

human plasma with diethylether and chloroform. Analytes were chromatographed on a Cyanocolumn (150 mm x 4,6 mm, i.d., 5 µm) with gradient elution using 2 mM ammonium acetate buffer pH 3.5-methanol (40:60, v/v). Detection was by positive ion electrospray ionization (ESI) mass spectrometry with selected-reaction monitoring (SRM). Linear calibration curves were obtained over the concentration range 0.5–53.3 ng/mL, with a limit of quantification of 0.5 ng/mL. The intra- and inter-day precisions (CV) were both less than 10.0% and the accuracy was from 92.8 to 106.4%. This method can be sufficient for the purpose of the pharmacokinetic study of GF in experimental dog and can be

applied for future bioavailability study in human.

Key words: Glycyl Funtumin, HPLC-MS/MS, ESI, Bioanalytical Method Validation.

Tài liệu tham khảo

1. Kushnir MM, Rockwood AL, Roberts WL Liquid chromatography tandem mass spectrometry for analysis of steroids in clinical laboratories. Clin Biochem (Article in press). (2010).

2. Raud M Steroid measurement with LC-MS/MS: Application examples in pediatrics. J. Steroid Biochem Mol Biol. (2008) Vol 121(3-5), p.520-7.

3. U.S Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (2001): Guidance for Industry – Bioanalytical Method Validation.

Thành phần hóa học của hoa trinh nữ hoàng cung (*Crinum latifolium* L.)

Nguyễn Nhật Thành¹, Tống Hồng Thanh²
Hoàng Minh Châu², Nguyễn Thị Ngọc Trâm³, Trần Văn Sung⁴

¹Trung tâm Kiểm nghiệm T-MP-TP TP. Hồ Chí Minh

²Đại học Y Dược TP. Hồ Chí Minh

³Công ty TNHH Thiên Dược, ⁴Viện Hóa học

Đặt vấn đề

Trinh nữ hoàng cung (TNHC) (*Crinum latifolium* L.) thuộc họ Thủy tiên (Amaryllidaceae) là một cây thuốc quý và chế phẩm crila từ cây TNHC đang được sử dụng trong y học hiện đại để điều trị bệnh phi đại lành tính tuyến tiền liệt và u xơ tử cung. Công ty TNHH Thiên Dược, nơi nghiên cứu và sản xuất ra viên crila hiện có vùng nguyên liệu TNHC rộng trên 30 ha đang tiếp tục phát triển mở rộng. Với vùng nguyên liệu như vậy, hoa TNHC được thu hái với một lượng đáng kể có thể sử dụng làm một nguồn dược liệu. Tuy đã có nhiều nghiên cứu công bố về thành phần hóa học của cây TNHC, nhưng những nghiên cứu về thành phần hóa học của hoa TNHC có rất ít^[1,5,6]. Trong bài báo này chúng tôi thông báo một số kết quả nghiên cứu về thành phần hóa học của hoa TNHC (*Crinum latifolium* L.)

Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

Đối tượng nghiên cứu

Hoa TNHC (*Crinum latifolium* L.) thu hái tại trang trại Long Thành - Đồng Nai vào tháng 4-7, phơi khô và xay mịn. Mẫu sử dụng cho nghiên cứu là nụ hoa nhỏ (M₁), búp hoa chưa nở (M₂) và hoa đã nở (M₃).

Chuẩn kaempferol, hãng Sigma-Aldrich, Thụy Sĩ, LOT 1325550, độ tinh khiết 99,5 %, hàm ẩm 5,83 %.

Chất chuẩn crinamidin được chiết xuất, phân lập, làm tinh khiết và xác định cấu trúc.

Thiết bị nghiên cứu: Dụng cụ phân tích hóa thực vật. Bàn mỏng silicagel 60F254, máy HPLC hiệu Shimadzu. Cột SPE Supelclean LC-18, 3 ml tubes Reorder NO 57012 (SUPELCO).

Phương pháp nghiên cứu

Phân tích sơ bộ thành phần hóa học: Mẫu được phân tích theo các phương pháp về nghiên cứu hóa học các cây thuốc^[3,4].

