

Phân lập và xây dựng quy trình định lượng một số hợp chất hướng tác dụng chống oxy hoá của cây móng bò leo (*Bauhinia bracteata* Benth. Fabaceae)

Nguyễn Thị Thu Hạnh¹, Nguyễn Đức Tuấn^{2*}

¹Khoa Dược, Trường Đại học Buôn Ma Thuột

²Khoa Dược, Đại học Y Dược Thành phố Hồ Chí Minh

Summary

Bauhinia bracteata Benth. Fabaceae is a species that grows a lot in Dak Lak province, and belongs to the *Bauhinia* genus. This genus contains many common species in Vietnam that have the main chemical components such as flavonoid, tannin, organic acid,... with important bioactivities such as antioxidants, antibacterials, anti - inflammatories, anti-hyperglycemias, and anti-diarrheas,... So far, there have been no published studies on phytochemicals and bioactivities of *Bauhinia bracteata*. Therefore, this study was conducted with the aim of contributing to determine chemical composition, and demonstrate antioxidant activity of *Bauhinia bracteata*. Leaves of *Bauhinia bracteata* were collected in March 2019 at Thanh Nhat ward, Buon Ma Thuot City, Dak Lak province. The morphological characteristics and microsurgery of leaves, and ADN analysis of *Bauhinia bracteata* were determined. The total and insoluble ash, and humidity were 8.18%, 0.40%, and 9.08%, respectively. The content of extractable substances in 80% alcohol was 15.15%. The main chemical components in *Bauhinia bracteata* leaves were flavonoid, tannin, organic acid, saponin,... By using exhausted extraction and evaporation methods and combining with liquid – liquid partition extraction, the n-hexane (18 g), chloroform (40 g), and ethyl acetate (120 g) extracts were obtained from 6 kg of *Bauhinia bracteata* leaves. Among of them, ethyl acetate extract showed the highest antioxidant activity. Ethyl gallate (46 mg, chromatographic purity over 98%), gallic acid (540 mg, purity over 97%), hyperin (148 mg, purity over 98%), and myricitrin (38 mg, purity over 96%) were isolated from 60 g of ethyl acetate extract. All isolated compounds had lower IC₅₀ than ascorbic acid. Gallic acid showed the lowest (2.93 µg/ml), thus the strongest antioxidant activity and 2.95 times stronger than ascorbic acid. Ethyl gallate and myricitrin, and hyperin showed 2.73, 2.36 times stronger than ascorbic acid, respectively. The HPLC-PDA method for simultaneous determination of gallic acid and hyperin was developed and validated, using mixture of methanol and 0.1% phosphoric acid pH 3.5 (40:60) as mobile phase in isocratic mode, and InertSustain C18 column (250 x 4.6 mm; 5 µm). Validation results showed that the method was suitable for the HPLC system, selective, wide linearity range, low detection and quantitation limits, high accurate and precise, and conformed the requirements for a quantitative determination process. The results of this study contributed to phytochemical and bioactivity database of *Bauhinia bracteata*, and refer to further studies on chemical composition as well as biological activities of this plant.

Keywords: *Bauhinia bracteata*, ethyl gallate, gallic acid, hyperin, myricitrin.

Đặt vấn đề

Chi *Bauhinia* đã được biết có một lịch sử lâu dài về tác dụng điều trị các bệnh cấp tính và mạn tính như kháng khuẩn, kháng viêm, giảm đau, sỏi mật, hạ đường huyết,... trong y học dân gian và y học cổ truyền [1]. Trong thời gian

Chịu trách nhiệm: Nguyễn Đức Tuấn

Email: ductuan@ump.edu.vn

Ngày nhận: 17/01/2021

Ngày phản biện: 22/01/2021

Ngày duyệt bài: 19/02/2021

gần đây trên thế giới đã có một số công trình nghiên cứu thành phần hóa học và hoạt tính sinh học như chống oxy hóa, kháng khuẩn... từ vỏ, hạt, lá, hoa và vỏ thân của nhiều loài trong chi này như *B. variegata*, *B. purpurea*, *B. vahlii*, *B. forficata* [2-6]. Chi *Bauhinia* có khoảng 300 loài, ở Việt Nam có khoảng 33 loài trong đó *Bauhinia bracteata* Benth. gặp nhiều ở Đắk Lắk, người dân nơi đây còn gọi là móng bò leo hay móng bò rừng, thường dùng lá để hãm nước uống hàng ngày theo kinh nghiệm dân gian nhằm bảo vệ sức khỏe, chống bệnh tật hay trị sỏi mật, hạn chế sỏi tái phát... Tuy đã có công bố về phát hiện loài này trên thế giới và được mô tả về đặc điểm sinh thái, phân bố, phân loại thực vật trong nhiều sách về thực vật tại Việt Nam của nhiều tác giả như Võ Văn Chi, Phạm Hoàng Hộ; nhưng cho đến nay, chưa có tác giả nào công bố kết quả nghiên cứu cụ thể về *Bauhinia bracteata* Benth. ở trong nước cũng như trên thế giới. Xuất phát từ những lý do trên, nghiên cứu này công bố các kết quả đầu tiên về phân lập, xác định cấu trúc các hợp chất từ dịch chiết ethyl acetat của lá cây móng bò leo và tác dụng chống oxy hóa so với acid ascorbic nhằm chứng minh giá trị y học về tác dụng chống oxy hóa của loài *B. bracteata* với các loài khác trong chi đã được biết đến. Xây dựng quy trình định lượng một số hợp chất này bằng phương pháp **HPLC** góp phần làm phong phú thêm kho tàng tri thức về cây thuốc và đa dạng của nguồn thảo dược hướng tác dụng chống oxy hóa tại Việt Nam.

