

Thiết lập chất chuẩn đối chiếu và định lượng pinostrobin trong củ Ngải bún (*Boesenbergia pandurata*)

Nguyễn Trung Nhân, Đỗ Văn Nhật Trường*, Đỗ Thị Phú An, Nguyễn Thị Thanh Mai



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

TÓM TẮT

Củ Ngải bún có tên khoa học là *Boesenbergia pandurata* Roxb. Schltr., thuộc họ Gừng (Zingiberaceae), là một trong những loài dược liệu của Đông Nam Á. Đây là loại cây sống lâu năm, thân ngắn, do bề lá hình thành và có thể cao tới 50 cm. Lá rộng 7–11 cm và dài 25–50 cm. Bề mặt bên ngoài củ Ngải bún có màu nâu nhạt, bên trong có màu vàng, hình bầu dục, có mùi rất thơm. Trong dân gian, củ Ngải bún được sử dụng làm gia vị chế biến thức ăn. Ngoài ra, củ Ngải bún còn được dùng để trị bệnh đau bụng, hen suyễn, tiêu chảy, khó tiêu, ngứa, sốt, loét, khô miệng, khó chịu dạ dày, kiết lỵ... Các nghiên cứu trước đây cho thấy hợp chất pinostrobin là thành phần chính trong loài này và có nhiều hoạt tính sinh học như kháng khuẩn, ức chế các gốc tự do... Pinostrobin là hợp chất cần thiết dùng để sàng lọc, kiểm tra và đánh giá chất lượng của củ Ngải bún và các dược liệu thuộc họ Gừng. Nghiên cứu này đã thiết lập chất chuẩn đối chiếu pinostrobin được phân lập từ củ Ngải bún có độ tinh khiết 99,26%, đáng tin cậy trong kiểm nghiệm dược liệu. Quy trình phân tích hàm lượng pinostrobin trong củ Ngải bún bằng phương pháp HPLC đã được xây dựng và đánh giá qua tính phù hợp của hệ thống, độ chọn lọc, phạm vi tuyến tính và độ chính xác. Ứng dụng quy trình để khảo sát quá trình điều chế cao chiết cho thấy phương pháp đun hoàn lưu bằng dung môi ethanol thu được hàm lượng pinostrobin cao nhất với 22,05 % trong cao chiết và 2,89 % trong mẫu củ khô.

Từ khoá: Pinostrobin, củ Ngải bún, *Boesenbergia pandurata*, Zingiberaceae

MỞ ĐẦU

Củ Ngải bún có tên khoa học là *Boesenbergia pandurata* Roxb. Schltr., thuộc họ Gừng (Zingiberaceae). Ngoài ra cây còn được biết với các tên gọi khác như Lưỡi cọp, Bông nga truật, Bông lai truật, ...¹ Củ Ngải bún phân bố ở các tỉnh phía nam như An Giang, Trà Vinh, Sóc Trăng... Củ Ngải bún được trồng làm gia vị chế biến thức ăn.² Ngoài ra, củ Ngải bún còn được dùng để trị bệnh đau bụng, hen suyễn, tiêu chảy, khó tiêu, ngứa, sốt, loét, khô miệng, khó chịu dạ dày, kiết lỵ... Các nghiên cứu khoa học đã chứng minh củ Ngải bún có tác dụng ức chế sự phát triển của tế bào ung thư vú MCF-7, ung thư ruột kết HT-29, ung thư buồng trứng CaOV3, ung thư cổ tử cung HeLa³⁻⁵ và đặc biệt củ Ngải bún ở Việt Nam còn có khả năng chế sự phát triển của dòng tế bào ung thư tụy PANC-1 trong điều kiện thiếu dưỡng chất.⁶ Các nghiên cứu về thành phần hóa học cho thấy rằng hợp chất pinostrobin là thành phần chính trong củ Ngải bún, chiếm khoảng 10–20% trong mẫu cao ethanol.⁷ Ngoài ra, có hơn 50 bài báo khoa học công bố về các nguồn nguyên liệu có chứa pinostrobin nhưng có 2 nguồn nguyên liệu có hàm lượng pinostrobin lớn nhất là trong lá cây Đậu triều (*Cajanus can*

L.) và củ Ngải bún (*B. pandurata*).⁸ Pinostrobin là một flavonoid có nhiều hoạt tính sinh học như kháng ung thư, chống oxy hóa, kháng viêm, kháng khuẩn, chống loét dạ dày, điều trị thoái hóa thần kinh...⁸⁻¹⁰ Do đó, pinostrobin là hợp chất cần thiết dùng để sàng lọc, kiểm tra và đánh giá chất lượng của củ Ngải bún và các dược liệu thuộc họ Gừng. Để cung cấp thêm cơ sở khoa học cho công tác kiểm nghiệm dược liệu, trong nghiên cứu này chúng tôi thực hiện thiết lập chất chuẩn có độ tinh khiết cao và xây dựng quy trình định lượng pinostrobin trong củ Ngải bún.¹¹⁻¹³

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Đối tượng nghiên cứu

Củ, thân, và lá tươi của cây Ngải bún được lấy tại tỉnh An Giang vào tháng 01 năm 2017 và được định danh bởi TS. Đặng Lê Anh Tuấn, Khoa Sinh học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQG-HCM. Củ Ngải bún (10 kg) được thu hái phơi khô và cắt nhỏ.

