hái tại các vùng khác nhau của Việt Nam. Kết quả cho thấy tổng hàm lượng bốn hợp chất polymethoxyflavon nằm trong khoảng từ 3,03% đến 3,91% (kl/kl). Cụ thể, hàm lượng DMF nằm trong khoảng từ 0,85% đến 1,49%; hàm lượng 5,7,4'-TMF nằm trong khoảng từ 1,07% đến 1,47%; hàm lượng 3,5,7-TMF nằm trong khoảng từ 0,24% đến 0,37% và hàm lượng TTMF nằm trong khoảng từ 0,56% đến 0,74%.

Từ khóa: 5,7-dimethoxyflavon, 3,5,7-trimethoxyflavon, 5,7,4'-trimethoxyflavon, 3,5,7,4'-tetramethoxyflavon, Ngải đen, *Kaempferia parviflora*, Định lượng, RP-HPLC.

Summary

Development and Validation of Simultaneous Quantitative Analysis of Four Methoxyflavones from Rhizoma of *Kaempferia parviflora* Wall. Ex. Baker by HPLC

Kaempferia parviflora Wall. Ex Baker (KP) is an herbaceous plant belonging to the Zingiberaceae family. The major bioactive components of KP rhizoma, 5,7-dimethoxyflavone (DMF), 3,5,7-trimethoxyflavone (3,5,7-TMF), 5,7,4'-trimethoxyflavone (5,7,4'-TMF) and 3,5,7,4'-tetramethoxyflavone (TTMF), were chosen as the quantitative and qualitative markers for this plant material. These polymethoxyflavones (PMFs) were extracted from KP rhizomes and analysed simultaneously by RP-HPLC with DAD detector. The method was carried out on a C₁₈ column (4,6 mm x 250 mm, 5 µm), detector UV (264 nm), using methanol-water mixture as the mobile phase. The developed method has been illustrated to satisfy the requirements of specificity, system suitability, linearity, accuracy, and precision (repeatability and intermediate precision) according to ICH-(Q2R1) and AOAC 2016 guidelines. The method was applied to determine these PMFs in five samples of KP collected in various regions of Vietnam. Results showed that the content of four polymethoxyflavones in KP was from 3.03% to 3.91% (w/w). As follows, the content of DMF was from 0.85% to 1.49%; 5,7,4'-TMF was from 1.07% to 1.47%; 3,5,7-TMF was from 0.24% to 0.37%; and TTMF was from 0.56% to 0.74%.

Keywords: 5,7-dimethoxyflavone, 3,5,7-trimethoxyflavone, 5,7,4'-trimethoxyflavone, 3,5,7,4'-tetramethoxyflavone, *Kaempferia parviflora*, Quantitation, RP-HPLC.

1. Đặt vấn đề

Ngải đen có tên khoa học là *Kaempferia parviflora* Wall. Ex. Baker, họ Gừng (Zingiberaceae), là một loài cây lâu năm. Cây phân bố chủ yếu ở Ấn Độ, Trung Quốc, Malaysia, Thái Lan và Lào [1]. Ở Việt Nam loài này mới được phát hiện ở các tỉnh Đắk Lắk, Gia Lai và Thanh Hóa [2]. Các nghiên cứu về hoạt tính sinh học cho thấy loài *Kaempferia parviflora* có nhiều tác dụng như tăng cường sinh lý [3]; chống viêm [4]; kháng khuẩn [5]; kháng nấm [6]; kháng virus [7]; chống dị ứng [8], chống ung thư [9], bảo vệ tế bào dạ dày [10], bảo vệ tim mạch [11],... Các nghiên cứu về thành phần hóa học và tác dụng dược lý đã chỉ ra rằng nhóm chất chính tạo nên các tác dụng sinh học của ngải đen là các dẫn xuất 7-methoxyflavon [12], trong đó chiếm tỷ lệ

tương đối lớn là 5,7-dimethoxyflavon; 3,5,7-trimethoxyflavon; 5,7,4'-trimethoxyflavon và 3,5,7,4'-tetramethoxyflavon [13].

Với các tác dụng sinh học quan trọng kể trên, ngải đen rất có tiềm năng được sử dụng rộng rãi làm thuốc đông dược cũng như thực phẩm bảo vệ sức khỏe. Các sản phẩm từ ngải đen trên thị trường hiện nay khá phong phú và đa dạng về dạng bào chế như dược liệu, bột, rượu, viên nang. Do đó việc kiểm soát chất lượng dược liệu ngải đen đóng vai trò rất quan trọng. Tuy nhiên hiện nay tại Việt Nam có rất ít nghiên cứu về ngải đen, chủ yếu là các nghiên cứu về thành phần hóa học và tác dụng sinh học của cây mà chưa có nghiên cứu nào về phương pháp định lượng các hoạt chất chính trong dược liệu ngải đen.