Nguyên vật liệu và phương pháp nghiên cứu

Nguyên liệu

Lá móng bò leo thu hái vào tháng 3/2019 tại phường Thành Nhất, thành phố Buôn Ma Thuột, tỉnh Đắk Lắk.

Chất chuẩn đối chiếu: Acid ascorbic hàm lượng 99,7% được cung cấp bởi Viện Kiểm nghiệm Thuốc TP. Hồ Chí Minh; thuốc thử DPPH của Sigma Aldrich.

Hóa chất, dung môi: Silica gel cỡ hạt 40 – 63 μm . Cồn 96%, *n*-hexan, cloroform, ethyl acetat, methanol, sắt (III) clorid, vanilin, acid sulfuric, acid formic, acid phosphoric đạt tiêu chuẩn phân tích. Methanol, acetonitril và nước cất đạt tiêu chuẩn dùng cho sắc ký lỏng.

Thiết bị

Các thiết bị phân tích thường quy và dụng cụ thủy tinh, bình định mức, pipet, micropipet, hệ thống HPLC Water e2690 – đầu dò PDA 2998, máy UV – Vis UH5300, cân phân tích, bể siêu âm, bộ soi bản mỏng, bình hút ẩm, tủ sấy, máy cô quay, bản mỏng silica gel GF₂₅₄.

Phương pháp nghiên cứu

Khảo sát thực vật và phân tích ADN để định danh và kiểm tra chính xác tới loài thực vật nghiên cứu, sau đó thử tinh khiết và xác định các chất chiết được trong các dung môi khác nhau, từ đó lựa chọn dung môi chiết cho khối lượng chất chiết được cao và ít tạp để tiến hành chiết cao toàn phần trên lượng lớn dược liệu, tiếp tục phân tích sơ bộ thành phần hóa thực vật để xác định nhóm hoạt chất chính của loài từ đó lựa chọn các dung môi có độ phân cực tăng dần để chiết các cao phân đoạn chứa nhóm hoạt chất chính từ cao toàn phần đã thu được. Sàng lọc hoạt tính chống oxy hóa của các cao phân đoạn của lá móng bò leo bằng phương pháp **DPPH** [7-8] để xác định cao phân đoạn có hoạt tính chống oxy hóa cao nhất; từ đó áp dụng các phương pháp chiết xuất thường quy như chiết ngâm kiệt, lắc phân bố lỏng - lỏng, phân lập bằng kỹ thuật sắc ký cột và dựa trên các dữ liệu phổ **UV-Vis**, **IR**, **MS** và **NMR** để xác định cấu trúc các hợp chất tinh khiết có hoạt tính chống oxy hóa cao từ cao phân đoạn có hoạt tính chống oxy hóa cao nhất. Sau đó xác định khả năng chống oxy hóa và IC₅₀ của các hợp chất phân lập. Xây dựng quy trình định lượng các hợp chất phân lập trong lá móng bò leo bằng phương pháp **HPLC** thông qua khảo sát các điều kiện sắc ký ảnh hưởng đến hiệu quả tách của phương pháp như tỷ lệ pha động và nồng độ acid phosphoric. Sau khi tìm được điều kiện sắc ký thích hợp, tiến hành thẩm định quy trình phân tích theo hướng dẫn của ICH [9] và AOAC [10] bao gồm khảo sát tính phù hợp của hệ thống, tính chọn lọc, giới hạn phát hiện (LOD), giới hạn định lượng (LOQ), khoảng tuyến tính, độ chính xác và độ đúng.

Chuẩn bị mẫu

Dung môi pha mẫu: Methanol (MeOH).

Dung dịch đối chiếu gốc acid gallic:

Cân chính xác khoảng 50 mg acid gallic, cho vào bình định mức 50 ml, thêm khoảng 30 ml MeOH, lắc cho tan hoàn toàn, thêm tiếp MeOH đến vạch, lắc đều, thu được dung dịch gốc có nồng độ 1000 ppm.

Dung dịch đối chiếu gốc hyperin: Cân chính xác khoảng 50 mg hyperin, cho vào bình định mức 50 ml, thêm khoảng 30 ml MeOH, lắc cho tan hoàn toàn, thêm tiếp MeOH đến vạch, lắc đều, thu được dung dịch gốc có nồng độ 1000 ppm.

Dung dịch đối chiếu: Pha loãng các dung dịch đối chiếu gốc với MeOH để thu được dung dịch đối chiếu acid gallic có nồng độ khoảng 5 ppm và hyperin có nồng độ khoảng 20 ppm.