Định tính xác định nhóm alkaloid và flavonoid bằng sắc ký lớp mỏng

Định tính flavonoid:

● Nghiên cứu – Kỹ thuật

Mẫu thử: Cân chính xác 10 g bột dược liệu, ngâm chiết flavonoid với methanol. Dịch chiết loại tạp bằng n-hexan, thủy phân dịch chiết với acid hydrochloric 10 % bằng đun hồi lưu cách thủy. Dịch thủy phân được chiết kiệt flavonoid aglycon với ethyl acetat. Bốc hơi dịch chiết ethyl acetat đến cạn khô trên cách thủy. Hòa tan và chuyển toàn bộ cặn vào bình định mức 10 ml bằng methanol HPLC, thêm methanol đến vạch, lắc đều, lọc qua giấy lọc, rồi lọc tiếp qua màng lọc 0,45µm (dung dịch thử)

Mẫu chuẩn: Kaempferol pha trong methanol loại HPLC, có nồng độ chính xác khoảng 100µg/ml.

Cách tiến hành: Chấm riêng biệt lên bản mỏng các vết M₁(1)-M₂(2)-M₃(3) – Chuẩn kaempferol(4). Dung môi khai triển: Toluene-Ethyl acetat-Acid formic (5:4:1). Thuốc thử phát hiện vết: FeCl₃ 1 % trong MeOH

Định tính alkaloid:

Mẫu thử: Cân chính xác 10 g bột dược liệu ngâm chiết với methanol ở nhiệt độ phòng rồi xử lý theo một quy trình chiết alkaloid để thu được alkaloid toàn phần. Hòa tan và chuyển toàn bộ alkaloid toàn phần vào bình định mức 10 ml bằng acid hydrochloric 0,1 N, thêm acid đến vạch, lắc đều, lọc. Hút 3 ml dịch lọc nạp lên cột SPE, rửa giải bằng hỗn hợp dung môi: Đệm kali dihydrophosphat 100mM, pH 3 - acetonitril (9:1) (3ml x 2 lần). Dịch rửa giải được sử dụng làm mẫu phân tích.

Mẫu chuẩn: Chuẩn crinamidin pha trong đệm kali dihydrophosphat 100mM, pH 3 - acetonitril (9:1), có nồng độ chính xác khoảng 150µg/ml.

Cách tiến hành: Chấm riêng biệt lên bản mỏng các vết M₁(1)-M₂(2)-M₃(3) - Chuẩn crinamidin(4). Dung môi khai triển: Cloroform - methanol - nước (65:35:20). Thuốc thử phát hiện vết: Dragendorff.

Định lượng kaempferol và crinamidin bằng phương pháp HPLC: Áp dụng phương pháp định tính, định lượng crinamidin và kaempferol trong dược liệu TNHC đã được xây dựng, thẩm định và áp dụng tại Trung tâm Kiểm nghiệm thuốc, mỹ phẩm, thực phẩm thành phố Hồ Chí Minh.

Định lượng kaempferol

Mẫu thử và mẫu chuẩn được chuẩn bị như phần định tính bằng sắc ký lớp mỏng.

Điều kiện sắc ký: Máy HPLC hiệu Shimadzu, detector PDA 320 nm, cột RP 18 (250 x 4,6 mm;

5µm), **Pha động:** Acetonitril - Đệm kali dihydrophosphat 100 mM, pH 3 với chương trình rửa giải như sau:

| Chương trình pha động | | |
|------------------------------|----------------------|-----------------------------|
| Thời gian (phút) | % acetonitril | % đệm phosphat, pH 3 |
| 0→20 | 20 | 80 |
| 20→30 | 25 | 75 |
| 30→55 | 30 | 70 |

Tốc độ dòng: 1,5 ml/phút, thể tích tiêm : 20 µl, nhiệt độ phân tích : 30°C.

Tiến hành sắc ký: Tiến hành tiêm các dung dịch chuẩn, dung dịch thử lên hệ thống sắc ký, ghi sắc ký đồ, đánh giá tính thích hợp của hệ thống và hàm lượng kaempferol so với chuẩn.

Định lượng crinamidin

Mẫu thử và mẫu chuẩn được chuẩn bị như phần định tính bằng sắc ký lớp mỏng.

Điều kiện sắc ký: Máy HPLC hiệu Shimadzu, detector PDA 212 nm, cột RP 18 (250 x 4,6 mm; 5µm), **Pha động:** Acetonitril - Đệm kali dihydrophosphat 100 mM, pH 3 với chương trình rửa giải như sau:

| Chương trình pha động | | |
|------------------------------|----------------------|-----------------------------|
| Thời gian (phút) | % acetonitril | % đệm phosphat, pH 3 |
| 0 → 50 | 10 | 90 |
| 50 → 70 | 10→60 | 90→40 |
| 70 → 80 | 60→50 | 40→50 |
| 80 → 90 | 50→10 | 50→90 |
| 90 →100 | 10 | 90 |

Tốc độ dòng: 1,2 ml/phút, thể tích tiêm : 50 µl, nhiệt độ phân tích : 30°C

Tiến hành sắc ký : Tiến hành tiêm các dung dịch chuẩn, dung dịch thử lên hệ thống sắc ký, ghi sắc ký đồ, đánh giá tính thích hợp của hệ thống và hàm lượng crinamidin so với chuẩn.