Để kiểm soát chất lượng dược liệu ngải đen,

nhóm nghiên cứu đã tiến hành xây dựng và thẩm định quy trình định lượng đồng thời 5,7-dimethoxyflavon, 3,5,7-trimethoxyflavon; 5,7,4'-trimethoxyflavon và 3,5,7,4'-tetramethoxyflavon trong dược liệu ngải đen bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao.

2. Đối tượng, nguyên vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Đối tượng nghiên cứu

Mẫu ngải đen được thu hái tại các vùng khác nhau của Việt Nam (Bảng 3), được định danh tại Trung tâm Tài nguyên Dược liệu, Viện Dược liệu. Mẫu sau khi định danh được thu lấy phần thân rễ, rửa sạch bằng nước, thái lát, sấy khô ở 55°C.

2.2. Nguyên vật liệu nghiên cứu

Thiết bị nghiên cứu: Các thiết bị, dụng cụ đã được hiệu chuẩn, đáp ứng yêu cầu của ISO/IEC 17025 và GLP, bao gồm:

- Hệ thống sắc ký lỏng hiệu năng cao kết nối detector PDA (Hãng sản xuất: Waters, xuất xứ: Mỹ).

- Cột sắc ký C₁₈ (4,6 x 250 mm, 5 µm) (Hãng sản xuất: Phenomenex, xuất xứ: Mỹ)

- Cân phân tích Mettler MS105, độ chính xác 0,01 mg (Hãng sản xuất: Mettler Toledo, xuất xứ: Thụy Sĩ).

- Cân phân tích Mettler Toledo XPE26, độ chính xác 0,001 mg (Hãng sản xuất: Mettler Toledo, xuất xứ: Thụy Sĩ).

- Các thiết bị, dụng cụ khác: máy lắc siêu âm, bếp từ gia nhiệt, bể điều nhiệt, các dụng cụ thủy tinh chính xác class A

Chất chuẩn và dung môi:

- Chất chuẩn: 5,7-dimethoxyflavon (C₁₇H₁₄O₄), hàm lượng: 99,95% (nguyên trạng), số lô: PRF20082101 của Phytopurify; 3,5,7-trimethoxyflavon (C₁₈H₁₆O₅), hàm lượng 99,76% (nguyên trạng), số lô: 238220601 của Tokiwa; 5,7,4'-trimethoxyflavon (C₁₈H₁₆O₅), hàm lượng 99,7% (nguyên trạng), số lô: PRF21101503 của Phytopurify và 3,5,7,4'-tetramethoxyflavon (C₁₉H₁₈O₆), hàm lượng 98,0% (nguyên trạng), số lô: CFS202001 của Chemfaces.

- Dung môi: Methanol (HPLC) của Merck, Ethanol (PA) của Công ty Cổ phần Hóa dược Việt Nam, nước RO của Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương.

2.3. Phương pháp nghiên cứu

2.3.1. Điều kiện sắc ký:

Qua tham khảo các nghiên cứu đã được công bố [13],[14], một số điều kiện sắc ký sau được cô định: Cột sắc ký Phenomenex C₁₈ (250 mm x 4,6 mm; 5 µm) duy trì ở 35°C trong quá trình chạy sắc ký, detector PDA, tốc độ dòng pha động: 1,0 ml/phút, thể tích tiêm mẫu: 10 µl.

Bước sóng phát hiện, thành phần pha động và chế độ rửa giải được khảo sát để lựa chọn được điều kiện tối ưu cho việc phân tích đồng thời 4 chất DMF; 5,7,4'-TMF; 3,5,7-TMF và TTMF trong dược liệu ngải đen.

2.3.2. Quy trình xử lý mẫu:

Quy trình chiết các flavon từ dược liệu ngải đen gồm các giai đoạn sau:

- Đồng nhất mẫu bằng cách xay, nghiền cơ học, rây qua rây 355.

- Chiết các flavon bằng dung môi chiết thích hợp (thành phần dung môi chiết, nhiệt độ, thời gian chiết được khảo sát và trình bày cụ thể trong phần kết quả và bàn luận)

- Chuyển dịch chiết vào bình định mức 100 ml, thêm dung môi vừa đủ thể tích, lắc đều, lọc qua màng lọc 0,45 µm để tiêm sắc ký.

2.3.3. Chuẩn bị mẫu:

- Các dung dịch chuẩn: Các dung dịch chuẩn gốc DMF; 3,5,7-TMF; 5,7,4'-TMF và TTMF có nồng độ chính xác khoảng 0,5 mg/ml được chuẩn bị trong methanol, bảo quản ở nhiệt độ 2 - 8°C, tránh ánh sáng. Các dung dịch chuẩn hỗn hợp sử dụng cho quá trình khảo sát được chuẩn bị bằng cách pha loãng chính xác các dung dịch chuẩn gốc bằng dung môi pha mẫu cho tới khi thu được dung dịch có nồng độ thích hợp và sử dụng ngay sau khi pha.

- Dung dịch thử: được chuẩn bị theo quy trình xử lý mẫu.