Dung dịch thử: Cân chính xác 20 g bột lá móng bò leo, đun hồi lưu với 75 ml cồn 80% trong 60 phút, lọc lấy dịch rồi tiến hành cô còn khoảng 30 ml, sau đó lắc phân bố lỏng – lỏng với 50 ml ethyl acetat (chia làm 3 lần), gom toàn bộ dịch chiết ethyl acetat, cô tới cạn. Hòa tan cạn bằng MeOH, cho vào bình định mức 10 ml, thêm MeOH đến vạch, lắc đều. Hút chính xác 1 ml dung dịch thu được, cho vào bình định mức 100 ml, thêm MeOH đến vạch, lắc đều.

Kết quả và bàn luận

Thực vật học

Kết quả khảo sát đặc điểm hình thái cho thấy lá móng bò leo chia thành 2 thùy ở 1/3 ngọn lá, đầu lá nhọn, gốc lá ở giữa, lá dài 9 – 15 cm, rộng 4 – 6 cm, gân lá chân vịt chia thành 4 nhánh chính, gân lá nổi rõ ở mặt dưới của lá. Lá có màu xanh nhạt, mặt trên màu đậm hơn mặt dưới, cuống lá hình trụ, dài khoảng 2-3 cm, màu xanh. Vi phẫu lá có cấu tạo đối xứng qua mặt phẳng, gồm 2 phần: Gân giữa có mặt trên lồi ít, mặt dưới lồi nhiều, tỷ lệ 1/8. Từ trên xuống dưới gồm biểu bì trên, mô dày trên, mô mềm, libe quanh tủy, có cung libe gỗ với gỗ trên, libe ở dưới mô mềm, mô dày dưới, biểu bì dưới. Thịt lá có cấu tạo dị thể không đối xứng.

Từ trên xuống dưới gồm biểu bì trên, mô mềm và biểu bì dưới. Vi học bột lá có các cấu tử đặc trưng như sau: Sợi kèm có tinh thể oxalat hình khối, lông che chở đơn bào ngắn, đầu nhọn, mảnh buồng ẩn không, lỗ khí.

Lá móng bò leo tươi thu hái được phân tích trình tự ADN và so sánh với ADN gốc trong ngân hàng gen. Quá trình giải trình tự gen cho kết quả định danh loài là *Bauhinia bracteata* với độ tương thích 100%.

Thử tinh khiết

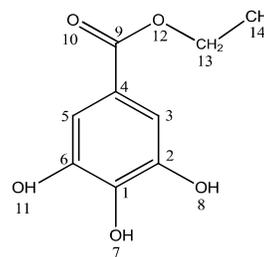
Kết quả thử tinh khiết cho thấy độ tro toàn phần là 8,18%, tro không tan trong acid 0,40% và độ ẩm 9,08%. Hàm lượng chất chiết được của dược liệu trong cồn 80% là 15,15%.

Thành phần hóa học

Thành phần hóa học trong lá móng bò leo có nhiều flavonoid, tanin, acid hữu cơ, saponin,... Bằng phương pháp chiết ngâm kiệt và cô quay, từ 6 kg lá móng bò leo với 60 lít cồn 80% đã thu được 5 lít cao toàn phần, sau đó áp dụng các phương pháp lắc phân bố lỏng – lỏng với các dung môi có độ phân cực tăng dần, cô bay hơi dung môi thu được 18 g cao *n*-hexan, 40 g cao cloroform và 120 g cao ethyl acetat, trong đó cao ethyl acetat có hoạt tính chống oxy hóa mạnh nhất. Từ 60 g cao ethyl acetat đã phân lập được 4 hợp chất **E1**, **E2**, **E3** và **E4**. Sử dụng các kỹ thuật phổ nghiệm **UV**, **IR**, **MS** và **NMR** đã xác định được cấu trúc của 4 hợp chất lần lượt là ethyl gallat (46 mg, độ tinh khiết sắc ký trên 98%), acid gallic (540 mg, độ tinh khiết trên 97%), hyperin (148 mg, độ tinh khiết trên 98%) và myricitrin (38 mg, độ tinh khiết trên 96%).

Bảng 1. Dữ liệu phổ ¹H-NMR và ¹³C-NMR của **E1** và ethyl gallat ^[11]

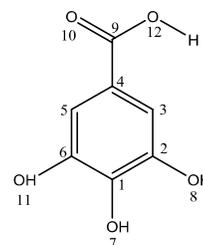
Vị trí carbon	δ_H (ppm)		δ_C (ppm)	
	E1 (500 MHz, DMSO)	Ethyl gallat (200 MHz, DMSO)	E1 (125 MHz, DMSO)	Ethyl gallat (50 MHz, DMSO)
1			139,21	138,3
2	7,06 s (2H)	6,95 s (2H)	109,69	108,4
3			146,01	145,5
4	7,06 s (2H)	6,95 s (2H)	121,35	119,6
5			146,01	154,5
6			109,69	108,4
9			164,67	165,8
13	4,27 dd (7)	4,20 dd (8)	60,91	59,9
14	4,31 dd (7)	4,32 dd (7)	14,3	14,2