Hóa chất và thiết bị

Hợp chất tinh khiết pinostrobin được cô lập từ củ Ngải bún và xác định cấu trúc hóa học bằng các phương pháp phổ nghiệm hiện đại FT-IR, NMR và

Khoa Hóa học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQG-HCM, Việt Nam

Liên hệ

Đỗ Văn Nhật Trường, Khoa Hóa học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQG-HCM, Việt Nam

Email: dvntruong@hcmus.edu.vn

Lịch sử

- Ngày nhận: 02-09-2020
- Ngày chấp nhận: 12-12-2020
- Ngày đăng: 16-12-2020

DOI: 10.32508/stdjns.v4i4.948



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.



Trích dẫn bài báo này: Nhân N T, Trường D V N, An D T P, Mai N T T. **Thiết lập chất chuẩn đối chiếu và định lượng pinostrobin trong củ Ngải bún (*Boesenbergia pandurata*).** *Sci. Tech. Dev. J. - Nat. Sci.*; 4(4):901-909.

UV. Hệ thống HPLC-DAD Agilent 1260, cột sắc ký pha đảo Eclipse Plus XDB-C18 (150 x 4,6 mm, 5 μ m), các loại dung môi tinh khiết phân tích methanol, ethanol, acetonitrile của hãng Scharlau, phosphoric acid (Merck –HPLC), ethanol 96% công nghiệp (Việt Nam).

Thiết lập chất chuẩn đối chiếu

Do không có chất chuẩn đối chiếu pinostrobin trong quá trình nghiên cứu, nên việc định lượng hợp chất pinostrobin được thực hiện bằng phương pháp HPLC-DAD quy về 100% diện tích peak trên sắc ký đồ. Điều kiện định lượng pinostrobin được tối ưu trên thống HPLC-DAD Agilent 1260 như sau cột Eclipse Plus XDB-C18 (150 x 4,6 mm, 5 μ m), tốc độ dòng 1,0 mL/phút, nhiệt độ cột 35°C, thể tích tiêm 10 μ L, bước sóng phát hiện 290 nm, hệ pha động tối ưu ACN-MeOH-H₃PO₄ 0,05% (40:25:35). Mẫu thử pinostrobin 1000 ppm pha trong dung môi ethanol và được qua màng lọc PTFE 0,45 μ m.

Quá trình thiết lập chất chuẩn pinostrobin được thực hiện theo các bước: đóng gói và đánh giá độ đồng nhất của các lọ sau đóng gói, đánh giá kết quả định lượng liên phòng và xác định giá trị định lượng công bố. Mỗi lọ được định lượng 2 lần và lấy kết quả trung bình bằng phương pháp HPLC-DAD với kết quả được quy về 100% diện tích peak. Thực hiện kiểm tra Dixon và phân tích phương sai một yếu tố theo ANOVA để đánh giá kết quả thu được.

Việc đánh giá kết quả định lượng liên phòng được thực hiện tại 2 phòng thí nghiệm: phòng thí nghiệm Nghiên cứu ung thư – hướng Hóa dược (PTN1) và Phòng thí nghiệm Phân tích trung tâm (PTN2) của Trường Đại học khoa học Tự nhiên, ĐHQG-HCM. Thực hiện kiểm tra Dixon và xác định giá trị ấn định của pinostrobin theo hướng dẫn TCVN 9596:2013 (ISO 13528:2003) để ứng dụng làm chất chuẩn đối chiếu trong quy trình định lượng ở nghiên cứu tiếp theo.

Hệ thống HPLC-DAD và điều kiện sắc ký

Quy trình định lượng HPLC của pinostrobin được tối ưu trên thống HPLC-DAD Agilent 1260 như sau: cột Eclipse Plus XDB-C18 (150 x 4,6 mm, 5 μ m), tốc độ dòng 1 mL/phút, nhiệt độ cột 35°C, thể tích tiêm 10 μ L, bước sóng phát hiện 290 nm, hệ pha động tối ưu ACN-MeOH-H₃PO₄ 0,05% (40:25:35), thời gian phân tích 25 phút. Các dung môi và hóa chất đều đạt điều kiện tinh khiết phân tích dùng cho HPLC.

Khảo sát quy trình điều chế cao chiết củ Ngải bún với tỉ lệ ethanol: nước khác nhau

Dựa trên các kết quả khảo sát về thể tích dung môi, số lần ly trích và thời gian ly trích nhận thấy: với 20 g mẫu củ Ngải bún khô cần sử dụng 150 mL dung môi đun hoàn lưu trong 30 phút, số lần thực hiện 5–6 lần giúp đạt hàm lượng pinostrobin cao nhất.

Cân chính xác khoảng 20 g mẫu khô từ củ Ngải bún cho vào các bình cầu 250 mL, thực hiện 6 mẫu với 150 mL dung môi có các tỉ lệ dung môi cồn ethanol khác nhau cho vào erlen: 10:0; 9:1; 8:2; 7:3; 6:4; 5:5; 0:10 và sau đó đun hoàn lưu trong 3 giờ. Lọc lấy dung dịch trích, tiếp tục thêm dung môi vào đun hoàn lưu 5–6 lần nữa đến dịch trích hết màu vàng nhạt, lọc, dịch trích được cô quay và cân khối lượng cao thu được (m). Cân tổng khối lượng cao thu được và tính toán hiệu suất chiết.