- Để đánh giá độ đúng, chất chuẩn được thêm vào khoảng 0,5 g dược liệu đã biết hàm lượng của các chất phân tích (mẫu sử dụng đánh giá độ lặp lại ở Bảng 2) sao cho lượng chuẩn thêm vào với từng chất tương ứng với 3 mức nồng độ khác nhau tính trong dược liệu (cụ thể ở Bảng 2), rồi tiến hành như quy trình xử lý mẫu với 3 mẫu thêm chuẩn được chuẩn bị ở mỗi mức nồng độ.

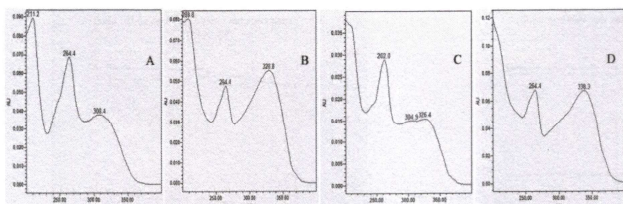
- Với mỗi chất phân tích, LOQ của phương pháp được xác định đồng thời với khảo sát khoảng tuyến tính, đảm bảo để trên dung dịch chuẩn hỗn hợp có nồng độ thấp nhất của đường chuẩn và dung dịch thử có nồng độ chất phân tích xấp xỉ mức nồng độ này, pic sắc ký thu được có giá trị S/N không dưới 10. Từ giá trị LOQ, giá trị LOD được ngoại suy bằng cách chia mức nồng độ LOQ cho 3,3.

3. Kết quả và bàn luận

3.1. Khảo sát lựa chọn điều kiện sắc ký

3.1.1. Lựa chọn bước sóng phát hiện:

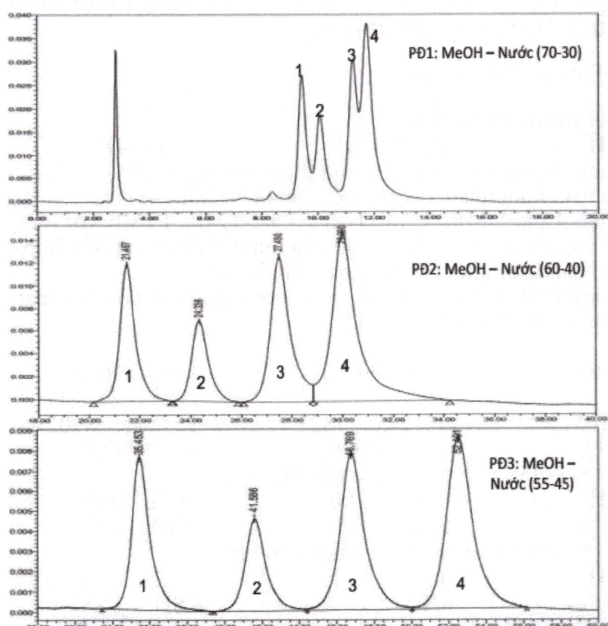
Thực hiện quét phổ UV dung dịch chuẩn đơn của bốn chất ở dải bước sóng 200-400 nm. Kết quả cho thấy cả bốn chất đều có đỉnh hấp thụ cực đại trong khoảng bước sóng 262 nm - 265 nm (Hình 1). Do đó bước sóng 264 nm được lựa chọn để ghi lại sắc ký đồ.



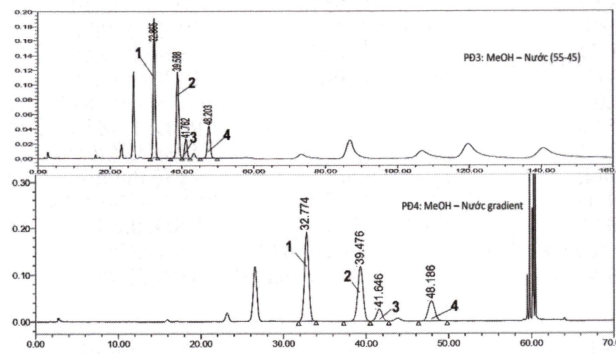
Hình 1. Hình ảnh quét phổ các dung dịch chuẩn DMF (A); 5,7,4'-TMF (B); 3,5,7-TMF (C) và TTMF (D)

3.1.2. Lựa chọn pha động:

Dựa vào tính chất lý hóa của bốn chất cần phân tích kết hợp với tham khảo các tài liệu nghiên cứu được, nhóm nghiên cứu lựa chọn pha động gồm methanol và nước với các tỷ lệ khác nhau, chương trình rửa giải đẳng dòng để tiến hành khảo sát ban đầu. Kết quả thu được như sau:



Hình 2. Kết quả khảo sát lựa chọn pha động trên mẫu chuẩn (1: pic DMF; 2: pic 5,7,4'-TMF; 3: pic 3,5,7-TMF; 4: pic TTMF)



Hình 3. Kết quả khảo sát lựa chọn pha động trên mẫu thử (1: pic DMF; 2: pic 5,7,4'-TMF; 3: pic 3,5,7-TMF; 4: pic TTMF)

Kết quả khảo sát cho thấy với pha động 3 (methanol - nước tỷ lệ 55 - 45), các pic tách khỏi nhau hoàn toàn, hình dạng các pic cân đối (Hình 2).