E1 (Ethyl gallat)

Bảng 2. Dữ liệu phổ $^1\text{H-NMR}$ và $^{13}\text{C-NMR}$ của **E2** và acid gallic ^[12]

Vị trí carbon	δ_{H} (ppm)		δ_{C} (ppm)	
	E2 (500 MHz, DMSO)	Acid gallic (200 MHz, DMSO)	E2 (125 MHz, DMSO)	Acid gallic (50 MHz, DMSO)
1			138,18	138,3
2	6,91 s (2H)	6,18 s (2H)	147,44	145,4
3			111,35	108,7
4	6,91 s (2H)	6,18 s (2H)	123,88	120,5
5			111,35	108,7
6			147,44	145,4
9			167,37	167,4



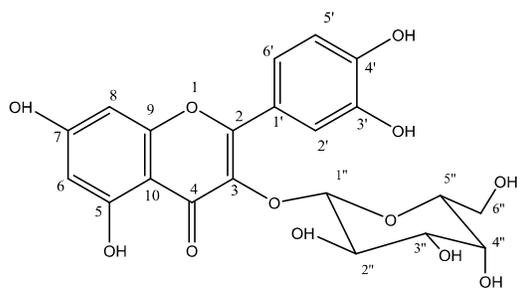
E2 (Acid gallic)

Bảng 3. Dữ liệu phổ $^1\text{H-NMR}$ và $^{13}\text{C-NMR}$ của **E3** và hyperin ^[13]

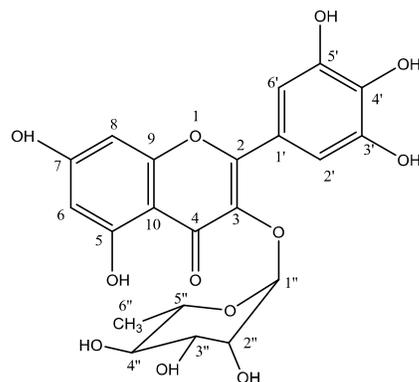
C	CHn	E3 (DMSO-d₆, 125/500 MHz)		Hyperin (DMSO-d₆)	
		δ_{C} (ppm)	δ_{H} (ppm) mult., (J / Hz)	δ_{C} (ppm)	δ_{H} (ppm) mult., (J / Hz)
2	C	156,3	-	156,2	-
3	C	133,5	-	133,5	-
4	C=O	177,5	-	177,4	-
5	C	161,2	-	161,2	-
6	CH	98,6	6,20 d (2,0)	98,6	6,20 d (1,9)
7	C	164,1	-	164,2	-
8	CH	93,5	6,40 d (2,0)	93,5	6,40 d (1,9)
9	C	156,2	-	156,3	-
10	C	103,9	-	103,8	-
1'	C	121,1	-	121,1	-
2'	CH	115,2	7,53 d (2,0)	115,8	7,54 d (2,3)
3'	C	144,8	-	144,8	-
4'	C	148,4	-	148,4	-
5'	CH	115,9	6,81 d (8,0)	115,9	6,82 d (8,5)
6'	CH	122,0	7,66 dd (8,5; 2,0)	121,9	7,66 dd (8,5; 2,0)
1''	CH	101,8	5,37 d (8,0)	101,9	5,36 d (7,7)
2''	CH	71,2	3,57 m	71,2	không ghi
3''	CH	73,2	3,37 m	73,2	không ghi
4''	CH	67,9	3,65 br s (# triplet 3 Hz)	67,9	không ghi
5''	CH	75,8	3,33 m	75,8	không ghi
6''	CH ₂	60,1	3,45 m; 3,30 m	60,1	không ghi
5-OH	-	-	12,62 s	-	12,60s
7-OH	-	-	10,85 s	-	không ghi
4'-OH	-	-	9,71 s	-	không ghi
3'-OH	-	-	9,14 s	-	không ghi

Bảng 4. Dữ liệu phổ $^1\text{H-NMR}$ và $^{13}\text{C-NMR}$ của E4 và myricitrin ^[14]

C	E4 (DMSO-d ₆ , 125/500 MHz)			Myricitrin (DMSO-d ₆ , 50/200 MHz)	
	CHn	δc (ppm)	δ _H (ppm)mult., (J / Hz)	δc (ppm)	δ _H (ppm)mult., (J / Hz)
2	C	157,4	-	159,4	-
3	C	134,4	-	136,3	-
4	C=O	177,9	-	179,7	-
5	C	162	-	163,2	-
6	CH	99,3	6,20 m (2,0)	99,8	6,22 d (1,9)
7	C	164,7	-	165,9	-
8	CH	93,9	6,36 m (2,0)	94,7	6,38 d (1,9)
9	C	157,5	-	158,5	-
10	C	104,5	-	105,9	-
1'	C	121,1	-	121,9	-
2'	CH	108,7	6,88 d (2,0)	109,6	6,97s
3'	C	146,1	-	146,8	-
4'	C	136,7	-	137,9	-
5'	CH	146,1	-	146,8	-
6'	CH	108,7	6,88 d (2,0)	109,4	6,97 s
1''	CH	102,6	5,20 s	103,6	5,33 d (2,0)
2''	CH	71	4,5 d (5,5)	72	4,24 s
3''	CH	71,2	3,55 m	72,1	3,81 d (2,5)
4''	CH	72,2	3,34 m	73,3	3,36 m
5''	CH	70,6	3,97 s	70,55	4,06 m
6''	CH ₂	17,4	0,84 d (6,5)	17,4	0,98 d (6,0)
5-OH	-	-	12,68 s	-	12,62 s
7-OH	-	-	10,86 s	-	không ghi