Chuẩn bị mẫu phân tích

Chất chuẩn đối chiếu pinostrobin: sử dụng pinostrobin đã được thiết lập làm chất chuẩn đối chiếu. Cân chính xác 10 mg pinostrobin, hòa tan trong 10 mL ethanol. Các dung dịch pinostrobin có nồng độ thấp hơn được pha loãng từ dung dịch trên bằng ethanol. Mẫu thử: Cân lượng mẫu cao trong khoảng từ 0,01–0,05 g, hòa tan và định mức thành 10 mL bằng dung môi ethanol 100%. Lọc dung dịch này qua màng lọc PTFE 0,45 μ m. Dùng micropipette hút 100 μ L dịch lọc và 900 μ L ethanol 100% cho vào vial 1,5 mL và chuyển vial vào hệ thống tiêm mẫu tự động của máy HPLC. Phân tích HPLC và tính toán hàm lượng pinostrobin có trong mẫu.

Xây dựng và thẩm định quy trình định lượng pinostrobin và ứng dụng phân tích các mẫu Ngải bún

Khảo sát điều kiện sắc ký

Khảo sát bước sóng phát hiện bằng cách triển khai mẫu chuẩn đối chiếu pinostrobin có nồng độ 100 ppm trên máy HPLC với tốc độ dòng 1 mL/phút, dải bước sóng phát hiện từ 200–900 nm. Dựa vào kết quả đo phổ của đầu dò DAD tìm bước sóng hấp thụ cao nhất của pinostrobin, từ đó lựa chọn bước sóng phát hiện. Khảo sát hệ dung môi dùng cho HPLC: khảo sát trên mẫu cao ethanol của củ Ngải bún đã chuẩn bị như trên. Khảo sát 2 hệ dung môi khác nhau ACN-MeOH-H₂O (30:30:40) và ACN-MeOH-H₃PO₄ 0,05% (40:25:35). Sắc kí đồ phải cho thấy peak của chất pinostrobin tách rời tạp chất, peak nhọn và đối xứng với độ phân giải lớn hơn 1,5.

Tính tương thích hệ thống

Phân tích HPLC lặp lại 6 lần dung dịch chất đối chiếu pinostrobin 100 ppm ghi lại các giá trị về thời gian lưu, diện tích mũ, hệ số bất đối xứng, số đĩa lý thuyết, độ phân giải. Tính độ lệch chuẩn tương đối (RSD).

Tính chọn lọc (độ đặc hiệu)

Tiến hành phân tích HPLC mẫu trắng (dung môi ethanol), mẫu chuẩn 100 ppm, mẫu cao ethanol củ Ngải bún và mẫu thử thêm chuẩn. Mẫu trắng phải không có tín hiệu của pinostrobin. Mẫu chuẩn, mẫu cao ethanol và mẫu thêm chuẩn phải có tín hiệu của pinostrobin cùng thời gian lưu và cường độ mẫu thêm chuẩn phải tăng lên tương ứng theo hàm lượng chất chuẩn thêm vào.

Khảo sát tính tuyến tính

Tiến hành phân tích các dãy dung dịch chuẩn có nồng độ pinostrobin từ 0,5 ppm đến 1000 ppm. Chọn mô hình hồi quy tuyến tính bậc nhất để mô tả quan hệ giữa nồng độ pinostrobin và diện tích peak, tính giá trị của hệ số tương quan R^2 .

Giới hạn phát hiện (LOD) và giới hạn định lượng (LOQ)

Dựa vào điểm thấp nhất của đường chuẩn, thực hiện việc xác định LOD và LOQ của phương pháp. Dự đoán LOD bằng cách so sánh giá trị tung độ gốc đường tuyến tính và diện tích peak của nồng độ thấp nhất trên đường chuẩn (0,5 hoặc 1.0 ppm) và dự đoán nồng độ tín hiệu bị nhiễu đáng kể bởi đường nền. Thực hiện: làm trên mẫu thử (chuẩn đối chiếu) 10 lần song song. Giới hạn phát hiện của phương pháp là $LOD = 3 \times SD$ và giới hạn định lượng của phương pháp là $LOQ = 10 \times SD$.

Độ lặp lại

Thực hiện phân tích 6 mẫu chuẩn pinostrobin 100 ppm và 6 mẫu cao ethanol (khối lượng mẫu khoảng 0,05 g) bằng phương pháp HPLC trong cùng một ngày. Tính hàm lượng trung bình của pinostrobin và RSD với giá trị cho phép $RSD \leq 5\%$.

Độ đúng

Thực hiện thêm chuẩn vào nền mẫu cao củ Ngải bún đã xử lý ở ba mức nồng độ khác nhau, 80%, 100%, 120% so với hàm lượng trong mẫu thử, mỗi mức lặp lại 3 lần. Tiến hành phân tích HPLC và tính phần trăm hàm lượng chất chuẩn tìm lại được so với lượng chuẩn ban đầu đã thêm vào.

Ứng dụng phân tích các mẫu thử

Sau khi đã thẩm định phương pháp với các điều kiện tốt nhất, tiến hành định lượng các mẫu cao trích từ củ Ngải bún với các tỉ lệ dung môi đã khảo sát, so sánh hàm lượng pinostrobin thu được từ các tỉ lệ dung môi khác nhau.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Thiết lập chất chuẩn đối chiếu

Đóng gói và đánh giá độ đồng nhất giữa các lọ

Thực hiện đóng gói: 500 mg pinostrobin được đóng gói thành 50 lọ với khối lượng 10 mg/lọ. Các lọ được sử dụng là vial thủy tinh 1,5 mL tối màu có chứa khí nitrogen 95%, bảo quản ở nhiệt độ 2–8°C, tránh ánh sáng trực tiếp. Số lọ được đánh giá độ đồng nhất được lựa chọn ngẫu nhiên với số lượng theo công thức $= 8$ lọ (với N là 50 lọ). Do $F_{in} < F_{tc}$ (Bảng 1) nên không có sự khác biệt thống kê giữa các kết quả đo được, vậy các lọ chất chuẩn đối chiếu pinostrobin đạt yêu cầu về độ đồng nhất hàm lượng sau khi đóng gói.

