

# Xây dựng quy trình định lượng germacron trong cao chiết từ rễ củ cây sâm đá (*Curcuma singularis*) bằng phương pháp sắc kí lỏng hiệu năng cao

Nguyễn Việt Cường<sup>3\*</sup>, La Thị Hồng Lan<sup>3</sup>, Lê Thành Long<sup>1</sup>  
Hoàng Nghĩa Sơn<sup>1</sup>, Đoàn Chính Chung<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Viện Sinh học Nhiệt đới - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

<sup>2</sup> Học viện Khoa học và Công nghệ - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

<sup>3</sup> Khoa Dược, Trường Đại học Lạc Hồng

## Summary

Germacrone in *Curcuma singularis* extract has a number of biological activities, especially anticancer. An HPLC method was developed for quantitative analysis of germacrone in the extract. A Phenomenex Gemini C18 column (250 mm x 4.6 mm, 5  $\mu$ m) was used. Column temperature was 25 °C, injection volume - 50  $\mu$ l, detector DAD - 214 nm. Mobile phase - acetonitrile and water (48.5 : 51.5), in isocratic mode, flow rate - 1 ml/min. The method was validated in terms of specificity, system suitability, precision, accuracy and linear range. All data proved the proposed method was suitable for determination of germacrone in *Curcuma singularis* extracts.

**Keywords:** *Curcuma singularis*, sâm đá, germacrone, HPLC.

## Đặt vấn đề

Cây sâm đá hay còn gọi là cây khỏe, có tên khoa học là *Curcuma singularis*, thuộc chi Nghệ (*Curcuma*), họ gừng (*Zingiberaceae*), bộ gừng (*Zingiberales*). Cây sâm đá được phát hiện lần đầu tiên ở Việt Nam và phân bố chủ yếu ở các vùng diện tích nhỏ thuộc Huyện Kbang (Gia Lai) và Huyện Kplông (Kon Tum). Một số hợp chất đáng chú ý với hàm lượng cao trong cao chiết từ rễ (củ) cây sâm đá như camphor (25,83%), germacron (8,00%), caryophyllen oxid (4,48%), terpinen-4-ol (3,84%) và germacron-4,5-epoxid (3,84%) [1]. Trong đó, germacron là hợp chất đáng chú ý được phát hiện thấy trong cây sâm đá. Germacron sở hữu một số hoạt tính sinh học như kháng viêm và kháng ung thư. Germacron cảm ứng apoptosis tế bào ung thư gan HepG2 thông qua việc ức chế con đường tín hiệu JAK2/STAT3 [2]. Nghiên cứu của Zhong cho thấy hiệu quả ức chế sự tăng sinh của germacron trên các dòng tế bào ung thư vú MCF-7 và MDA-MB-231 [3]. Nghiên cứu này cũng cho thấy hiệu quả cộng hợp giữa germacron

và thuốc điều trị ung thư (methotrexat và 5-fluorouracil) trong việc tiêu diệt tế bào ung thư vú [4]. Một nghiên cứu khác cho thấy tác dụng ức chế tăng sinh của germacron đối với các tế bào u thần kinh đệm thông qua việc điều hòa biểu hiện các protein liên quan tới con đường apoptosis [5]. Các kết quả nghiên cứu trên cho thấy tiềm năng kháng ung thư của hợp chất germacron. Do vậy, nghiên cứu được tiến hành với mục tiêu xây dựng quy trình định lượng chuẩn germacron trong cao chiết từ rễ (củ) cây sâm đá, từ đó làm tiền đề cho các nghiên cứu tiếp theo trên cây này.

## Nguyên liệu và phương pháp

### Nguyên liệu



Hình 1. Hình thái của rễ củ cây sâm đá (A) và bột dược liệu từ củ sâm đá (B)

Cây sâm đá được thu nhập tại Huyện Kbang, Tỉnh Gia Lai tại các thời điểm khác nhau

Chịu trách nhiệm: Nguyễn Việt Cường  
Email: nguyenvietcuong.shin@gmail.com  
Ngày nhận: 15/3/2021  
Ngày phản biện: 29/3/2021  
Ngày duyệt bài: 20/5/2021

(tháng 5/2019, tháng 10/2019 và tháng 3/2020). Định danh thực vật học được tiến hành bởi TS. Đặng Văn Sơn, tại Viện Sinh học Nhiệt đới. Mẫu định danh (ITB-2019-002) được lưu giữ tại Viện Sinh học Nhiệt đới, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam. Rễ củ cây sâm đá được rửa sạch, cắt lát, sấy khô và tạo bột dược liệu (hình 1).

