

Xác định hàm lượng quercetin trong lá đu đủ (*Carica papaya* L., Caricaceae) bằng phương pháp HPLC-DAD

Nguyễn Việt Đức¹, Võ Thị Bạch Huệ¹, Nguyễn Thị Minh Thuận^{2*}

¹ Khoa Dược, Trường Đại học Lạc Hồng

² Khoa Dược, Đại học Y Dược TP. Hồ Chí Minh

Summary

Quercetin is a potent antioxidant flavonoid and found in *Carica papaya* leaves in our previous study. The aim of this study was to isolate quercetin from leave extracts of *Carica papaya* L., Caricaceae using HPLC-DAD. Fresh papaya leaves were collected in Dong Nai. The flavonoid compounds were extracted from papaya leaves with ethanol. Sample purification was performed using shaking liquid-liquid distribution with ethyl acetate. 10 μ L of sample was injected onto Phenomenex C18 column maintained at room temperature on a HPLC Agilent 1050 equipped with a DAD detector set at 370 nm. The mobile phase consisted of a mixture of acetonitrile and acetic acid 1% set at a flow rate of 1 ml/min. The validation criteria included: selectivity, linearity, accuracy, precision, recovery, lower limit of quantification were met the requirements. The total HPLC run time was 20 min. The retention times for quercetin were 8.17 min. Quercetin linearity was in the range of 0.25 - 50 ppm. Mean intra-day and inter-day precision levels for quercetin were good with RSD below 2%. The lower limit of quantification was 0.25 ppm. In conclusion, quercetin amount in *Carica papaya* leaves was 153.74 μ g/g.

Keywords: Papaya leaf, quercetin, HPLC.

Đặt vấn đề

Cây đu đủ (*Carica papaya* L., Caricaceae) là một loại cây ăn quả trồng khá phổ biến ở các nước nhiệt đới như Việt Nam. Trên thế giới đã có nhiều nghiên cứu cho thấy dịch chiết lá đu đủ có nhiều tác dụng dược lý. Ở Indonesia, lá đu đủ còn được sử dụng như một loại rau, trà và thuốc cổ truyền cho nhiều mục đích như tăng cảm giác ngon miệng, tăng sản xuất sữa mẹ, hạ sốt và chữa bệnh sốt rét [1]. Một vài nghiên cứu đã phân lập được quercetin từ lá đu đủ và xác định đây là một flavonoid có tính chống oxy hóa mạnh nên có tính kháng khối u, kháng viêm và kích thích miễn dịch [2]. Do đó, hàm lượng

quercetin là một trong các yếu tố ảnh hưởng đến hiệu quả dược lý của các chế phẩm thuốc làm từ lá đu đủ. Mục tiêu của đề tài là Xác định hàm lượng quercetin trong lá đu đủ - *Carica papaya* L., Caricaceae bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao nhằm góp phần đánh giá chất lượng nguyên liệu lá đu đủ dùng để phân lập quercetin tinh khiết hoặc dùng làm thuốc.

Nguyên vật liệu và phương pháp

Nguyên liệu

Lá cây đu đủ tươi (*Carica papaya* L., Caricaceae) đạt kích thước khoảng 30 cm từ cuống đến đỉnh lá, được thu hái tại Xã Tân Triều, Huyện Vĩnh Cửu, Tỉnh Đồng Nai. Lá được rửa sạch, thái nhỏ khoảng 1 cm, sấy khô, sau đó xay thành bột thô.

Chất chuẩn - Dung môi - Hóa chất

Ethanol, cloroform, n-hexan, ethyl acetat, methanol, amoniac đậm đặc, acid hydrochloric đậm đặc, acid sulfuric đậm đặc, thuốc thử (TT)

Chịu trách nhiệm: Nguyễn Thị Minh Thuận

Email: ntmthuan@ump.edu.vn

Ngày nhận: 22/9/2020

Ngày phản biện: 02/12/2020

Ngày duyệt bài: 19/01/2021

Dragendorff, FeCl₃ 5%/ethanol, xanh bromocresol (Trung Quốc). Acetonitril, methanol, acid acetic, acid formic (Hãng Merck). Nước cất 2 lần đạt tiêu chuẩn dùng cho **HPLC**. Chất chuẩn đối chiếu quercetin (độ tinh khiết 99,01%).

Trang thiết bị

Hệ thống HPLC Agilent 1050 (Detector DAD). Cột Phenomenex C18 (4,6 ID x 150 mm x 3,5 µm). Cân phân tích Sartorius (độ nhạy 0,01 mg). Các trang thiết bị, dụng cụ thông dụng dùng trong phòng thí nghiệm.