Kết quả định lượng liên phòng được thực hiện tại 2 phòng thí nghiệm cho thấy hàm lượng pinostrobin trong các lọ đều trên 95% và các giá trị RSD nhỏ hơn 2% (Bảng 2).

Từ kết quả thu được tiến hành kiểm tra z-score cho thấy các giá trị $|z| < 2$, không có giá trị bất thường trong 20 lọ sau khi phân tích. Tính giá trị ấn định của pinostrobin trong 20 lọ theo hướng dẫn TCVN 9596:2013 (ISO 13528:2003) về xác định giá trị ấn định trong so sánh liên phòng thí nghiệm. Giá trị ấn định từ 20 kết quả thu được cho thấy hàm lượng trung bình của pinostrobin là 99,26% với RSD là 0,087% và độ không đảm bảo đo là 0,174% (Bảng 3).

Xây dựng và thẩm định quy trình định lượng pinostrobin

Khảo sát điều kiện sắc ký

Khảo sát bước sóng phát hiện bằng cách triển khai mẫu chuẩn đối chiếu pinostrobin có nồng độ 100 ppm trên máy HPLC với tốc độ dòng 1 mL/phút, bước sóng phát hiện từ 200–800 nm. Dựa vào kết quả đo phổ của đầu dò DAD cho thấy bước sóng hấp thụ cực đại của pinostrobin là 292 nm và được chọn làm bước sóng phát hiện (Hình 1).

Hợp chất pinostrobin có cấu trúc kém phân cực do đó sử dụng phương pháp RP-HPLC để phân tích các hợp chất này. Vì hợp chất pinostrobin làm chất đối chiếu có tính acid nên dung dịch đệm acid vô cơ loãng trong nước được sử dụng là pha động. Tham khảo tài liệu về sử dụng dung môi pha động để tách pinostrobin,

Bảng 1: Kết quả phân tích phương sai một yếu tố theo ANOVA

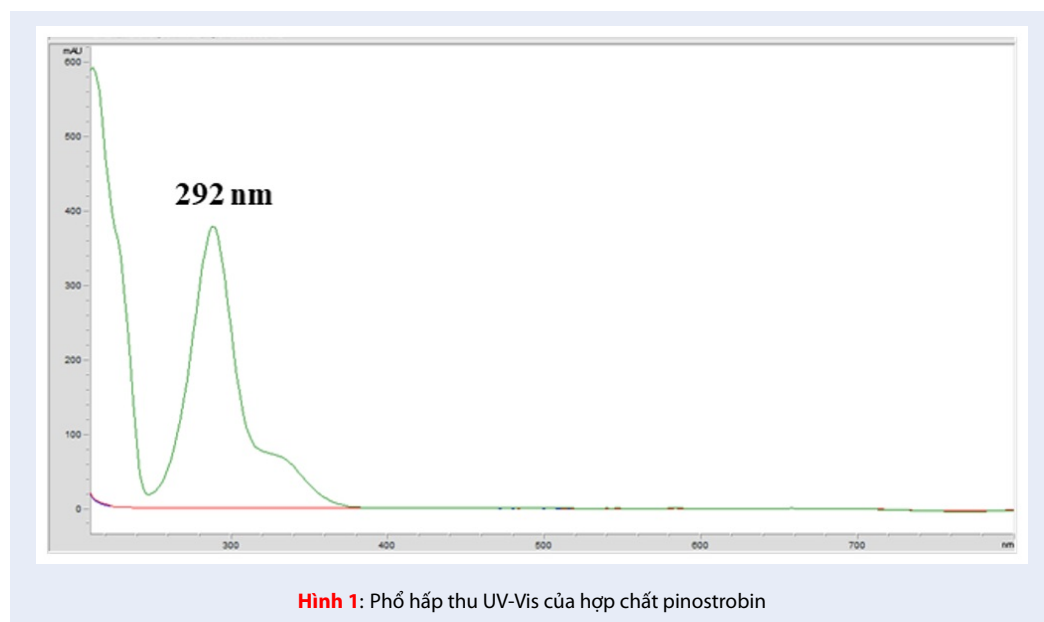
Nguồn sai số	Tổng bình phương	Bậc tự do	Bình phương	F_{ln}	F_{lc}
Giữa các nhóm	0,028	7	0,0040	0,6669	3,501
Trong từng nhóm	0,048	8	0,0060		
Tổng cộng	0,076	15			

Bảng 2: Kết quả định lượng chất chuẩn đối chiếu ở 2 phòng thí nghiệm (n=10)

Các chỉ tiêu đánh giá	PTN 1	PTN 2
Số đĩa lý thuyết (> 3000)	44543	44731
Hàm lượng pinostrobin trung bình (> 95%)	99,250	99,275
RSD của hàm lượng (< 2%)	0,087	0,099
Thời gian lưu	12,01	12,05
RSD của thời gian lưu (< 2%)	0,076%	0,18%

Bảng 3: Kết quả định lượng liên phòng và xác định giá trị công bố

	x_0^*	x_1^*	x_2^*
$x^* - (1,5 \times s^*)$	-	99,416	99,406
$x^* + (1,5 \times s^*)$	-	99,075	99,061
Hàm lượng trung bình (x)	99,263	99,260	99,260
Độ lệch (s)	0,091	0,086	0,086
Trung bình ổn định của hàm lượng (x^*)	99,250	99,260	99,260
Độ lệch ổn định (s^*)	0,113	0,098	0,098