#### Dung môi hóa chất

Chất đối chiếu: Germacron (TRC, Canada).

Các dung môi, hóa chất sử dụng đạt tiêu chuẩn sử dụng cho HPLC (Merck, Hoa Kỳ).

#### Thiết bị và dụng cụ nghiên cứu

Hệ thống sắc kí lỏng hiệu năng cao Agilent 1260 Quaternary pump G1311, Standard Autosampler G1329, Diode Array and Multiple Wavelength Detector G1315. Cột phân tích Phenomenex Gemini C18 (250 x 4,6 mm, 5 μm). Cân phân tích Sartorius Practum 224-1S độ chính xác ± 0,1 mg. Bể siêu âm Elma S180H. Bình định mức, pipet và các dụng cụ thủy tinh có độ chính xác phù hợp.

#### Phương pháp nghiên cứu

**Điều kiện sắc kí:** Cột sắc kí pha đảo Phenomenex Gemini C18 (250 mm x 4,6 mm, 5 μm), nhiệt độ cột 25 °C, thể tích tiêm mẫu 50 μl, đầu dò DAD phát hiện ở bước sóng 214 nm. Pha động đẳng dòng acetonitril - nước (48,5: 51,5), tốc độ dòng 1 ml/phút.

**Chuẩn bị mẫu đối chiếu:** Cân chính xác khoảng 45 mg chất chuẩn germacron, hòa tan trong bình định mức 100 ml với dung môi dimethylsulfoxid. Lấy chính xác 1 ml dung dịch thu được pha loãng trong bình định mức 50 ml với dung môi pha động của điều kiện sắc kí. Tiếp tục pha lấy chính xác 10 ml dung dịch vừa thu được cho vào bình định mức 25 ml, thêm dung môi pha động, lắc đều. Lọc qua màng lọc 0,45 μm. Dung dịch đối chiếu có nồng độ khoảng 3,6 mcg/ml.

**Chuẩn bị mẫu thử:** Cân chính xác khoảng 200 mg cao chiết từ cây sâm đá cho vào bình định mức 100 ml, thêm khoảng 80 ml dimethylsulfoxid, siêu âm không gia nhiệt trong 20 phút, thêm dung môi dimethylsulfoxid đến vạch, lắc đều. Lấy chính xác 5 ml dung dịch thu được cho vào bình định mức 100 ml, thêm dung môi pha động của điều kiện sắc kí đến vạch, lắc đều. Dung dịch mẫu thử được lọc qua màng lọc 0,45 μm.

Hàm lượng % germacron trong cao chiết được tính theo công thức:

$$X(\%) = \frac{S_t}{S_c} \times \frac{m_c \times C\%}{D_c} \times \frac{D_t}{m_t \times (1 - H\%)} \times 100$$

Trong đó:

$X$ : hàm lượng (%) germacron có trong cao chiết.

$S_t$ : diện tích pic của germacron trong dung dịch thử.

$S_c$ : diện tích pic của germacron trong dung dịch đối chiếu.

$D_t$ : độ pha loãng mẫu thử.

$D_c$ : độ pha loãng mẫu đối chiếu.

$H\%$ : hàm ẩm của cao chiết.

$C\%$ : hàm lượng chất chuẩn germacron.

$m_c$ : khối lượng đối chiếu (mg).

$m_t$ : khối lượng cao cần để pha mẫu thử (mg).

**Thẩm định quy trình phân tích:** Quy trình phân tích vừa xây dựng được thẩm định tính đặc hiệu, tính tương thích hệ thống, độ đúng, độ chính xác (độ lặp lại, độ chính xác trung gian) và khoảng tuyến tính theo hướng dẫn của ICH [6].