Tuy nhiên, khi phân tích mẫu thử với pha động 3, sau khi rửa giải hết 4 pic chất cần phân tích, xuất hiện nhiều pic tạp, để rửa giải hết pic tạp thời gian phân tích kéo dài (khoảng 160 phút). Khi chuyển chương trình gradient (Bảng 1) để rửa các pic tạp, thời gian phân tích rút ngắn còn 70 phút (Hình 3).

Sau khi khảo sát và đánh giá các chương trình, chúng tôi lựa chọn chương trình phân tích như sau:

Điều kiện sắc ký:

- Máy sắc ký lỏng hiệu năng cao Waters kết nối detector PDA;
- Cột sắc ký Phenomenex C₁₈ (4,6 mm x 250 mm, 5 μ m);
- Nhiệt độ cột: 35°C;
- Pha động: Methanol: nước, rửa giải theo chương trình gradient.

Bảng 1. Chương trình gradient dung môi

Thời gian (phút)	MeOH (% , tt/tt)	Nước (% , tt/tt)
0 - 55	55	45
55 - 60	95	5
60 - 70	55	45

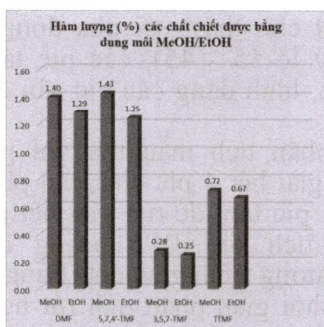
- Tốc độ dòng: 1,0 ml/phút;
- Bước sóng phát hiện: 264 nm;
- Thể tích tiêm mẫu: 10 μ l.

3.2. Khảo sát lựa chọn điều kiện xử lý mẫu

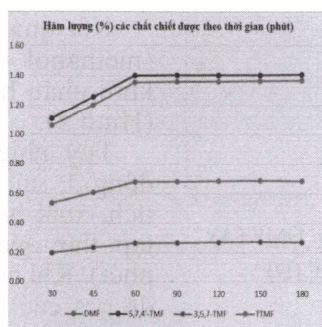
Để chiết được tối đa bốn chất DMF; 5,7,4'-TMF; 3,5,7-TMF và TTMF, dựa trên tham khảo các nghiên cứu đã được công bố [13],[14], nhóm nghiên cứu lựa chọn khảo sát với hai dung môi chiết là ethanol và methanol, kết quả cho thấy dung môi methanol cho hiệu quả chiết tốt hơn (Hình 4).

Khảo sát thời gian chiết với phương pháp chiết hồi lưu bằng methanol ở nhiệt độ 70°C, tỷ lệ được liệu: dung môi là 1:25, kết quả thực nghiệm cho thấy thời gian chiết tối ưu là 60 phút (Hình 5).

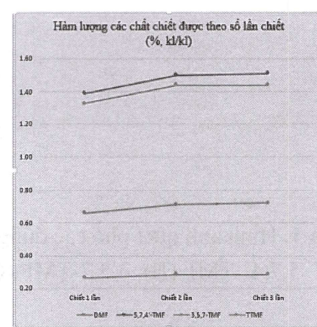
Khảo sát số lần chiết với phương pháp chiết hồi lưu bằng methanol ở nhiệt độ 70°C, tỷ lệ được liệu: dung môi là 1:25, mỗi lần chiết 60 phút. Kết quả cho thấy với cả 4 chất phân tích, hàm lượng chất chiết được sau khi chiết 3 lần chênh lệch không quá 1% so với chiết 2 lần (Hình 6). Do đó lựa chọn chiết 2 lần phù hợp hơn cho phân tích thường quy.



Hình 4. Kết quả khảo sát chiết soxhlet với hai dung môi methanol và ethanol



Hình 5. Kết quả khảo sát thời gian chiết



Hình 6. Kết quả khảo sát số lần chiết

Dựa trên kết quả khảo sát, nhóm nghiên cứu lựa chọn phương pháp xử lý mẫu như sau:

Cân 1,0 g bột dược liệu, chiết hồi lưu với methanol ở 70°C 2 lần, mỗi lần 25 ml dung môi, thời gian chiết 60 phút. Gộp dịch chiết và dịch rửa vào bình định mức 100,0 ml; thêm dung môi

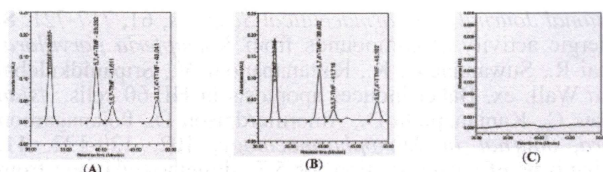
vừa đủ đến vạch, lắc đều, lọc qua màng lọc 0,45 µm, lấy dịch lọc để tiêm sắc ký.