Hình 1: Phổ hấp thụ UV-Vis của hợp chất pinostrobin

sau đó thay đổi thành phần để thu được hệ pha động tối ưu, các dung môi sử dụng trong pha động được chọn gồm ACN, MeOH, H₂O và H₃PO₄ [12-13]. Khảo sát 2 hệ dung môi khác nhau ACN-MeOH-H₂O (30:30:40) và ACN-MeOH-H₃PO₄ 0,05% (40:25:35). Kết quả cho thấy sắc ký đồ thu được từ hệ pha động ACN-MeOH-H₃PO₄ 0,05% (40:25:35) cho peak sắc ký của pinostrobin nhọn và đối xứng. Do đó hệ pha động ACN-MeOH-H₃PO₄ 0,05% (40:25:35) được lựa chọn để xây dựng quy trình định lượng pinostrobin (Hình 2 và Hình 3).

Tính tương thích hệ thống

Kết quả phân tích HPLC lặp lại 6 lần của dung dịch chất đối chiếu pinostrobin 100 ppm, ghi lại các giá trị trung bình của các thông số và RSD tương ứng: thời gian lưu 12,0 phút với RSD 0,93%, diện tích peak 4548,3 với RSD 0,88%, hệ số bất đối xứng (A_{sys}) 1,19 với RSD 0,55%, số đĩa lý thuyết (N) 14555, độ phân giải (R_s) 14,59. Độ lệch chuẩn tương đối (RSD) của các đại lượng đều nhỏ hơn 2%.

Tính chọn lọc (độ đặc hiệu)

Tiến hành phân tích HPLC mẫu blank (dung môi ethanol), mẫu chuẩn 100 ppm, mẫu cao ethanol củ Ngải bún và mẫu thử thêm chuẩn (Hình 4). Mẫu trắng không có tín hiệu của pinostrobin. Sắc ký đồ mẫu cao ethanol củ Ngải bún xuất hiện peak pinostrobin ở thời gian lưu 12 phút tương ứng với mẫu chuẩn. Sắc ký đồ mẫu thêm chuẩn có tín hiệu của pinostrobin cùng thời gian lưu và diện tích peak tăng lên rõ rệt.

Khảo sát tính tuyến tính

Trong khoảng nồng độ khảo sát của dung dịch chuẩn pinostrobin từ 0,5 ppm đến 1000 ppm. Sử dụng TCVN 6661-1:2000 kết hợp với phần mềm excel – phân tích phương sai một chiều ANOVA để đánh giá sự phù hợp của mô hình hồi quy tuyến tính, cũng như khoảng tuyến tính và khoảng làm việc của phương pháp. Cho thấy khoảng tuyến tính 0,5 - 500 ppm là phù hợp. Kết quả đường tuyến tính như sau: $y = 41,86C + 79,18$ với $R^2 = 0,999$.

Giới hạn phát hiện (LOD) và giới hạn định lượng (LOQ)

Dựa vào kết quả đường tuyến tính của khoảng làm việc, có thể thấy rằng giá trị tung độ gốc đường tuyến tính là 79,18 lớn hơn tín hiệu tại điểm thấp nhất của đường tuyến tính 0,5 ppm (diện tích peak là 30,3). Nên có thể dự đoán rằng ở nồng độ 0,5 ppm tín hiệu bị nhiễu đáng kể bởi đường nền. Dự đoán giới hạn phát hiện tín hiệu (LOD) của phương pháp là 0,5 ppm

(điểm thấp nhất của đường chuẩn). Thực hiện pha 10 dung dịch có nồng độ 2 ppm (gấp 4 LOD ước lượng) đo và thu được kết quả giá trị R ở trong khoảng 4 - 10 nên nồng độ lựa chọn thử nghiệm 2 ppm là phù hợp. Giới hạn phát hiện của phương pháp là $LOD = 3 \times SD = 0,29$ ppm. Giới hạn định lượng của phương pháp là $LOQ = 10 \times SD = 0,96$ ppm.

Độ lặp lại

Thực hiện phân tích 6 mẫu chuẩn pinostrobin 100 ppm và 6 mẫu cao ethanol (khối lượng mẫu khoảng 0,05 g) bằng phương pháp HPLC trong cùng một ngày. Kết quả của cho thấy thời gian lưu của peak pinostrobin trong chuẩn và mẫu cao ethanol là giống nhau khoảng 12,0 phút với RSD 1,8%, diện tích peak của mẫu cao ethanol là 2654,2 với RSD là 1,7% và diện tích peak của chuẩn là 4285,5 với RSD là 1,3%. Điều này chứng tỏ quy trình đạt yêu cầu về độ lặp lại.