#### Kết quả nghiên cứu

##### Khảo sát tỷ lệ dung môi pha động trong điều kiện sắc kí

Tiến hành sắc kí với tỷ lệ dung môi pha động theo tài liệu tham khảo: Acetonitril - nước - methanol - acid phosphoric (550:225:225:1). Kết quả thu được cho thấy pic germacron có thời gian lưu ngắn nhưng bị dính với pic của các chất khác có trong mẫu thử. Tiến hành giảm tỷ lệ acetonitril và methanol trong hỗn hợp dung môi pha động về acetonitril - nước - acid phosphoric (50:50:0,1) thấy pic germacron đã tách hẳn khỏi các pic lớn khác trong sắc kí đồ mẫu thử nhưng độ tinh khiết pic chưa đạt yêu cầu. Tiếp tục thay đổi tỷ lệ dung môi thấy với tỷ lệ acetonitril - nước (48,5:51,5) pic germacron đạt yêu cầu về độ tinh khiết pic với đầu dò DAD. Acid phosphoric không ảnh hưởng đến kết quả thu được. Từ kết quả khảo sát trên tỷ lệ dung môi pha động được lựa chọn như phần điều kiện sắc kí đã trình bày.

##### Thẩm định quy trình phân tích

**Bảng 1. Kết quả thẩm định tính tương thích hệ thống**

STT	$t_R$ (phút)	$S_{pic}$ (μAU.s)	Hệ số đối xứng	Số đĩa lý thuyết
1	47,967	405,075	0,937	20253
2	48,046	403,968	0,921	20321
3	48,073	406,768	0,970	20343
4	48,125	407,862	0,925	20390
5	48,105	407,535	0,928	20032
6	48,087	407,286	0,964	19402
<b>TB</b>	48,067	406,416		
<b>SD</b>	0,056	1,550		
<b>RSD%</b>	0,117	0,381		

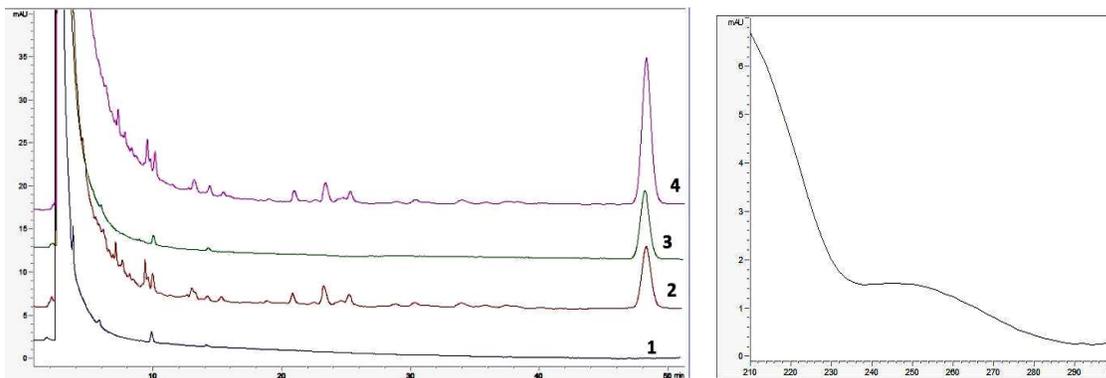
### Tính tương thích hệ thống

Tiến hành sắc kí 6 lần liên tiếp mẫu hỗn hợp đối chiếu ở nồng độ 100% nồng độ khảo sát theo điều kiện đã chọn. Kết quả thời gian lưu và diện tích pic được trình bày trong bảng 1.

Kết quả thẩm định cho thấy thời gian lưu và diện tích pic của germacron ở 6 lần sắc kí khác nhau có RSD < 2% và có hệ số đối xứng cũng như số đĩa lý thuyết đạt yêu cầu. Vậy quy trình định lượng đạt tính tương thích hệ thống.