E3 (Hyperin)



E4 (Myricitrin)

Hoạt tính sinh học

Các cao phân đoạn có hoạt tính chống oxy hóa (HTCO) mạnh, trong đó cao ethyl acetat có HTCO cao nhất 92,74%, cao hơn gấp 1,1 lần so với acid ascorbic (88,29%). Các hợp chất phân lập đều có IC₅₀ thấp hơn so với acid ascorbic, trong đó acid gallic thấp nhất (2,93 μg/ml)

nên có hoạt tính chống oxy hóa mạnh nhất và mạnh gấp 2,95 lần so với acid ascorbic, kể đến là ethyl gallat và myricitrin gấp 2,73 lần, và hyperin gấp 2,36 lần. Bảng 5 và 6 lần lượt trình bày kết quả thử nghiệm hoạt tính chống oxy hóa của các cao phân đoạn và các chất phân lập.

Bảng 5. Kết quả thử nghiệm hoạt tính chống oxy hóa in vitro của các cao lá móng bò leo

Mẫu	Độ hấp thu tại 517 nm				HTCO (%)
	Lần 1	Lần 2	Lần 3	Trung bình	
Mẫu trắng	1,2181	1,2180	1,2180	1,2180	-
Cao toàn phần	0,3017	0,3023	0,3016	0,3018	75,22
Cao n-hexan	0,8260	0,8252	0,8246	0,8253	32,24
Cao cloroform	0,5538	0,5541	0,5385	0,5488	54,94
Cao ethyl acetat	0,0889	0,0883	0,0880	0,0884	92,74
Mẫu đối chiếu (acid ascorbic)	0,1429	0,1425	0,1424	0,1426	88,29

Bảng 6. Giá trị IC₅₀ của acid ascorbic và các chất phân lập từ lá móng bò leo

Mẫu	Phương trình hồi quy	R ²	Giá trị IC ₅₀ (µg/ml)
Acid ascorbic	y = 75,8091x - 0,2027	0,9999	8,64
Ethyl gallat	y = 16,049x - 0,487	1	3,15
Acid gallic	y = 16,238x + 2,4351	1	2,93
Hyperin	y = 13,17x + 1,9113	0,9999	3,65
Myricitrin	y = 15,057x + 2,2602	1	3,17

Xây dựng quy trình định lượng đồng thời acid gallic và hyperin trong lá móng bò leo bằng phương pháp HPLC

Acid gallic và hyperin được phân lập với khối lượng trên 100 mg nên được lựa chọn là đối tượng định lượng khi xây dựng quy trình định lượng các hợp chất phân lập trong lá móng

bò leo bằng phương pháp **HPLC**. Dựa vào phổ **UV** của acid gallic và hyperin, bước sóng phát hiện được lựa chọn là 254 nm.

Khảo sát điều kiện sắc ký

Bảng 7 tóm tắt kết quả khảo sát pha động và nồng độ acid phosphoric khi tiến hành sắc ký dung dịch đối chiếu và dung dịch thử.

Bảng 7. Kết quả khảo sát hệ dung môi pha động và nồng độ acid phosphoric

Pha động	Tỷ lệ dung môi	Tốc độ dòng (ml/phút)	Thời gian sắc ký (phút)	R _{s(acid gallic)}	R _{s(hyperin)}	A _{s(acid gallic)}	A _{s(hyperin)}	Độ tinh khiết pic của acid gallic và hyperin
MeOH – acid phosphoric 0,1%	70:30	1,0	10	1,1	1,8	-	0,9	Không đạt
	40:60	1,0	55	5,7	15,9	1,1	1,0	Đạt
MeOH – acid phosphoric 0,1%	40:60	1,2	40	5,3	2,6	1,2	1,1	Đạt
MeOH – acid formic 0,1%	40:60	1,0	40	3,10	2,6	-	1,1	Không đạt
ACN – acid phosphoric 0,1%	70:30	1,0	16	-	2,3	-	1,0	Không đạt
	30:70	1,0	20	-	2,1	-	0,9	Không đạt

Với pha động methanol và acid phosphoric 0,1%, acid gallic và hyperin đều tách hoàn toàn, đạt hệ số bất đối và pic tinh khiết. Hệ pha động MeOH – acid phosphoric 0,1% (40:60) được lựa chọn vì có pH 3,5 phù hợp với hiệu năng cột sắc ký. Ngoài ra, với tốc độ dòng 1 ml/phút, áp suất hệ thống không cao và ổn định (khoảng 1800 - 2000 psi). Như vậy, điều kiện sắc ký thích hợp để định lượng đồng thời acid gallic và hyperin

trong lá móng bò leo bằng phương pháp **HPLC** với đầu dò PDA là: cột sắc ký C18 InertSustain (250 x 4,6 mm; 5 µm), đầu dò PDA, bước sóng phát hiện 254 nm, pha động: MeOH – dung dịch H₃PO₄ 0,1% (40:60), tốc độ dòng 1,0 ml/phút, thể tích tiêm 10 µl.