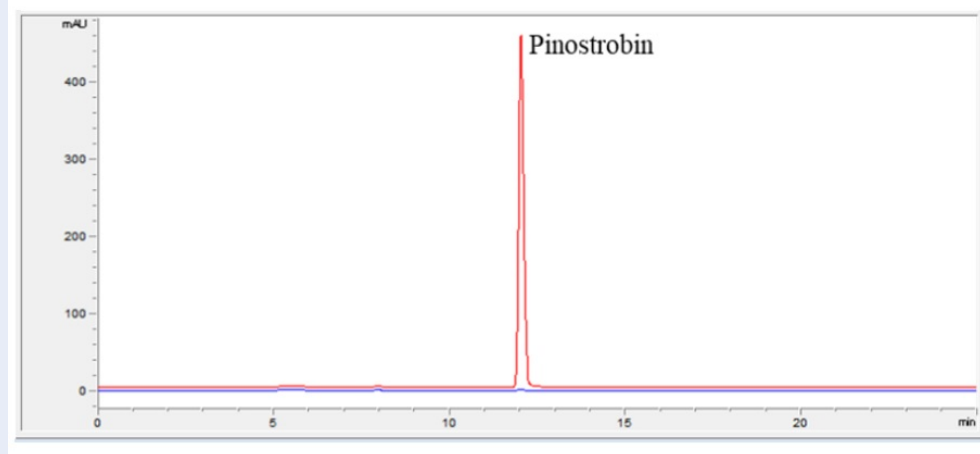
Độ đúng

Thực hiện thêm chuẩn vào nền mẫu cao củ Ngải bún (có hàm lượng pinostrobin khoảng 140 mg/g mẫu cao) ở ba mức nồng độ khác nhau, 80%, 100%, 120% so với hàm lượng trong mẫu thử, mỗi mức lặp lại 3 lần. Kết quả tỉ lệ phục hồi tương ứng ở mỗi nồng độ thêm chuẩn như trên là 97,46; 97,70 và 97,98 đã chứng tỏ rằng quy trình định lượng pinostrobin trong mẫu khảo sát đạt yêu cầu về độ đúng.

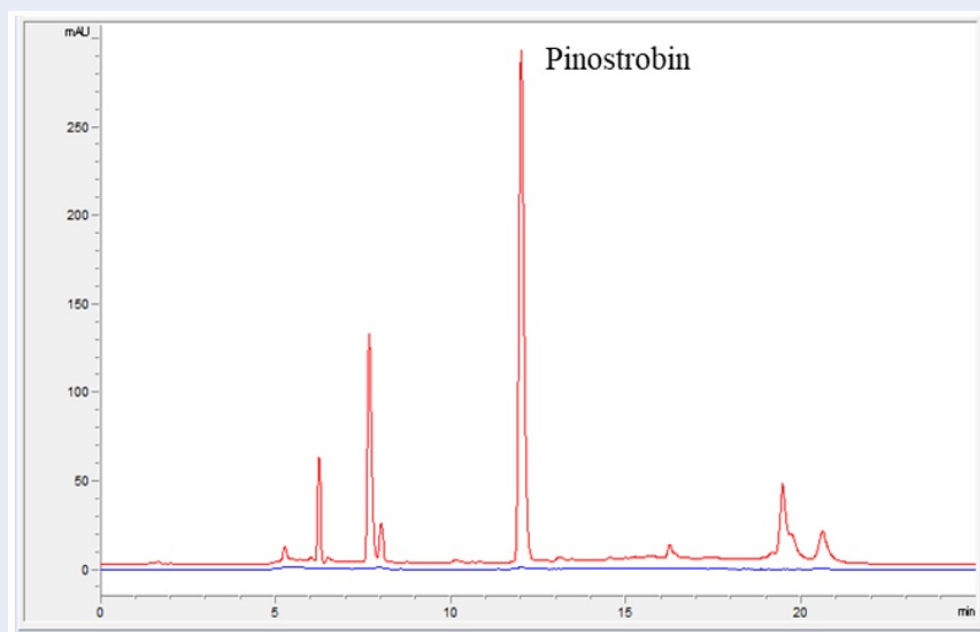
Ứng dụng phân tích các mẫu thử

Sau khi đã thẩm định phương pháp với các điều kiện tốt nhất, tiến hành định lượng các mẫu cao từ củ Ngải bún để kiểm tra định tính và định lượng pinostrobin. Sau khi mẫu được phân tích bằng phương pháp HPLC tiến hành so sánh thời gian lưu và diện tích peak của mẫu thử và mẫu chuẩn, áp dụng quy trình hồi quy bậc nhất để tính hàm lượng pinostrobin có trong các mẫu cao chiết. Cạn lượng mẫu cao trong khoảng từ 0,0100–0,0500 g, hòa tan và định mức thành 10 mL bằng dung môi ethanol 100%. Lọc dung dịch này qua màng lọc PTFE 0,45 μ m. Dùng micropipette hút 100 μ L dịch lọc và 900 μ L ethanol 100% cho vào vial 1,5 mL và chuyển vial vào hệ thống tiêm mẫu tự động của máy HPLC. Phân tích HPLC và tính toán hàm lượng pinostrobin có trong mẫu.

Quá trình ly trích cao củ Ngải bún bằng phương pháp đun hoàn lưu được thực hiện với thể tích dung môi cho mỗi lần chiết là 150 mL cho thấy cao EtOH:H₂O (5:5) cho hiệu suất cao nhất là 20,3% (Bảng 4). Tuy nhiên, tiến hành định lượng pinostrobin trong các mẫu khảo sát thì với dung môi EtOH hàm lượng pinostrobin là cao nhất 22,05%. Vì vậy, dung môi ly trích tốt nhất để chiết pinostrobin trong khảo sát này là EtOH.