Phương pháp nghiên cứu

Chuẩn bị mẫu

Chiết xuất flavonoid toàn phần trong lá đu đủ: Cân chính xác 3 g bột lá đu đủ (độ ẩm 3,9%) cho vào bình nón nút mài 250 ml, thêm 50 ml ethanol 70%, chiết siêu âm 30 phút, nhiệt độ 50°C (x 3 lần). Gộp dịch chiết và cô thu hồi dung môi đến cạn, hòa tan lại với acid HCl 2% đến pH 2, lắc phân bố với n-hexan (30 ml x 3 lần). Dịch nước còn lại tiếp tục lắc với ethyl acetat (30 ml x 3 lần). Gộp toàn bộ dịch ethyl acetat, thu hồi dung môi đến cạn. Hòa tan toàn bộ cặn với dung môi MeOH đến vạch trong bình định mức 100 ml. Các mẫu thử này được sử dụng khảo sát độ lặp lại và độ chính xác trung gian.

Dung dịch chuẩn gốc: Cân chính xác và hòa tan 10 mg quercetin (tinh khiết 99,01%) bằng dung môi methanol trong bình định mức 100 ml, thu được dung dịch chuẩn gốc có nồng độ 100 ppm (Chuẩn 100).

Chuẩn bị mẫu khảo sát tính tuyến tính, phù hợp hệ thống: Từ dung dịch chuẩn 100 ppm, pha các giai mẫu chuẩn có nồng độ 2,5; 5; 10; 20; 50 (ppm) trong methanol. Các chuẩn 2,5; 5; 10; 20; 50 ppm được dùng khảo sát tính tuyến tính. Chuẩn 5 ppm được dùng khảo sát tính phù hợp hệ thống.

Chuẩn bị mẫu khảo sát tính đặc hiệu: Mẫu trắng là MeOH. Mẫu chuẩn là dung dịch quercetin 5 ppm. Mẫu thử: dịch chiết chuẩn bị mẫu như phần khảo sát độ lặp lại.

Chuẩn bị mẫu khảo sát độ đúng: Tiến hành cân bột lá đu đủ và chiết giống quy trình khảo sát độ chính xác. Thêm vào các bình định mức dung dịch chuẩn 100 ppm tương ứng với 3 mức

nồng độ 80%, 100% và 120%, mỗi mức nồng độ 3 mẫu.

Điều kiện sắc ký: Tiêm 10 µl mẫu vào cột sắc ký C18 ở nhiệt độ phòng. Rửa giải các chất phân tích trên cột bằng pha động với tốc độ dòng 1 ml/ phút và chạy theo chương trình gradient với kênh C (ACN) và D (acid acetic 1%); 0 – 10 phút: 30% C; 11 – 20 phút: 100% C. Bước sóng phát hiện: 370 nm.

Thẩm định quy trình định lượng: Thực hiện theo hướng dẫn của AOAC^[3].

Kết quả

Tính phù hợp hệ thống

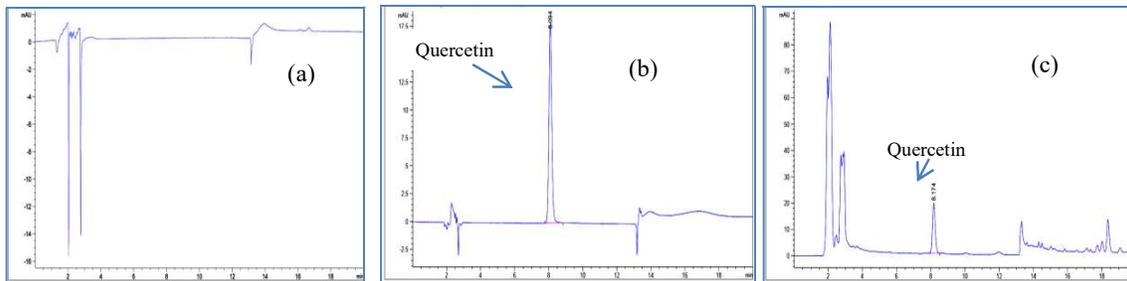
Tiến hành sắc ký 6 lần chuẩn 5 ppm cho thấy RSD% của thời gian lưu, diện tích pic < 2%; số đĩa lý thuyết > 2000; hệ số bất đối 0,8 ≤ As < 1,5. Vậy quy trình đạt tính phù hợp hệ thống (bảng 1).