Thẩm định quy trình

Khảo sát tính phù hợp của hệ thống

Bảng 8. Kết quả khảo sát tính phù hợp của hệ thống trên mẫu đối chiếu và mẫu thử (n = 6)

	Mẫu	Giá trị thống kê	t_R (phút)	S ($\mu AU \times$ giây)	A_s	Rs_1	Rs_2
Acid gallic	Đối chiếu	TB	3,722	185761	1,2		35,4
		RSD	0,11%	0,22%			
	Thử	TB	3,735	122202	1,2	1,5	5,5
		RSD	0,15%	1,17%			
Hyperin	Đối chiếu	TB	45,547	347769	1,1	37,3	
		RSD	0,06%	0,17%			
	Thử	TB	46,556	580931	1,0	15,2	
		RSD	0,55%	0,64%			

Rs_1 và Rs_2 lần lượt là độ phân giải của chất cần phân tích với chất liền trước và liền sau trong sắc ký đồ.

RSD của các thông số sắc ký của các chất phân tích trong mẫu đối chiếu và mẫu thử đều nhỏ hơn 2%, độ phân giải đều lớn hơn 1,5 và hệ số bất đối đều nằm trong khoảng 0,8 – 1,5. Vậy quy trình định lượng đồng thời acid gallic và hyperin đạt tính phù hợp của hệ thống.

Tinh chọn lọc

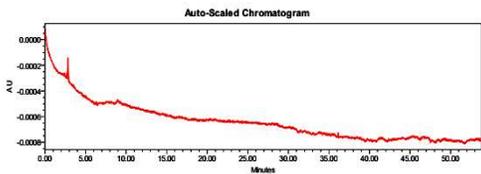
Kết quả khảo sát tinh chọn lọc cho thấy sắc ký đồ pha động và dung môi chiết không xuất hiện pic trong khoảng thời gian lưu tương ứng với thời gian lưu của acid gallic và hyperin trong mẫu đối chiếu. Sắc ký đồ mẫu thử xuất hiện pic có thời gian lưu tương đương với thời gian lưu của acid gallic và hyperin trong sắc ký đồ mẫu đối chiếu. Pic acid gallic và pic hyperin

tách hoàn toàn. Khi thêm chất phân tích vào mẫu thử, diện tích pic và chiều cao pic của acid gallic và hyperin tăng lên, đồng thời các pic đều tách hoàn toàn. Phổ **UV-Vis** tại thời gian lưu của acid gallic và hyperin trong sắc ký đồ mẫu thử giống với phổ **UV-Vis** tại thời gian lưu của pic tương ứng trong sắc ký đồ mẫu đối chiếu. Các pic acid gallic và hyperin trong sắc ký đồ mẫu đối chiếu và mẫu thử đều đạt độ tinh khiết. Vậy quy trình phân tích có tính chọn lọc. Hình 1 đến hình 5 minh họa kết quả khảo sát tinh chọn lọc.

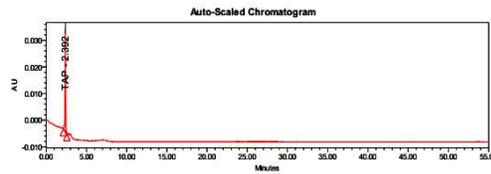
Khoảng tuyến tính, giới hạn phát hiện (LOD), giới hạn định lượng (LOQ), độ chính xác và độ đúng

Bảng 9. Kết quả khảo sát khoảng tuyến tính, LOD, LOQ, độ chính xác và độ đúng

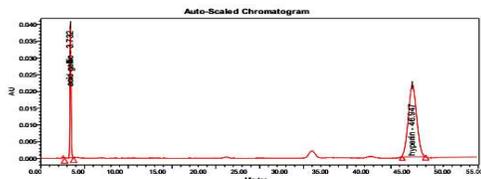
	Acid gallic	Hyperin
Phương trình hồi quy	$\hat{y} = 37862x - 1580,8$	$\hat{y} = 20655x - 45738$
Khoảng tuyến tính ($\mu g/ml$)	1 - 25	10 - 80
Hệ số tương quan (R)	0,9998	0,9998
Giới hạn phát hiện ($\mu g/ml$)	0,08	0,15
Giới hạn định lượng ($\mu g/ml$)	0,25	0,50
Độ chính xác (RSD, n = 12)	1,50%	2,96%
Độ đúng (n = 9)	99,50% - 102,00%; RSD = 1,35%	98,00% - 101,00%; RSD = 1,14%