3.3. Thẩm định quy trình phân tích

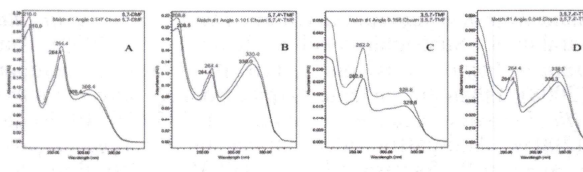
Quy trình phân tích đã được thẩm định đầy đủ theo hướng dẫn của ICH [15], kết quả thẩm định được trình bày trong Bảng 2.

Bảng 2. Tóm tắt kết quả thẩm định quy trình phân tích

Chỉ tiêu thẩm định	Đối tượng phân tích			
	DMF	5,7,4'-TMF	3,5,7-TMF	TTMF
Đặc hiệu	- Sắc ký đồ của dung dịch chuẩn hỗn hợp: bốn pic theo thứ tự rửa giải lần lượt là DMF; 5,7,4'-TMF; 3,5,7-TMF; TTMF được tách hoàn toàn khỏi nhau, các pic đều cân đối (hình 7-A). - Sắc ký đồ của dung dịch thử: xuất hiện 4 pic DMF; 5,7,4'-TMF; 3,5,7-TMF; TTMF với thời gian lưu và phổ UV (Hình 8) tương ứng với các pic trên sắc ký đồ của dung dịch chuẩn hỗn hợp, các pic tách khỏi nhau hoàn toàn và tách hoàn toàn khỏi các pic khác (Hình 7-B). - Sắc ký đồ của placebo (dung môi) không xuất hiện các pic tại vị trí tương ứng với bốn pic chất phân tích trên sắc ký đồ của dung dịch chuẩn hỗn hợp (Hình 7-C).			
Khoảng tuyến tính				
- Khoảng nồng độ (µg/ml)	7,50 - 374,93	7,47 - 373,68	2,00 - 99,92	3,93 - 196,25
- Phương trình hồi quy	$y = 51672x + 13202$	$y = 38404x + 10515$	$y = 44528x + 1823$	$y = 35754x + 8902$
- Hệ số tương quan	$r = 0,99999$	$r = 0,99999$	$r = 0,99999$	$r = 0,99999$
Độ lặp lại (Thực hiện phân tích 6 lần trên mẫu thử)	Hàm lượng trên mẫu (% kl/kl), tính theo dược liệu khô kiệt			
	1,45 ± 0,02 RSD: 1,20%	1,49 ± 0,01 RSD: 0,88%	0,29 ± 0,00 RSD: 1,46%	0,73 ± 0,01 RSD: 1,53%
Độ chính xác trung gian (So sánh kết quả 6 lần phân tích đánh giá độ lặp lại với 6 lần phân tích độc lập khác ngày)	Hàm lượng trên mẫu (% kl/kl), tính theo dược liệu khô kiệt			
	1,43 ± 0,03 RSD: 1,77 %	1,47 ± 0,03 RSD: 1,80 %	0,29 ± 0,01 RSD: 1,97 %	0,72 ± 0,01 RSD: 1,85 %
	(Yêu cầu về độ chính xác theo AOAC [16]: ở mức hàm lượng 0,1% - 1,0% cho phép RSD ≤ 2,7%, ở mức hàm lượng 1,0% - 10,0% cho phép RSD ≤ 1,9 %)			
Độ đúng				
	- Mức 1: 0,15% Tỷ lệ thu hồi: 98,20%- 99,44% RSD: 0,68% - Mức 2: 1,5% Tỷ lệ thu hồi: 99,81%- 100,54% RSD: 0,36% - Mức 3: 2,7% Tỷ lệ thu hồi: 98,97%- 100,16% RSD: 0,67 %	- Mức 1: 0,15 % Tỷ lệ thu hồi: 98,17% - 98,87% RSD: 0,39% - Mức 2: 1,5% Tỷ lệ thu hồi: 99,94%-101,03 % RSD: 0,55 % - Mức 3: 2,7% Tỷ lệ thu hồi: 100,27%-101,19% RSD: 0,50 %	- Mức 1: 0,04 % Tỷ lệ thu hồi: 97,33% - 97,95% RSD: 0,34% - Mức 2: 0,4% Tỷ lệ thu hồi: 98,42%- 100,39% RSD: 1,12 % - Mức 3: 0,72 % Tỷ lệ thu hồi: 98,10% - 99,75 % RSD: 0,91 %	- Mức 1: 0,08% Tỷ lệ thu hồi: 97,10% - 98,54% RSD: 0,78% - Mức 2: 0,8% Tỷ lệ thu hồi: 99,33%-101,81% RSD: 1,38 % - Mức 3: 1,44 % Tỷ lệ thu hồi: 99,17%-100,82% RSD: 0,88 %
	(Yêu cầu về độ thu hồi theo AOAC [16]: tỷ lệ thu hồi cho phép ở mức 0,01% - 0,1% là 95% - 105%, RSD ≤ 3,7%; ở mức 0,1% - 1% là 97% - 103%, RSD ≤ 3,7%; ở mức 1% - 10% là 98% - 102%, RSD ≤ 1,9 %)			
Giới hạn định lượng (LOQ) trong dung dịch tiêm sắc ký	7,50 µg/ml	7,47 µg/ml	2,00 µg/ml	3,93 µg/ml
Giới hạn định lượng (LOQ) trong mẫu dược liệu	0,075%	0,075%	0,020%	0,039%