Bảng 1. Kết quả tính tương thích hệ thống của quercetin

STT	Thời gian lưu (phút)	Diện tích pic (mAU × giây)	Số đĩa lý thuyết (N > 2000)	Hệ số bất đối 0,8 ≤ As ≤ 1,5
1	8,025	212,48	11576	0,87
2	7,835	211,57	11962	0,86
3	7,783	208,79	11984	0,87
4	7,705	210,19	12030	0,86
5	7,680	209,45	12061	0,86
6	7,666	210,16	12614	0,86
TB	7,782	210,44		
RSD%	1,73	0,65		

Tính đặc hiệu

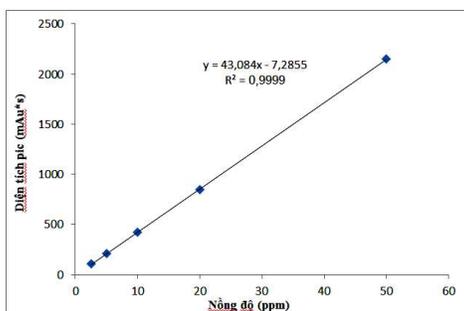
Tiến hành sắc ký lần lượt mẫu trắng (MeOH), chuẩn 5 ppm và mẫu thử. Kết quả cho thấy sắc ký đồ mẫu trắng không có tín hiệu tại thời gian lưu của pic cần định lượng trong sắc ký đồ (SKĐ) của mẫu chuẩn và thử; SKĐ của mẫu thử cho pic có thời gian lưu (8,174 phút) tương ứng với sắc ký đồ của mẫu chuẩn (8,094 phút). Các pic khác trên SKĐ của mẫu thử tách hoàn toàn so với pic cần định lượng. Vậy quy trình định lượng quercetin có tính đặc hiệu (hình 1).



Hình 1. SKĐ khảo sát tính đặc hiệu của quercetin với (a) mẫu trắng, (b) mẫu quercetin chuẩn 5 ppm và (c) mẫu thử

Tính tuyến tính

Đồ thị biểu diễn mối tương quan giữa nồng độ quercetin và diện tích pic (hình 2) cho biết phương trình tuyến tính: $\hat{y} = 43,084x - 7,2855$ ($R^2 = 0,9999$). Kết quả phân tích thống kê bằng Excel với độ tin cậy 95% cho thấy: phương trình hồi quy tuyến tính với $F = 4,13 \times 10^{-8} < F_{\alpha} = 6,608$; hệ số a có ý nghĩa do $p = 1,4 \times 10^{-5} < \alpha = 0,05$; Hệ số b không có ý nghĩa do p-value (b) = 0,08 $> \alpha = 0,05$. Như vậy phương trình hồi quy có dạng là: $\hat{y} = 43,084x$ ($R^2 = 0,9999$) với khoảng tuyến tính 2,5 – 50 ppm.



Hình 2. Tương quan giữa nồng độ quercetin và diện tích pic

Độ chính xác

Độ lặp lại: Hàm lượng quercetin trong mẫu thử được tính theo công thức:

$$X (\mu\text{g/g}) = \frac{St \times Cc \times C\% \times 100}{St \times m \times (1 - a)}$$

Trong đó:

St: diện tích pic mẫu thử (mAU*s)

Sc: diện tích pic mẫu chuẩn (mAU*s)

Cc: nồng độ mẫu chuẩn (ppm)

C%: độ tinh khiết chuẩn (99,01%)

m: khối lượng cân mẫu thử (g)

a: độ ẩm dược liệu (3,90%)

Bảng 1. Kết quả thẩm định độ lặp lại

Mẫu	Khối lượng cân mẫu thử (g)	Diện tích pic (mAU*s)	Hàm lượng quercetin trong mẫu thử (X) ($\mu\text{g/g}$)
1	2,9985	189,54	154,74
2	3,0025	191,76	156,34
3	3,0005	189,10	154,27
4	2,9994	187,76	153,24
5	3,0265	188,62	152,56
6	3,0356	187,62	151,30
TB			153,74
RSD%			1,15

Nhận xét: RSD (%) của kết quả định lượng quercetin trong mẫu thử $\leq 2\%$. Như vậy, quy trình định lượng đạt yêu cầu về độ lặp lại.

Độ chính xác trung gian

Tiến hành sắc ký các mẫu thử với cùng một quy trình phân tích, khác ngày phân tích.