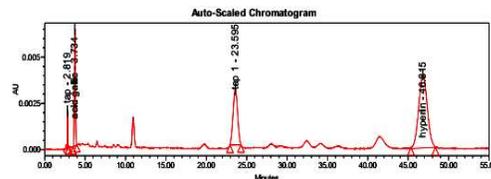
Hình 1. Sắc ký đồ pha động



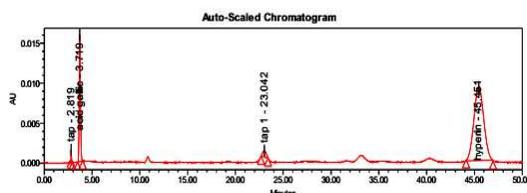
Hình 2. Sắc ký đồ dung môi chiết



Hình 3. Sắc ký đồ mẫu đối chiếu



Hình 4. Sắc ký đồ mẫu thử



Hình 5. Sắc ký đồ mẫu thử thêm chất phân tích

Như vậy, quy trình định lượng đồng thời acid gallic và hyperin trong lá móng bò leo bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao với đầu dò PDA có tính chọn lọc, khoảng tuyến tính rộng, giới hạn phát hiện và giới hạn định lượng thấp, độ chính xác và độ đúng cao nên có thể được ứng dụng để định lượng đồng thời acid gallic và hyperin trong lá móng bò leo.

Bàn luận

Việc xác định và định danh loài được thực hiện bằng 2 phương pháp là định danh bằng thực vật học và bằng ADN. Phương pháp định danh bằng ADN cho kết quả nhanh và định danh được chính xác tới loài cụ thể, điều này rất có ích và giúp giảm đi nhiều khó khăn khi tiến hành nghiên cứu trên một loài mới mà chưa có nhiều công bố khoa học về mặt thực vật cũng như định danh loài. Thông qua việc khảo sát sơ bộ thành phần hóa học của lá cây móng bò leo, đã xác định được nhóm hợp chất chính trong cây là flavonoid. Từ việc khảo sát sơ bộ này giúp định hướng chính xác cho việc lựa chọn nhóm hợp chất sẽ phân lập là flavonoid, từ đó có sự lựa chọn đúng đắn dung môi chiết cao toàn phần, cao phân đoạn, là cơ sở để lựa chọn cao phân đoạn để khảo sát thành phần, hoạt tính sinh học phục vụ cho việc chiết xuất, phân lập. Lá móng bò leo được đưa vào làm đối tượng nghiên cứu hóa học hướng tác dụng chống oxy hóa. Kết quả cho thấy cao ethyl acetat có hoạt tính chống oxy hóa (HTCO) mạnh nhất (92,74%) và mạnh hơn HTCO của acid ascorbic (88,29%), nên được lựa chọn để tiến hành phân lập. Điều này cũng phù hợp do ethyl acetat là dung môi thường được sử dụng để chiết các hợp chất polyphenol, là những chất có tác dụng chống oxy hóa. Kết quả này cũng phù hợp với các kết quả của các công trình nghiên cứu tham khảo của một số loài khác cùng thuộc chi *Bauhinia* trên thế giới [2-3]. Bốn hợp chất

đã được phân lập có độ tinh khiết sắc ký trên 96%, bao gồm ethyl gallat (**E1**), acid gallic (**E2**), hyperin (**E3**) và myricitrin (**E4**). Mặc dù cả 4 chất này không phải là chất mới, nhưng lần đầu tiên được phân lập từ lá cây móng bò leo (*Bauhinia bracteata*). Kết quả này cũng phù hợp với tài liệu tham khảo đã công bố của các loài khác cùng chi *Bauhinia* trên thế giới, chủ yếu các chất phân lập được là flavonoid [2-3]. Trong quá trình chiết xuất, phân lập và tinh chế các hợp chất cần lưu ý tránh ánh sáng bằng cách sử dụng giấy bạc để bọc các dụng cụ thí nghiệm hoặc sử dụng dụng cụ thủy tinh trung tính có màu vì chưa biết được cấu trúc cũng như tính chất của các hợp chất phân lập, do đó có nguy cơ một số hợp chất sẽ bị các yếu tố như ánh sáng, nhiệt độ, độ ẩm, hơi acid,... tác động làm thay đổi cấu trúc hợp chất ban đầu. Về nghiên cứu định lượng đối với kỹ thuật **HPLC** pha đảo, chất cation phân cực sẽ được rửa giải càng sớm. Ở điều kiện pha động có tính acid, các chất phân tích tồn tại ở dạng trung hòa nên chất phân lập nào có nhóm thế càng dài thì càng kém phân cực và sẽ rửa giải sau. Điều này phù hợp với trình tự rửa giải của các chất phân tích khi tiến hành sắc ký, lần lượt là ethyl gallat, acid gallic, hyperin và myricitrin. Điều kiện sắc ký trong nghiên cứu này có các ưu điểm như: định lượng đồng thời 2 hợp chất từ một nền mẫu cao dược liệu khá phức tạp về thành phần, chế độ rửa giải đẳng dòng với hệ dung môi 2 thành phần gồm methanol và dung dịch acid phosphoric 0,1% (tỷ lệ 40:60, tương ứng với pH pha động 3,5), đơn giản hơn so với các quy trình định đã công bố, sử dụng chương trình gradient với hệ dung môi và chương trình rửa giải phức tạp [15-17].