### Độ đặc hiệu

Kết quả cho thấy sắc ký đồ của mẫu đối chiếu germacron và mẫu thử cho pic có thời gian lưu tương tự nhau (hình 2). Phổ UV của pic trong mẫu germacron đối chiếu và mẫu thử có hình dạng và các đỉnh hấp thụ cực đại tương tự nhau. Sắc ký đồ của mẫu dung môi không xuất hiện pic ở trong khoảng thời gian lưu tương ứng với pic đối chiếu. Sắc ký đồ của mẫu thử thêm đối chiếu cho pic có thời gian lưu tương tự với pic của mẫu đối chiếu và mẫu thử nhưng có diện tích pic lớn hơn. Như vậy quy trình có tính đặc hiệu.



Hình 2. Sắc ký đồ mẫu dung môi (1), mẫu thử (2), mẫu đối chiếu (3), mẫu thử thêm đối chiếu (4) và phổ UV của germacron

### Khoảng tuyến tính

Chuẩn bị các dung dịch germacron đối chiếu có nồng độ tương ứng 25%, 50%, 100%, 175%, 250% so với nồng độ khảo sát ở bảng 2. Tiến hành sắc kí các mẫu hỗn hợp đối chiếu trên.

Bảng 2. Kết quả thẩm định khoảng tuyến tính

Nồng độ germacron đối chiếu (mcg/ml)	Diện tích pic ( $\mu$ AU.s)
0,9	99,756
1,8	207,678
3,6	410,797
6,3	735,358
9	1053,225

Sử dụng trắc nghiệm thống kê F cho thấy có sự tương quan chặt chẽ giữa nồng độ đối chiếu và diện tích pic thu được trên sắc ký đồ với hệ số tương quan  $R^2 = 0,99996$ . Trắc nghiệm t cho thấy hệ số tự do trong phương trình hồi quy không có ý nghĩa thống kê ( $\alpha = 0,01$ ). Vậy phương trình hồi quy tuyến tính  $y = 117,7078x$ .

### Độ lặp lại

Tiến hành sắc ký sáu mẫu thử được chuẩn bị theo quy trình định lượng thu được kết quả theo bảng 3.

Bảng 3. Kết quả thẩm định độ lặp lại

TT	Khối lượng cân mẫu thử (mg)	Diện tích pic ( $\mu$ AU.s)	Hàm lượng germacron trong cao (%)
1	205,0	370,834	3,205
2	202,0	369,301	3,239
3	204,5	370,158	3,207
4	206,0	376,251	3,236
5	206,4	382,176	3,280
6	204,8	374,21	3,237
<b>Trung bình</b>			3,234
<b>SD</b>			0,028
<b>RSD%</b>			0,851

Kết quả cho thấy RSD% của giá trị hàm lượng germacron khi tiến hành sắc kí 6 mẫu thử riêng biệt nhỏ hơn 2%. Quy trình định lượng đạt yêu cầu về độ lặp lại.

**Bảng 4. Kết quả thẩm định độ chính xác trung gian**

TT	Khối lượng cân mẫu thử (mg)	Diện tích pic ( $\mu$ AU.s)	Hàm lượng germacron trong cao (%)
1	208,9	397,935	3,375
2	204,6	375,941	3,255
3	206,7	389,536	3,339
4	206,2	381,864	3,281
5	200,4	379,813	3,298
6	205,7	390,945	3,367
<b>Trung bình</b>			3,319
<b>SD</b>			0,048
<b>RSD%</b>			1,460

**Độ chính xác trung gian**

Tiến hành sắc kí sáu mẫu thử khác được tiến hành bởi một người thực hiện khác ở một ngày khác. Kết quả độ chính xác trung gian được thể hiện theo bảng 4. Trắc nghiệm thống kê cho thấy kết quả hàm lượng các chất thu được ở hai lần thực hiện khác nhau không có ý nghĩa ( $\alpha = 0,01$ ). Quy trình định lượng đạt yêu cầu độ chính xác trung gian.

**Độ đúng**

Tiến hành sắc ký các mẫu thử thêm đối chiếu ở các mức nồng độ 80%, 100% và 120%, mỗi nồng độ thực hiện ba mẫu riêng biệt. Kết quả độ đúng được thể hiện theo bảng 5. Kết quả cho thấy tỷ lệ hồi phục của chín mẫu đều nằm trong khoảng 98 - 102% và RSD nhỏ hơn 2%. Quy trình định lượng đạt yêu cầu độ đúng.