Hình 7. Sắc ký đồ của (A). Dung dịch chuẩn hỗn hợp; (B). Dung dịch thử; (C). Placebo



Hình 8. Kết quả chồng phổ định tính 4 chất DMF (A); 5,7,4'-TMF (B); 3,5,7-TMF (C) và TTMF (D) giữa mẫu chuẩn hỗn hợp và mẫu thử

Kết quả thẩm định cho thấy quy trình đã xây dựng đạt yêu cầu về độ đặc hiệu, khoảng tuyến tính rộng với cả bốn chất DMF; 5,7,4'-TMF; 3,5,7-TMF và 3,5,7,4'-TTMF; độ đúng, độ chính xác đáp ứng được mức quy định cho phép của AOAC, do đó quy trình thích hợp để

định lượng đồng thời bốn chất này trong dược liệu ngải đen.

3.4. Ứng dụng quy trình

Quy trình phân tích đã được áp dụng để phân tích trên năm mẫu dược liệu ngải đen thu hái tại các vùng khác nhau (Bảng 3).

Bảng 3. Kết quả xác định hàm lượng DMF; 5,7,4'-TMF; 3,5,7-TMF và TTMF trong một số mẫu ngải đen

STT	Mã mẫu	Nơi thu hái	Thời điểm thu hái	Hàm lượng (% kl/kl, tính theo dược liệu khô kiệt)				
				DMF	5,7,4'-TMF	3,5,7-TMF	TTMF	Tổng
1	NĐ01	Pù Luông, Thanh Hóa	27/08/2022	1,43 ± 0,03	1,47 ± 0,03	0,29 ± 0,01	0,72 ± 0,01	3,91 ± 0,07
2	NĐ02	Tĩnh Biên, An Giang	05/04/2022	0,85 ± 0,01	1,07 ± 0,01	0,37 ± 0,01	0,74 ± 0,01	3,03 ± 0,02
3	NĐ03	Ea Súp, Đắk Lắk	22/03/2022	1,37 ± 0,02	1,46 ± 0,01	0,24 ± 0,00	0,66 ± 0,01	3,72 ± 0,03
4	NĐ04	Yên Bái	21/02/2022	1,42 ± 0,01	1,22 ± 0,01	0,29 ± 0,00	0,59 ± 0,01	3,51 ± 0,03
5	NĐ05	Eakar, Đắk Lắk	04/03/2022	1,49 ± 0,01	1,43 ± 0,02	0,34 ± 0,01	0,56 ± 0,01	3,82 ± 0,02

Kết quả phân tích cho thấy, trong 5 mẫu thu thập được, hàm lượng DMF và 5,7,4'-TMF cao hơn hẳn so với 3,5,7-TMF và TTMF. Có sự khác biệt về hàm lượng từng chất polymethoxyflavon và tổng hàm lượng bốn chất giữa các mẫu được thu hái tại các vùng khác nhau. Cụ thể, mẫu NĐ01 có tổng hàm lượng bốn chất cao nhất (3,91%), sau đó lần lượt là các mẫu NĐ05 (3,82%), NĐ03 (3,72%), NĐ04 (3,51%), và thấp nhất là mẫu NĐ02 (3,03%).

4. Kết luận

Sử dụng kỹ thuật chiết hồi lưu trong methanol và phân tích bằng phương pháp HPLC, phương pháp đã xây dựng cho phép định lượng đồng thời bốn chất 5,7-dimethoxyflavon; 5,7,4'-trimethoxyflavon; 3,5,7-trimethoxyflavon và 3,5,7,4'-tetramethoxyflavon trong dược liệu ngải đen (*Kaempferia parviflora*). Quy trình đã

được thẩm định đạt yêu cầu theo hướng dẫn của ICH [15] và AOAC 2016 [16], có độ đặc hiệu phù hợp, độ chính xác cao, độ đúng tốt, khoảng tuyến tính rộng. Quy trình phù hợp để triển khai đánh giá hàm lượng bốn chất kể trên trong dược liệu ngải đen với số lượng mẫu lớn để có kết quả mang tính đại diện.