Kết luận

Đã phân lập được 4 hợp chất từ cao ethyl acetat của lá móng bò leo đạt độ tinh khiết sắc ký trên 96% và có hoạt tính chống oxy hóa

cao hơn so với chất đối chiếu acid ascorbic; xây dựng và thẩm định quy trình định lượng đồng thời acid gallic và hyperin trong lá móng bò leo bằng phương pháp **HPLC-PDA** đạt yêu cầu theo hướng dẫn của ICH và AOAC. Những kết quả nghiên cứu này góp phần vào việc bổ sung cơ sở dữ liệu hóa học và tác dụng sinh học của cây móng bò leo, giúp định hướng cho những nghiên cứu tiếp theo về thành phần hóa học cũng như các tác dụng sinh học của cây móng bò leo.

Tài liệu tham khảo

1. Bộ Y tế (2007), *Thực vật học*, NXB Y học, Hà Nội, tr. 274-275.
2. Arvind Negi, Nimisha Sharma, Mamta F. Singh (2012), "Spectrum of pharmacological activities from *Bauhinia variegata*: A review", *Journal of Pharmacy Research*, 5 (2), pp. 17-22.
3. Kanchan Lata Singh, Singh D. K., Vinay Kumar Singh (2016), "Multidimensional uses of medicinal plant kachnar (*Bauhinia variegata* Linn.)", *American Journal of Phytomedicine and Clinical Therapeutics*, 29, pp. 163-169.
4. Ashish Sarkar, Singh L. P., Tripathi V. D., Garima Mishra (2017), "Effects on plant metabolites of *Bauhinia purpurea* Linn.", *Journal of Pharmacology & Clinical Research*, 4 (5), pp. 1-4.
5. Assis Ecker, Francielli Araujo Vieira, Alessandro de Souza Prestes, Matheus Mulling dos Santos, Angelica Ramos, Rafael Dias Ferreira, et al. (2015), "Effect of syzygium cumini and *Bauhinia forficata* aqueous leaf extracts on oxidative and mitochondrial parameters *in vitro*", *EXCLI Journal*, 14, pp. 1219-1231.
6. Kharina Luize da Silva e Valdir Cechinel Filho (2002), "*Bauhinia* gender plans: chemical composition and pharmacological potential", *Quím. Nova*, 25 (3), pp. 9-25.
7. Kulisic T., Radonic A., Katalinic V., Milos M. (2004), "Use of different methods for testing antioxidative activity of oregano essential oil", *Food Chem.*, 85, pp. 633-640.
8. Michalel Antolovich (2001), "Methods for testing antioxidant activity", *The Analyst Journal*, pp. 45-51.
9. ICH Harmonised tripartite guideline (2005), Validation of analytical procedures: text and methodology, pp. 1-13.
10. AOAC (2013), Appendix K: Guidelines for Dietary Supplements and Botanicals, Section 3.4.1- 3.4.2, pp. 8-9.
11. Sharada L. Deore, Simshekhar S. Khadabadi (2010), "Isolation and characterization of phytoconstituents from *Chlorophytum borivilanium*", *Pharmacognosy Research*, 2 (6), pp. 343.
12. Sravan Kumar Reddy Threepireddy, Ramakrishna Chinthala, L. Vaikunta Rao, V. V. Kurisetty, Rathanakar Reddy Kura (2015), "The isolation, characterization and quantification of gallic acid from the fruit extract of *Terminalia chebula*", *International Journal of Medicine and Pharmaceutical Research*, 3 (2), pp. 983-988.
13. Keun Young Jung, Kun Ho Son, Jae Chul Do (1992), "Flavonol glycosides from the leaves of *Kalopanax pictum*", *Korean Journal of Pharmacognosy*, 23 (4), pp. 280-282.
14. Nguyễn Thị Hồng Vân, Trịnh Anh Viên, Phạm Quốc Long, Nguyễn Mạnh Cường, Lưu Tuấn Anh (2015), "Một số flavonoid và dẫn xuất bergenin phân lập từ lá cây cơm nguội đảo *Ardisia insularis*", *Tạp chí Hóa học*, 53 (3), pp. 310-316.
15. Alda E. dos Santos, Ricardo M. Kuster, Kristie A. Yamamoto, Tiago S. Salles, Renata Campos, Marcelo D. F. de Meneses, et al. (2015), "Quercetin and quercetin 3-O-glycosides from *Bauhinia longifolia* (Bong.) Steud. show anti-Mayaro virus activity", *Parasites & Vectors*, 7, pp. 130-132.
16. Graziella S. Marques, Waleska F. Leão, Magaly A. M. Lyra, Monize S. Peixoto, Rebecka P. M. Monteiro, Larissa A. Rolim, et al. (2014), "Comparative evaluation of UV/VIS and HPLC analytical methodologies applied for quantification of flavonoids from leaves of *Bauhinia forficata*", *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 23 (1), pp. 51-57.
17. Xinwu Huang, Mingli Sun, Guochun Li, (2015), "Method for qualitative and quantitative determination of gallic acid in *Herba gei*", *Biomedical Research*, 26 (1), pp. 2-4.