Kết quả nghiên cứu và bàn luận

Kết quả phân tích sơ bộ thành phần hóa học

Mẫu nghiên cứu được chiết lần lượt với các dung môi: Ether ethylic, ethanol, nước. Dịch chiết ethanol và dịch chiết nước của mẫu hoa được chia thành 2 phần, một phần để thử nghiệm trực tiếp, một phần được thủy phân xác định aglycon của các nhóm hoạt chất. Các nhóm hoạt chất được xác định bằng các phản ứng hóa học và thuốc thử nhóm đặc hiệu:

Kết quả phân tích thu được ghi trong bảng 1

Bảng 1: Kết quả phân tích sơ bộ thành phần hóa học của hoa TNHC

| Tên dịch chiết | Các nhóm hoạt chất | | | | | | | |
|------------------------------|--------------------|---------------------------|----------|-------|---------|----------|-------------|------------|
| | Triterpenoid | Flavonoid γ -pyron | Alcaloid | Tanin | Saponin | Chất khử | Acid hữu cơ | Polyuronid |
| Dịch chiết ether | +++ | ± | | | | | | |
| Dịch chiết ethanol | | +++ | ++ | +++ | +++ | +++ | ++ | |
| Dịch chiết ethanol thủy phân | +++ | +++ | | | | | | |
| Dịch chiết nước | | + | | +++ | | +++ | + | ++ |
| Dịch chiết nước thủy phân | + | ++ | | | | | | |

toluen-EtOAc-acid formic
(5:4:1)



Hình 1: Sắc ký đồ M_1 (1), M_2 (2), M_3 (3), kaempferol (4)

$CHCl_3$ - MeOH - H₂O
(65:35:20)



Hình 2: Sắc ký đồ M_1 (1), M_2 (2), M_3 (3), crinamidin(4)

Nhận xét: Thành phần hóa học của hoa TNHC khá phong phú với các nhóm hoạt chất: triterpenoid và flavonoid tồn tại cả ở dạng tự do và dạng glycosid, nhóm alcaloid, tannin, saponin, chất khử, acid hữu cơ và hợp chất polyuronid.

Kết quả định tính xác định nhóm alcaloid và flavonoid bằng sắc ký lớp mỏng

Mẫu nghiên cứu được chuẩn bị và triển khai như trình bày trong phần phương pháp nghiên cứu. Kết quả các sắc ký đồ như sau:

Trên sắc ký đồ của flavonoid, thành phần cơ bản của 3 mẫu là tương đương, nhưng hàm lượng kaempferol mẫu 3 là cao nhất, còn mẫu 1

không có kaempferol. Trên sắc ký đồ của alcaloid, thành phần cơ bản của 3 mẫu gần giống nhau, nhưng khác nhau về hàm lượng và đều có crinamidin

Kết quả định lượng kaempferol và crinamidin bằng phương pháp HPLC

Kết quả định lượng kaempferol bằng HPLC

Với điều kiện sắc ký và phương pháp xử lý mẫu đã lựa chọn. Kết quả đánh giá tính thích hợp của hệ thống trình bày trong bảng 2. Kết quả trên cho thấy các điều kiện sắc ký đã lựa chọn và hệ thống HPLC sử dụng là phù hợp và đảm bảo sự ổn định của phương pháp định lượng kaempferol.

● Nghiên cứu – Kỹ thuật

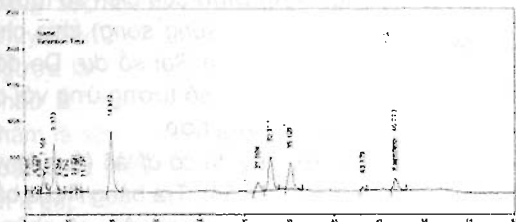
Bảng 2: Kết quả khảo sát tính thích hợp của hệ thống

| Hoạt chất | RSD của thời gian lưu (%) | RSD của diện tích pic (%) | Số đĩa lý thuyết trung bình | Hệ số bất đối trung bình |
|------------|---------------------------|---------------------------|-----------------------------|--------------------------|
| Kaempferol | 0,64 | 0,912 | 56529 | 1,08 |

Tiến hành phân tích định lượng kaempferol trong các mẫu. Kết quả được trình bày trong bảng 3.