Hình 2: Sắc ký đồ của chất chuẩn đối chiếu pinostrobin và dung môi ethanol



Hình 3: Sắc ký đồ của cao ethanol củ Ngải bún và dung môi ethanol

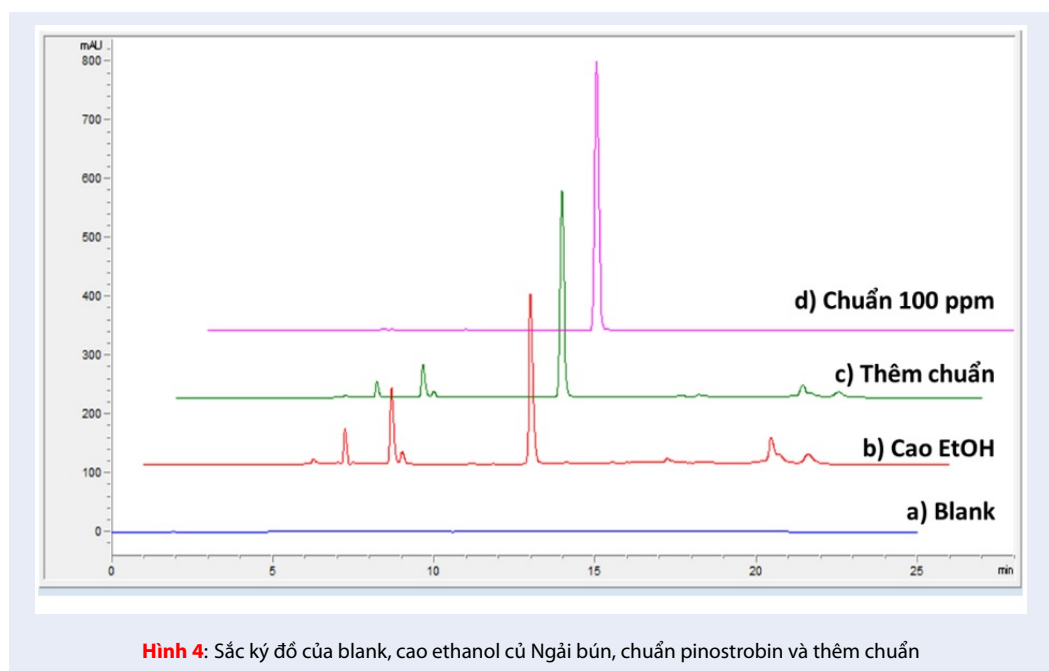
KẾT LUẬN

Thiết lập chất chuẩn đối chiếu pinostrobin được phân lập từ củ Ngải bún cho thấy có độ tinh khiết cao 99,26% và được thẩm định đầy đủ theo các tiêu chuẩn hiện hành của một chất chuẩn gốc, đáng tin cậy trong kiểm nghiệm dược liệu. Đã xây dựng và thẩm định thành công quy trình phân tích hàm lượng pinostrobin trong củ Ngải bún với hệ thống HPLC HPLC-DAD Agilent 1260, cột Eclipse Plus XDB-C18 (150 x 4,6 mm; 5 μ m), tốc độ dòng 1,0 mL/phút, nhiệt độ cột

35°C, thể tích tiêm 10 μ L, bước sóng phát hiện 292 nm, hệ pha động tối ưu ACN-MeOH-H₃PO₄ 0,05% (40:25:35), thời gian phân tích 25 phút. Trong khảo sát điều chế cao chiết cho thấy với phương pháp đun hoàn lưu bằng dung môi ethanol thì trích được pinostrobin là cao nhất 22,05%.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu được tài trợ bởi Quỹ Phát triển khoa học và công nghệ TP. HCM theo hợp đồng mã số 06/2019/HĐ-QPTKHCN.



Bảng 4: Kết quả định lượng pinostrobin ở các mẫu cao củ Ngải bún (n=3)

Dung môi chiết	Hiệu suất chiết (%)	Pinostrobin (% trong cao)
EtOH	13,1	22,05
EtOH:H ₂ O (9:1)	14,1	18,31
EtOH:H ₂ O (8:2)	15,7	17,25
EtOH:H ₂ O (7:3)	18,0	15,62
EtOH:H ₂ O (6:4)	19,1	13,01
EtOH:H ₂ O (5:5)	20,3	11,82
EtOH:H ₂ O (3:7)	19,5	3,79
H ₂ O	19,0	1,54

DANH MỤC TỪ VIẾT TẮT

DAD: đầu dò photodiode array
 FT-IR: Phổ hồng ngoại
 HPLC: Sắc ký lỏng hiệu năng cao
 LOD: Giới hạn phát hiện
 LOQ: Giới hạn định lượng
 NMR: Phổ cộng hưởng từ hạt nhân
 PTN: Phòng thí nghiệm
 RSD: Độ lệch chuẩn tương đối
 SD: Độ lệch chuẩn

XUNG ĐỘT LỢI ÍCH

Các tác giả cam đoan không có bất kỳ xung đột lợi ích nào trong bài nghiên cứu này.

ĐÓNG GÓP CỦA CÁC TÁC GIẢ

Nguyễn Trung Nhân và Đỗ Thị Phú An thu hái mẫu và xây dựng quy trình thẩm định phân tích;
 Đỗ Văn Nhật Trường viết bản thảo bài báo;
 Nguyễn Thị Thanh Mai phân bố cục và chỉnh sửa bản thảo chi tiết.
 Tất cả các tác giả đã đọc và chấp nhận bản thảo cuối cùng.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Pham HH. Cây cỏ Việt Nam. Nhà xuất bản Y học. 2003;3:458.
- Uchinda P, Reutrakul V, Claeson P, Pongprayoon U, Sema-tong T, Santisuk T, Taylor CW. Anti-inflammatory cyclohex-enyl chalcone derivatives in Boesenbergia pandurata. Phyto-chemistry. 2002;59:169–173. Available from: [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(01\)00451-4](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(01)00451-4).