Quy trình đã được ứng dụng để phân tích 5 mẫu dược liệu ngải đen thu hái tại các vùng khác nhau của Việt Nam. Kết quả cho thấy cả 5 mẫu đều có hàm lượng bốn chất 5,7-dimethoxyflavon; 5,7,4'-trimethoxyflavon; 3,5,7-trimethoxyflavon và 3,5,7,4'-tetramethoxyflavon cao hơn so với mẫu *Kaempferia parviflora* thu hái tại tỉnh Loei, Thái Lan theo công bố của K. Ninomiya và cs. năm 2015 (PMF: 0,549%; 5,7,4'-TMF: 0,838%; 3,5,7-TMF: 0,087% và TTMF: 0,296%) [13].

Tài liệu tham khảo

- Okabe Y., Shimada T., Horikawwa T., Kinoshita K., Kovama K., Ichinose K., Aburada M., Takahashi K. (2014). Suppression of adipocyte hypertrophy by polymethoxyflavonoids isolated from *Kaempferia parviflora*, *Phytomedicine*, 21(6), 800-806.
- Bùi Kim Anh, Đoàn Duy Tiên, Phạm Gia Điền, Hồ Đắc Hùng, Phạm Quang Dương, Vũ Đình Hoàng (2017), Bước đầu nghiên cứu thành phần hóa học và hoạt tính sinh học củ Ngải đen, *Tạp chí Dược liệu*, 22, 24-29.
- Chaturapanich G., Chaiyakul S., Verawatnapakul V., Pholpramool C. (2008), Effects of *Kaempferia parviflora* extracts on reproductive parameters and spermatid blood flow in male rats, *Reproduction*, 136, 515-522.
- Sae-Wong C., Matsuda H., Tewtrakul S., Tansakul P., Nakamura S., Nomura Y., Yoshikawa M. (2011), Suppressive effects of methoxyflavonoids isolated from *Kaempferia parviflora* on inducible nitric oxide synthase (iNOS) expression in RAW 264.7 cells, *Journal of Ethnopharmacology*, 136(3), 488-495.
- Wattanapitayakul S. K., Suwatronnakhorn M., Chularojmontri L., Herunsalee A., Niamsakul S., Charuchongkolwongse S., Chansuvanich N. (2007), *Kaempferia parviflora* ethanolic extract promoted nitric oxide production in human umbilical vein endothelial cells, *Journal of Ethnopharmacology*, 110, 559-562.
- Kumme S., Tewtrakul S., Subhadhirasakul S. (2008), Antimicrobial activity of the ethanol extract and compounds from the rhizomes of *Kaempferia parviflora*, *Songklanakarin Journal of Science & Technology*, 30.
- Sookkongwaree K., Geitmann M., Roengsumran S., Petsom A., Danielson U. H. (2006), Inhibition of viral proteases by Zingiberaceae extracts and flavones

isolated from *Kaempferia parviflora*, *Die Pharmazie-An International Journal of Pharmaceutical Sciences*, 61, 717-721. 8. Tewtrakul S., Subhadhirasakul S., Kummee S. (2008), Anti-allergic activity of compounds from *Kaempferia parviflora*, *Journal of Ethnopharmacology*, 116, 191-193. 9. Banjerdpongchai R., Suwannachot K., Rattanapanone V., Sripandikulchai B. (2008), Ethanolic rhizome extract from *Kaempferia parviflora* Wall. ex. Baker induces apoptosis in HL-60 cells, *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 9, 595-600. 10. Rujjanawate C., Kanjanapothi D., Amornlerdpison D., Pojanagaroon S. (2005), Anti-gastric ulcer effect of *Kaempferia parviflora*, *Journal of Ethnopharmacology*, 102, 120-122. 11. Tepareenan P., Sawasdee P., Randall M. (2010), Possible mechanisms of vasorelaxation for 5,7-dimethoxyflavone from *Kaempferia parviflora* in the rat aorta, *Phytotherapy Research*, 24, 1520-1525. 12. Azuma T., Tanaka Y., Kikuzaki H. (2008), Phenolic glycosides from *Kaempferia parviflora*, *Phytochemistry*, 69, 2743-2748. 13. Ninomiya K., Matsumoto T., Chaipetch S., Miyake S., Katsuyama Y., Tsuboyama A., Pongpiriyadacha Y., Hayakawa T., Muraoka O., Morikawa T. (2015), Simultaneous quantitative analysis of 12 methoxyflavones with melanogenesis inhibitory activity from the rhizomes of *Kaempferia parviflora*, *Journal of Natural Medicines*, 70(2), 179-189. 14. Joothamongkhon J., Susantikarn P., Kongkachana W., Ketngamkum Y., Batthong S., Jomchai N., Yingyong P., Asawapirom U., Tangphatsornruang S., Paemanee A., Pongpamorn P. (2022), Quantitative analysis of methoxyflavones discriminates between the two types of *Kaempferia parviflora*, *Phytochemical Analysis*, 33, 670-677. 15. ICH (2018), *Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology*, Q2R1. 16. AOAC (2016), *Guidelines for Standard Method Performance Requirements*, Appendix F.