Bảng 3: Kết quả định lượng kaempferol trong các mẫu

| Mẫu | Diện tích đỉnh | Diện tích đỉnh của chuẩn | Hàm lượng (%) kaempferol |
|----------------|----------------|--------------------------|--------------------------|
| M ₁ | 0,0 | | 0 |
| M ₂ | 205187 | 6185816 | 0,0005 |
| M ₃ | 5294801 | | 0,0132 |



Hình 3: Sắc ký đồ định lượng kaempferol trong mẫu M₃

Nhận xét: Kết quả phân tích cho thấy hàm lượng kaempferol trong mẫu M₃ là cao nhất, mẫu M₂ có hàm lượng thấp hơn mẫu M₃ khoảng 26 lần và mẫu M₁ không có kaempferol, kết quả này khẳng định rõ thêm kết quả định tính trên sắc ký lớp mỏng.

Kết quả định lượng crinamidin bằng HPLC

Với điều kiện sắc ký và phương pháp xử lý mẫu đã chọn, kết quả đánh giá tính thích hợp của hệ thống phân tích trình bày trong bảng 4.

Bảng 4: Kết quả khảo sát tính thích hợp của hệ thống

| Hoạt chất | RSD của thời gian lưu (%) | RSD của diện tích pic (%) | Số đĩa lý thuyết trung bình | Hệ số bất đối trung bình |
|------------|---------------------------|---------------------------|-----------------------------|--------------------------|
| Crinamidin | 0,932 | 0,45 | 10456 | 1,3 |

Kết quả phân tích cho thấy các điều kiện sắc ký đã lựa chọn và hệ thống HPLC sử dụng phù hợp và đảm bảo sự ổn định của phương pháp định lượng crinamidin.

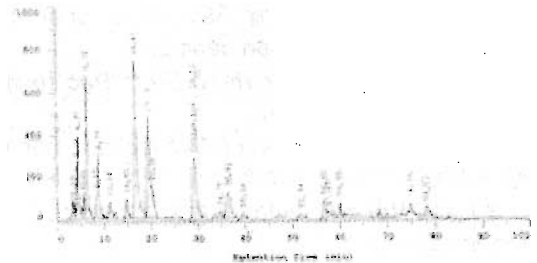
Tiến hành phân tích định lượng crinamidin

Kết quả phân tích trình bày trong bảng 5

Bảng 5: Kết quả định lượng crinamidin trong các mẫu

| Mẫu | Diện tích đỉnh | Diện tích đỉnh của chuẩn | Hàm lượng (%) crinamidin |
|----------------|----------------|--------------------------|--------------------------|
| M ₁ | 15411857 | | 0,0262 |
| M ₂ | 15486420 | 19385637 | 0,0263 |
| M ₃ | 7220052 | | 0,0122 |

Nhận xét: Kết quả định lượng cho thấy hàm lượng crinamidin trong mẫu M₁ và M₂ là giống nhau, nhưng mẫu M₃ hàm lượng crinamidin giảm xuống còn khoảng 50 % so với mẫu M₁ và M₂.



Hình 4: Sắc ký đồ định lượng crinamidin trong mẫu M₁

Kết luận

Thành phần hóa học của hoa TNHC có các nhóm chất: triterpenoid, flavonoid, alkaloid, tannin, saponin, chất khử, acid hữu cơ và hợp chất polyuronid, trong đó các hợp chất ở 2 nhóm triterpenoid và flavonoid tồn tại cả ở dạng tự do và dạng glycosid. Kết quả phân tích định tính, định lượng hai nhóm hoạt chất chính của hoa TNHC bằng các kỹ thuật sắc ký nhóm flavonoid và nhóm alkaloid cho thấy thành phần hoạt chất trong mỗi nhóm cũng rất phong phú và khác nhau cả về thành phần và tỉ lệ hoạt chất trong từng bộ phận của cành hoa. Từ kết quả phân tích này có thể kết luận: Khi sử dụng hoa TNHC làm dược liệu cho điều trị, muốn có kết quả trị liệu ổn định cần thiết lập một quy trình thu hái từng bộ phận của cành hoa TNHC thật chặt chẽ về thời điểm và bộ phận thu hái, không nên thu hái cả cành hoa cùng một lúc.