3. Nwet WN. Panduratin D-I, novel secondary metabolites from rhizomes of *Boesenbergia pandurata*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*. 2008;56:491–496. PMID: 18379096. Available from: <https://doi.org/10.1248/cpb.56.491>.
4. Sarot C. Anti HIV-1 protease activity of compound from *Boesenbergia pandurata*. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*. 2006;14:1710–1714. PMID: 1626398. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2005.10.019>.
5. Kazutoshi S. Analysis of antioxidant activities contained in the *Boesenbergia pandurata* Schult. Rhizome. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*. 2006;70:2281–2284. PMID: 16960369. Available from: <https://doi.org/10.1271/bbb.60086>.
6. Nguyen TN, Nguyen TTM, Nguyen XH, Dang HP, Dya FD, Hiroyasu E, Suresh A. Constituents of the rhizomes of *Boesenbergia pandurata* and their antiausterity activities against the PANC-1 human pancreatic cancer line. *Journal of Natural Products*. 2017;80:141–148. PMID: 28099006. Available from: <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.6b00784>.
7. Nguyen XH, Nguyen TTM, Nguyen TN. Một số hợp chất flavanone từ củ Ngải bún (*Boesenbergia pandurata*). *Tạp chí Phát triển Khoa học và Công nghệ*. 2018;21:62–67.
8. Le B, Jean-Christophe, Aubourg L, Habrioux G. Effects of pinostrobin on estrogen metabolism and estrogen receptor trans-activation. *Cancer Letters*. 2000;156:37–44. Available from: [https://doi.org/10.1016/S0304-3835\(00\)00435-3](https://doi.org/10.1016/S0304-3835(00)00435-3).
9. Wu D, Nair M, Dewitt L. Novel compounds from Piper methysticum Forst (Kava Kava) roots and their effect on cyclooxygenase enzyme. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2002;50:701–705. PMID: 11829631. Available from: <https://doi.org/10.1021/jf010963x>.
10. Chahyadi A. *Boesenbergia pandurata* Roxb., an Indonesian medicinal plant: phytochemistry, biological activity, plant biotechnology. *Procedia Chemistry*. 2014;13:13–37. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.proche.2014.12.003>.
11. ISO Guide 34:2009, General requirements for the competence of reference material producers. 2009;p. 4–18.
12. Yusuf NA, Annuar MSM, Khalid N. Existence of bioactive flavonoids in rhizomes and plant cell cultures of *Boesenbergia rotunda* (L.) Mansf. *Kulturpfl. Australian Journal of Crop Science*. 2013;7:730–773.
13. Ata V, Yusuf NA, Tan BC, Husaini A, Yusuf YM, Majid NA, Khalid N. Expression profiles of flavonoid-related gene, 4 coumarate: coenzyme A ligase, and optimization of culturing conditions for the selected flavonoid production in *Boesenbergia rotunda*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 2015;123:47–55. Available from: <https://doi.org/10.1007/s11240-015-0813-4>.

Establishing pinostrobin reference standard for quantitative analysis of the rhizomes of *Boesenbergia pandurata*

Nhan Trung Nguyen, Truong Nhat Van Do*, An Phu Thi Do, Mai Thanh Thi Nguyen



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

ABSTRACT

Boesenbergia pandurata Roxb. Schlecht. (*Zingiberaceae*), called "Ngai bun" in Viet Nam, is one of the Southeast Asian medicinal plants and its rhizomes are used primarily as a spice. This is a perennial, short-stemmed plant, formed by leaf sheaths and can grow up to 50 cm. The leaves are 7-11 cm wide and 25-50 cm long. Its rhizome surfaces are light brown in color, the inner rhizome is yellow, oval-shaped, and has a very aromatic odor. In folklore, *Boesenbergia pandurata* rhizomes are used as a spice for food processing. This plant contains pinostrobin as the major constituents. Previously showed that pinostrobin compound is the main ingredient together with a variety of biological activities such as antibacterial, inhibition of free radicals, ... Pinostrobin is necessary composition for the screening, testing, and quality evaluation of the rhizomes of *B. pandurata* species and others in the *Zingiberaceae* family. This research had conducted a reference standard of pinostrobin isolated from the rhizomes of *B. pandurata* had 99.26 % purity, which is reliable in medicinal testing. An HPLC method for pinostrobin determination was conducted and The quantitative HPLC analysis was validated for system suitability, selectivity, linearity ranges, and precision. Application of the process to investigate the preparation of extract shown that reflux extraction with ethanol obtained the highest pinostrobin content with 22.05 % in extracts and 2.89 % in dried rhizomes of *B. pandurata*.

Key words: Pinostrobin, rhizomes, *Boesenbergia pandurata*, *Zingiberaceae*

Faculty of chemistry, University of Science, VNUHCM, Vietnam

Correspondence

Truong Nhat Van Do, Faculty of chemistry, University of Science, VNUHCM, Vietnam

Email: dntruong@hcmus.edu.vn

History

- Received: 02-09-2020
- Accepted: 12-12-2020
- Published: 16-12-2020

DOI :[10.32508/stdjns.v4i4.948](https://doi.org/10.32508/stdjns.v4i4.948)



Copyright

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



Cite this article : Nguyen N T, Do T N V, Do A P T, Nguyen M T T. Establishing pinostrobin reference standard for quantitative analysis of the rhizomes of *Boesenbergia pandurata*. *Sci. Tech. Dev. J. - Nat. Sci.*; 4(4):901-909.