Bảng 2. Kết quả thẩm định độ chính xác

STT	Ngày 1			Ngày 2		
	Khối lượng mẫu (g)	Diện tích pic (mAU*s)	Hàm lượng mẫu thử ($\mu\text{g/g}$)	Khối lượng mẫu (g)	Diện tích pic (mAU*s)	Hàm lượng mẫu thử ($\mu\text{g/g}$)
1	2,9985	189,54	154,74	2,9985	185,70	151,60
2	3,0025	191,76	156,34	2,9965	186,91	152,69
3	3,0005	189,10	154,27	2,9975	185,27	151,30

4	2,9994	187,76	153,24	3,0012	186,58	152,18
5	3,0265	188,62	152,56	3,0002	186,56	152,22
6	3,0356	187,62	151,30	2,9962	186,86	152,67
TB			153,74			152,11
RSD%			1,15			0,37

2 ngày phân tích: TB = 152,93 µg/g và RSD% = 0,99%

Nhận xét: Dùng F-test kiểm tra cho thấy kết quả định lượng của 2 ngày phân tích có phương sai khác nhau không có ý nghĩa. Dùng t-test kiểm tra thấy kết quả định lượng trung bình của 2 người phân tích khác nhau không có ý nghĩa.

Giá trị RSD (%) kết quả định lượng của mỗi ngày phân tích và của cả hai ngày phân tích đều nhỏ hơn 2%. Như vậy, quy trình đạt độ chính xác trung gian.

Độ đúng

Bảng 3. Kết quả thẩm định độ đúng

Mẫu	Khối lượng (g)	Mẫu chuẩn thêm vào (µg)	Diện tích pic (mAU*s)	Lượng chất tìm lại (µg)	Tỉ lệ phục hồi (%)
80%	A	3,0525	396,04	373,75	104,13
	B	3,0007	396,04	369,96	103,88
	C	2,9995	396,04	369,38	103,58
TB					103,86
RSD%					0,26
100%	A	3,0012	495,05	411,99	103,06
	B	3,0005	495,05	410,52	102,38
	C	3,0045	495,05	409,05	101,56
TB					102,34
RSD%					0,73
120%	A	3,0025	594,06	454,08	102,52
	B	2,9995	594,06	456,02	103,36
	C	3,0072	594,06	454,63	102,61
TB					102,83
RSD%					0,44

Nhận xét: Ở các mức nồng độ 80%, 100% và 120%, tỉ lệ phục hồi các mẫu nằm trong khoảng 90 - 107% và các giá trị RSD% ≤ 2%. Như vậy, quy trình đạt yêu cầu về độ đúng.

Từ các kết quả trên cho thấy quy trình định lượng quercetin trong dược liệu lá đu đủ bằng phương pháp **HPLC** đạt các yêu cầu thẩm định.

Bàn luận

Phân tích định lượng là một công cụ quan trọng để biết thông tin về thành phần và hàm lượng các thành phần hoạt tính có trong nguyên liệu thực vật^[4], trong đó một số thành phần có tác dụng dược lý là tác dụng chống oxy hóa^[5]. Quercetin là một flavonoid có tính chống oxy hóa mạnh nên có tính kháng khối u, kháng viêm và kích thích miễn dịch^[2]. Một vài nghiên cứu đã phân lập được quercetin từ lá đu đủ. Vì vậy, hàm lượng quercetin là một trong các yếu tố

ảnh hưởng đến hiệu quả dược lý của các chế phẩm thuốc làm từ lá đu đủ.

Để phân lập và tinh khiết quercetin từ dược liệu, các phương pháp chiết xuất sẽ được sử dụng với mục đích thu được cao chiết thô có hiệu suất cao. Hiệu suất chiết và tác dụng dược lý của các thành phần hóa học thu được phụ thuộc nhiều vào độ phân cực dung môi chiết. Do đó, trong chiết xuất quercetin từ dược liệu, một vài nghiên cứu đã thực hiện chiết cao toàn phần lá đu đủ với methanol, sau đó phân tích quercetin trong cao phân đoạn butanol từ cao toàn phần methanol^[6], trong khi các hợp chất flavonoid toàn phần cũng được chứng minh đạt hiệu suất cao nhất khi chiết với ethanol^[7]. Trên thực tế, do độc tính của methanol cao hơn ethanol nên ethanol thường được chọn là dung môi để chiết cao thô từ dược liệu.

Theo kết quả khảo sát trước đó của chúng tôi, các cao toàn phần lá đu đủ được chiết với các nồng độ ethanol khác nhau 50%, 70% và 90%. Kết quả khảo sát cho thấy ethanol 90% là dung môi cho hiệu suất chiết xuất cao nhất; tuy nhiên cũng kéo theo rất nhiều tạp kém phân cực. Khi sử dụng dung môi ethanol 50%, có hiện tượng tạo nhũ rất lâu tách trong quá trình lắc phân bố nên khó sử dụng. Ethanol 70% chiết thuận lợi hơn, cho hiệu suất chiết cao nên được chọn làm dung môi chiết cao toàn phần lá đu đủ trong nghiên cứu này. Sau khi loại bỏ các tạp chất kém phân cực bằng cách acid hóa dịch chiết toàn phần ethanol và lắc với dung môi n-hexan, các hợp chất flavonoid chứa quercetin được chiết trong phân đoạn ethyl acetat.