Summary

By various chemical reactions and extracts, triterpenoid, flavonoid, alkaloid, tannin, saponin, reducers, organic acid and polyuronid were (Xem tiếp trang 59)

Lẽ ra mắt... (Tiếp theo trang 60)

Nội dung Tạp chí có 3 mảng lớn là dược phẩm, mỹ phẩm và cuộc sống tươi đẹp với 30 chuyên mục và phát hành hàng tháng. Tạp chí sẽ đăng tải những chính sách mới nhất, các văn bản ban hành về quản lý, giá cả dược mỹ phẩm, những vấn đề thời sự của ngành y tế. Hội đồng cố vấn của Tạp chí gồm các chuyên gia đầu ngành về dược, mỹ phẩm và các phòng ban chức năng của Cục Quản lý Dược - Bộ Y tế sựcung cấp và thẩm định thông tin.

Ông Trương Quốc Cường – Cục trưởng Cục Quản lý dược cho biết, Tạp chí Dược và Mỹ phẩm sẽ làm cầu nối thông tin đa chiều, đối thoại và tương tác giữa các bên liên quan trong lĩnh vực dược, mỹ phẩm; góp phần nâng cao nhận thức của cộng đồng trong tiêu dùng dược, mỹ phẩm. Tạp chí cũng là cẩm nang cần thiết và tuyệt đối tin cậy cho mỗi gia đình để hiểu và sử dụng đúng các loại thuốc, mỹ phẩm, bảo vệ sức khỏe.

P.V

Nghiên cứu... (Tiếp theo trang 43)

4. Shestopalov (2005), Biological functions of allantoin, *Biologyco Bulletin* 33, pp. 437-440.

5. Sean C Sweetman, Martindale the complete drug reference, *Pharmaceutical Press*, (2009) p.1575-1576.

6. Wu Chungao, Application of allantoin in preparation of medicament for treating gallbladder disease and gastrointestinal convulsion. (2009) CN

patent101347739.

7. *British Pharmacopoeia* (2009), CD – rom.

8. *USPharmacopoeia* 30-NF25, p.1230.

9. Ludwig J. Christmann (1956), Manufacture of allantoin, US patent 2,802,011.

10. Wenqiang Sang (2008), *Novel allantoin synthesis process* CN patent 1013281.

Thành phần hóa học... (Tiếp theo trang 55)

identified from the flowers of the *crinum latifolium*. On the basis of TLC and HPLC methods, The quantity and composition of alkanoids and flavonoids were determined to be changed from the various parts of flowers.

Tài liệu tham khảo

1. Nguyễn Thị Minh, Nguyễn Ngọc Hạnh, Nguyễn Thanh Hồng, Nguyễn Thị Ngọc Trâm. Thành phần hóa học cao ether petrol của hoa cây trinh nữ hoàng cung. *Tuyển tập công trình nghiên cứu khoa học công nghệ năm 2001*, tr 94-100

2. Nguyễn Tuấn Anh, Phạm Thị Giảng, Trịnh Văn Quý. Nghiên cứu định tính, định lượng crinamidin trong dược liệu và viên nang trinh nữ hoàng cung

bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao. *Tạp chí kiểm nghiệm thuốc*, số 4, 2006, tập 4, tr 10-14

3. Nguyễn Văn Đán, Nguyễn Việt Tựu. Phương pháp nghiên cứu hóa học cây thuốc. *Nhà xuất bản Y học*, 1985

4. Bộ môn Dược liệu. Phương pháp nghiên cứu dược liệu. *Đại học Y Dược TP. Hồ Chí Minh*. 9-2005

5. Shibnath Ghosal and Sushil K.Singh. Chemical constituents of Amaryllidacea. Part 24. Crinafoline and Crinafolidine, two anti-tumor alkaloids from *Crinum latifolium*. *j.chem.research(s)*.1986, 312-313

6. Shibnath Ghosal, Sankara Unnikrishan and Sushil K. Singh. Occurrence of two epimeric alkaloids and metabolism compared with lycorine in *Crinum latifolium*. *Phytochemistry*, Volume 28, Issue 9,1989, pp2535-2537

Đính chính

Tạp chí Dược học số 394 (tháng 2-2009), trang 29-33, trong bài "Tổng hợp và tác dụng sinh học của dẫn chất benzothiazol: Các (benzothiazol-2-yl) cyclopropanocarboxamid" của các tác giả: Phan Thị Phương Dung, Nguyễn Cẩm Hương, Nguyễn Hải Nam, do sơ xuất của của tác giả, có hai lỗi do đánh máy, xin được sửa như sau:

- Trang 31, bảng 1, đã in là "Strep", xin sửa là "Amp";

= Trang 32, bảng 2, đã in là "MCF7-MDR", "PDT", xin sửa thành "MCF7-ADR", "DPT" (*Deoxy podophylotoxin*).

Rất mong được bạn đọc thứ lỗi!