**Bảng 5. Kết quả thẩm định độ đúng**

Nồng độ đối chiếu thêm vào	Lượng đối chiếu thêm vào (mg)	Diện tích pic ( $\mu$ AU.s)	Lượng đối chiếu tìm thấy (mg)	Tỷ lệ hồi phục (%)
80%	36	711,163	35,638	98,994
	36	708,768	35,372	98,256
	36	717,277	36,313	100,870
	<b>Trung bình</b>			99,373
	<b>RSD%</b>			1,356
100%	45	790,646	44,429	98,732
	45	803,241	45,824	101,832
	45	797,524	45,193	100,429
	<b>Trung bình</b>			100,331
	<b>RSD%</b>			1,547
120%	54	870,690	53,298	98,700
	54	874,505	53,719	99,480
	54	869,196	53,132	98,393
	<b>Trung bình</b>			98,858
	<b>RSD%</b>			0,567

**Ứng dụng quy trình định lượng germacron**

**Bảng 6. Kết quả định lượng germacron trong các mẫu cao khác nhau**

Mẫu cao	Khối lượng cân mẫu thử (mg)	Diện tích pic ( $\mu$ AU.s)	Hàm lượng germacron trong cao (%)
M1	198,2	357,815	3,198
	198	350,903	3,140
	198,6	355,689	3,173
M2	200,0	177,755	1,575
	198,7	175,969	1,569
	198,8	170,024	1,515
M3	200,0	152,514	1,351
	196,3	155,262	1,401
	198,5	152,610	1,362

Quy trình định lượng sau khi được thẩm định được áp dụng để xác định nồng độ germacron có trong cao chiết từ sâm đá ở những thời điểm khác nhau (bảng 6).

### **Kết luận**

Germacron trong cây sâm đá có tác dụng kháng ung thư hiệu quả, đã được kiểm chứng bằng nhiều nghiên cứu dược lý. Nghiên cứu này đã xây dựng được quy trình định lượng germacron trong cao chiết từ cây sâm đá. Quy trình được thẩm định theo hướng dẫn của ICH cho kết quả phù hợp với yêu cầu. Ứng dụng quy trình vào định lượng các mẫu cao chiết sâm đá có thời điểm thu hái khác nhau nhận thấy yếu tố này có ảnh hưởng đến hàm lượng germacron.

### **Tài liệu tham khảo**

1. Nguyen Manh Cuong, Doan Thi Van, Ninh The Son, To Dao Cuong, Pham Ngoc Khanh, Vu Thi Ha, Tran Thu Huong, Nguyen Phuong Hanh, Nguyen Quoc Bin (2016), "Initial research on chemical constituents of *Curcuma singularis* rhizomes", *Journal of Science and Technology*, 54 (2C), pp. 402-408.
2. Liu Y., Wang W., Fang B., Ma F., Zheng Q., Deng P., Zhao S., Chen M., Yang G., He G. (2013), "Anti - tumor effect of germacron on human hepatoma cell lines through inducing G2/M cell cycle arrest and promoting apoptosis", *Eur. J. Pharmacol.*, 698 (1-3), pp. 95-102.
3. Zhong Z., Chen X., Tan W., Xu Z., Zhou K., Wu T., Cui L., Wang Y. (2011), "Germacron inhibits the proliferation of breast cancer cell lines by inducing cell cycle arrest and promoting apoptosis", *Eur. J. Pharmacol.*, 667 (1-3), pp. 50-55.
4. Lim M. S., Chung S. Y., Jeong K. W. (2016), "Germacron inhibits estrogen receptor  $\alpha$ -mediated transcription in MCF-7 breast cancer cells", *Phytother. Res.*, 30 (12), pp. 2036-2043.
5. Liu B., Gao Y. Q., Wang X. M., Wang Y. C., Fu L. Q. (2014), "Germacron inhibits the proliferation of glioma cells by promoting apoptosis and inducing cell cycle arrest", *Mol. Med. Rep.*, 10 (2), pp. 1046-1050.
6. ICH (2005), "Validation of analytical procedures: Text and methodology Q2R1".