Nhiều phương pháp phân tích cũng được xây dựng để xác định hàm lượng quercetin trong dược liệu như sắc ký lớp mỏng, sắc ký lỏng hiệu năng cao^[2, 8], điện di mao quản^[9].

Kết quả của nghiên cứu này cho thấy phương pháp **HPLC-DAD** cho khoảng tuyến tính nồng độ quercetin 2,5 – 50 ppm với hệ số $R^2 = 0,9999$. Từ sắc ký đồ mẫu thử là phân đoạn ethyl acetat, pic của quercetin được thấy chủ yếu so với các hợp chất flavonoid khác trong mẫu thử flavonoid toàn phần. Điều đó chứng tỏ phương pháp chiết xuất quercetin là flavonoid trong lá đu đủ là phù hợp. Phương pháp định lượng quercetin trong lá đu đủ bằng **HPLC-DAD** đã được xây dựng thẩm định đạt về tính đặc hiệu, độ đúng và độ chính xác với giới hạn định lượng là 2,5 ppm. Phương pháp này đã xác định hàm lượng quercetin trong lá đu đủ (*Carica papaya* L., Caricaceae) là 152,93 µg/g dược liệu.

Kết luận

Đề tài đã xây dựng và thẩm định quy trình định lượng quercetin trong lá đu đủ (*Carica papaya* L., Caricaceae) bằng phương pháp **HPLC-DAD**. Phương pháp này có thể được sử dụng để kiểm tra độ tinh khiết của quercetin phân lập được từ lá đu đủ để làm nguồn chất đối chiếu từ lá đu đủ, góp phần phục vụ cho công tác kiểm tra chất lượng nguyên liệu và các chế phẩm có chứa lá đu đủ đang lưu hành trên thị trường.

Tài liệu tham khảo

1. Julianti T., Mouhssin O., Matthias H. (2014), "Quantification of the antiplasmodial alkaloid carpaine in papaya (*Carica papaya*) leaves", *Planta Medica*, 80 (13), pp. 1138-1142.
2. Lê Huy Hoàng, Đỗ Thị Hải Anh, Đỗ Thị Huệ và CS. (2017), "Xác định quercetin dạng tự do trong dịch chiết nụ hoa của cây hòe (*Sophora japonica* L.) bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao", *Tạp chí Khoa học ĐHQGHN: Khoa học Tự nhiên và Công nghệ*, 33 (1S), tr. 214-223.
3. AOAC (2002), Guidelines for Single Laboratory Validation of Chemical Methods for Dietary Supplements and Botanicals.
4. Fraise D., Felgines C., Texier O. et al. (2011), "Caffeoyl derivatives: major antioxidant compounds of some wild herbs of the Asteraceae family", *Food Nutr. Sci.*, 2, pp. 181-192.
5. Song N., Xu W., Guan H. et al. (2007), "Severalfavonoids from *Capsella bursa-pastoris* (L.) medic", *Asian J. Tradit. Med.*, 2, pp. 218-222.
6. Nugroho A., Heryani H., Choi J. S., Park H. J. (2017), "Identification and quantification of flavonoids in *Carica papaya* leaf and peroxynitrite scavenging activity", *Asian Pac. J. Trop. Biomed.*, 7 (3), pp. 208–213.
7. Abarca-Vargas R., Zamilpa A., Petricevich V. L. (2019), "Development and validation of conditions for extracting flavonoids content and evaluation of antioxidant and cytoprotective activities from *Bougainvillea x buttiana* Bracteas (var. Rose)", *Antioxidants*, 8 (264), pp. 1-16.
8. Doshi G. M., Une H. D. (2016), "Quantification of quercetin and rutin from *Benincasa hispida* seeds and *carissa congesta* roots by high-performance thin layer chromatography and high-performance liquid chromatography", *Pharmacognosy Res.*, 8 (1), pp. 37–42.
9. Sanghavi N., Bhosale S. D., Malode Y. (2014), "RP-HPLC method development and validation of quercetin isolated from the plant *Tridax procumbens* L.", *Journal of Scientific and Innovative Research*, 3 (6), pp. 94-597.
10. Chen G., Zhang H., Yea J. (2000), "Determination of rutin and quercetin in plants by capillary electrophoresis with electrochemical detection", *Analytica Chimica Acta*, 423 (1), pp. 69-76.