Tạp chí Dược liệu, tập 28, số 5/2023 (Trang 292 - 298)

ĐỊNH LƯỢNG ĐỒNG THỜI RUTIN VÀ QUERCETIN-7-O-GLUCOSID TRONG TRÀ HOA VÀNG BẰNG PHƯƠNG PHÁP UV-VIS KẾT HỢP MẠNG NƠI RON NHÂN TẠO (ANN)

Phạm Thị Hiền¹, Tạ Thị Thảo², Nguyễn Thị Hằng¹, Đỗ Thị Hà¹, Bùi Thị Bình³, Nguyễn Thị Hà Ly^{1,*}

¹Khoa Hóa phân tích - Tiêu chuẩn, Viện Dược liệu;

²Khoa Hóa học, Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội;

³Khoa Dược, Trường Đại học Y Dược Thái Bình

*Email: nguyenthihally.chem@gmail.com

(Nhận bài ngày 01 tháng 3 năm 2023)

Tóm tắt

Trong nghiên cứu này, chúng tôi xây dựng một phương pháp phân tích định lượng đồng thời rutin và quercetin 7-O-glucosid trong trà hoa vàng dựa trên dữ liệu phổ UV-VIS trong khoảng từ 250-400 nm. Mẫu trà hoa vàng được chiết bằng hỗn hợp dung môi methanol/nước (50/50, v/v), sau đó phân tích dữ liệu phổ UV-VIS và kết hợp phương pháp mạng nơ ron nhân tạo (ANN). Sau khi tối ưu hóa và lựa chọn được mô hình ANN phù hợp, với 2 lớp ẩn và 20 neuron trong mỗi lớp ẩn, các giá trị R² thu được đều lớn hơn 0,99. Phương pháp UV-VIS/ANN đề xuất được áp dụng để phân tích hàm lượng rutin và quercetin 7-O-glucosid trong 10 mẫu trà hoa vàng. Kết quả thu được tương đồng với kết quả phân tích hàm lượng rutin và quercetin 7-O-glucosid bằng phương pháp đối chiếu HPLC-DAD. Phương pháp UV-VIS/ANN với các ưu điểm nhanh, đơn giản, độ chính xác cao, phù hợp để áp dụng cho phân tích định lượng đồng thời rutin và quercetin 7-O-glucosid trong mẫu trà hoa vàng.

Từ khóa: Trà hoa vàng, UV-VIS/ANN, Flavonoid, HPLC.

Summary

Simultaneous Quantification of Rutin and Quercetin-7-O-Glucoside in *Camellia* sp. by UV-VIS Spectrophotometry and Artificial Neuronal Networks (ANN)

A simple method for the simultaneous determination of rutin and quercetin 7-O-glucoside contents in *Camellia* sp. was reported. The method was based on the use of UV-VIS absorption in the range of 250-400 nm. *Camellia* sp. samples were extracted with methanol/water (50/50, v/v); then the solutions were analyzed by spectroscopy combined artificial neuronal networks (ANN) method. After calibration, the ANN model with two hidden layers and 20 neurons in the hidden layer had high accuracy with correlation coefficients (R²) > 0.99. The UV-VIS/ANN proposed model was applied to analyze rutin and quercetin 7-O-glucoside contents in 10 samples of *Camellia* sp. The results are similar in comparison to those obtained employing the reference method (HPLC-DAD). The proposed (UV-VIS/ANN) method is rapid, simple, and highly accurate and it facilitates simultaneous determination of rutin and quercetin 7-O-glucoside contents in *Camellia* sp.

Keywords: *Camellia* sp., UV-VIS/ANN, Flavonoid, HPLC.

1. Đặt vấn đề

Trà hoa vàng (Yellow *Camellia*) là tên gọi chung cho các loài có hoa màu vàng, thuộc chi Trà (*Camellia* L.), họ Chè (Theaceae). Trên thế giới, chi này có khoảng 120 loài, riêng ở Trung Quốc có 79 loài [1]. Ở Việt Nam, chi *Camellia* L. có 45 loài, trong đó có nhiều loài được công bố là loài mới cho khoa học và đặc hữu của Việt Nam [2]. Riêng ở VQG Tam Đảo đã phát hiện thấy 7 loài, nơi đây được coi là vùng tập trung nhiều loài trà hoa vàng ở nước ta [3]. Việc sử dụng các

loài trà hoa vàng làm thuốc ở Việt Nam, về cơ bản mới dừng ở vốn kinh nghiệm của người dân, với công dụng kích thích tiêu hóa (lá nấu nước uống như nước Chè), chữa lỵ (rễ)... Năm 2016, nhóm tác giả [4] đã thử tác dụng gây độc tế bào trên *in vitro* dịch chiết methanol trà hoa vàng *C. chrysanthoides* thu hái tại Ba Trẽ, Quảng Ninh. Kết quả cho thấy mẫu trà hoa vàng nghiên cứu có tác dụng ức chế trung bình với tế bào ung thư gan (Hep-G2), ung thư vú (MDA-BA-231) và ung thư trực tràng (SW 480), tác dụng thấp trên dòng