

Xây dựng và thẩm định phương pháp định lượng đồng thời acid deacetylasperulosidic và rutin trong lá nhàu (*Morinda citrifolia* L.) bằng phương pháp HPLC/UV-Vis

Lâm Bích Thảo, Nguyễn Nhật Minh
Nguyễn Văn Trí, Lý Hải Triều, Lê Văn Minh*

Trung tâm Sâm và Dược liệu TP.Hồ Chí Minh (CGMM), Viện Dược liệu

Summary

The simultaneous quantitative method of deacetylasperulosidic acid and rutin in *Morinda citrifolia* L. leaves by high performance liquid chromatography (HPLC) has been developed and validated.

The method was carried out by using a Venusil XBP column C18 (250 × 4.6 mm; 5 μm) column with a gradient solvent system of acetonitrile - 0.1% formic acid, flow rate of 0.7 ml/min and UV detection at 254 nm. The chromatographic system was achieved in good specificity, accuracy, repeatability, suitability and high sensitivity (LoD LoQ of deacetylasperulosidic acid were 0.1 μg/ml and 0.02 μg/ml, respectively; LoD, LoQ of rutin were 0.1 μg/ml; 0.02 μg/ml, respectively). The quantitative procedure was applied to determine the content of deacetylasperulosidic acid and rutin in three samples of *Morinda citrifolia* leaves collected in the different Southern provinces in Vietnam.

Keywords: *Morinda citrifolia* L., HPLC, deacetylasperulosidic acid, rutin, quantitative validation.

Đặt vấn đề

Các bộ phận của cây nhàu (*Morinda citrifolia* L.) được dùng trong Y học cổ truyền chữa trị một số trường hợp như: Quả giúp nhuận tràng, lợi tiểu, giảm ho, hạ sốt, kinh nguyệt không đều; lá dùng chữa mụn nhọt, sốt rét, kiết lỵ; rễ trị sưng huyết, trĩ, xuất huyết não. Nghiên cứu về thành phần hóa học cho thấy gần 200 hợp chất hiện diện trong các bộ phận khác nhau của cây nhàu chủ yếu là các iridoid glycosid, flavonoid, anthraquinon dạng morindon, sterol, nucleosid saccharid. Trong đó, acid deacetylasperulosidic (DAA) và rutin là hai chất chỉ dấu quan trọng có hàm lượng tương đối cao, mang lại nhiều tác dụng quý cho cây nhàu [1]. DAA thuộc nhóm iridoid glycosid đã được chứng minh có tác dụng kháng ung thư, tăng cường miễn dịch, hạ huyết áp, chống béo phì. Rutin là flavonoid điển hình hiện diện trong nhiều dược liệu, có tác dụng kháng oxy hóa, kháng viêm mạnh, ức chế

nhiều chủng vi khuẩn, hạ huyết áp và ức chế nhiều dòng tế bào ung thư khác nhau [2]. Hiện nay, nhàu là cây dược liệu được phát triển trên quy mô toàn cầu, các sản phẩm từ nhàu không chỉ là nguyên liệu cho lĩnh vực y dược mà còn được sử dụng trong các lĩnh vực khác như công nghệ sinh học, hóa sinh và công nghệ nano. Ở Việt Nam, nhàu phân bố nhiều ở các tỉnh phía Nam. Nhàu cũng được khuyến khích tập trung phát triển trồng ở quy mô lớn theo quyết định số 1976/QĐ-TTg ngày 30/10/2013 của Thủ tướng Chính phủ và quyết định số 3657/QĐ-BYT ngày 20/08/2019 phê duyệt Danh mục 100 cây dược liệu ưu tiên phát triển trong giai đoạn 2020-2030. Một số công bố gần đây cho thấy nhàu có tác dụng làm lành nhanh vết thương, tăng cường miễn dịch, ức chế virus, gây độc trên nhiều dòng tế bào ung thư, hỗ trợ điều trị đái tháo đường [3-6].

Dược điển Việt Nam V (2017) đã có chuyên luận về quả và rễ nhàu, nhưng bộ phận lá vẫn chưa có quy định cụ thể. Lá nhàu vừa có những hoạt chất có tác dụng tốt vừa là sản phẩm phụ của quá trình canh tác. Tận dụng lá để phát triển các sản phẩm dùng ngoài vừa kinh tế vừa an toàn là một trong những yếu tố góp phần nâng cao hiệu quả kinh tế. Do đó, việc xây dựng

Chịu trách nhiệm: Lê Văn Minh

Email: lvminh05@gmail.com

Ngày nhận: 14/4/2021

Ngày phản biện: 09/5/2021

Ngày duyệt bài: 26/7/2021

quy trình định lượng đồng thời acid deacetylasperulosidic và rutin trong lá nhàu là cần thiết để định hướng bổ sung và nâng cấp cho chỉ tiêu định lượng đối với chuyên luận lá nhàu, phục vụ cho các công tác nghiên cứu về sau.

Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

Vật liệu

Nguyên liệu: Lá nhàu được phơi khô và xay thành bột mịn (qua rây 355), lưu giữ trong túi nilon kín bảo quản nơi khô mát. MC-1, MC-2 và MC-3 là các mẫu lá nhàu thu hái tại các tỉnh An Giang, Long An và Hồ Chí Minh (vào tháng 05/2019).

Dung môi và hóa chất: Methanol, acetonitrile, acid formic (Hãng Merck, Đức); nước cất 2 lần.

Chất chuẩn đối chiếu: Acid deacetylasperulosidic (Sigma-Aldrich, CAS 14259-55-3); rutin (Sigma-Aldrich, CAS 207671-50-9).

Thiết bị: Bể siêu âm Branson 3510 (Đức); bếp ổn nhiệt cách thủy Memmert W40 (Đức); cân phân tích Sartorius BP-221 (Đức); cân sấy ẩm hồng ngoại Kern (Đức); hệ thống sắc ký lỏng hiệu năng cao Shimadzu, đầu dò UV-Vis SPD-20, bơm LC-20AT, bộ phận tiêm mẫu tự động SIL-20A-HT, bộ khử khí DUG-20A HT (Nhật Bản).

Phương pháp thẩm định quy trình định lượng

Phương pháp phân tích được thẩm định dựa trên hướng dẫn của ICH [9] và AOAC [10] theo các yêu cầu về độ đặc hiệu, tính thích hợp của hệ thống; tính tuyến tính và khoảng xác định; độ lặp lại; độ đúng; giới hạn phát hiện (LoD) và giới hạn định lượng (LoQ).

Độ đặc hiệu: Tiến hành phân tích sắc ký lần lượt các mẫu trắng, mẫu chuẩn, mẫu thử và mẫu thử thêm chuẩn theo điều kiện đã lựa chọn. Trên sắc ký đồ dung dịch thử, mẫu thử phải có pic tương đồng với thời gian lưu của pic chuẩn, diện tích pic trên sắc ký đồ mẫu thử thêm chuẩn tương ứng với pic chuẩn phải lớn hơn so với mẫu thử. Mặt khác, trên sắc ký đồ của mẫu trắng không có pic tương đồng với chuẩn.

Độ thích hợp của hệ thống: Tính thích hợp của hệ thống được xác định bằng cách phân tích sắc ký hỗn hợp chuẩn DAA và rutin ở nồng độ thích hợp lặp lại 6 lần trong điều kiện đã chọn lựa. Ghi nhận các thông số về thời gian lưu, diện tích pic. Tính RSD (%) để xác định tính thích hợp của phương pháp.

Tính tuyến tính và khoảng xác định: Pha dãy hỗn hợp chuẩn có nồng độ thích hợp.

Tiến hành phân tích sắc ký ở điều kiện đã chọn lựa. Xây dựng phương trình hồi quy tuyến tính giữa diện tích pic và nồng độ các chuẩn. Xác định hệ số tương quan để suy ra khoảng nồng độ xác định của các chuẩn.

Độ lặp lại: Tiến hành định lượng lặp lại trên 6 mẫu thử độc lập, thực hiện trên 2 ngày khác nhau và 2 kĩ thuật viên khác nhau. Tính RSD (%) của các kết quả định lượng. Yêu cầu RSD \leq 2%.

Độ đúng: Tiến hành phân tích 9 mẫu thử thêm chuẩn độc lập, 3 mẫu thêm chuẩn ở mức 80%, 3 mẫu thêm chuẩn ở mức 100% và 3 mẫu còn lại ở mức 120%. Tiến hành phân tích sắc ký các mẫu đã thêm chuẩn. Xác định tỉ lệ các chất chuẩn đã thêm vào (hiệu suất thu hồi) ở các mức chuẩn được thêm. Hiệu suất thu hồi phải có giá trị trong khoảng 93 - 107% với RSD \leq 2%

Giới hạn phát hiện và giới hạn định lượng

Pha loãng các chuẩn sao cho trên sắc ký đồ thu được tại vị trí thời gian lưu của các pic chuẩn có tỉ lệ:

$$S/N = \frac{2H}{h} \approx 2 - 3.$$

Trong đó: H là chiều cao pic tương ứng với chuẩn, h là khoảng dao động của nhiễu đường nền.

Khi đó nồng độ của chuẩn là giới hạn phát hiện của phương pháp phân tích (LoD). Suy ra, giới hạn định lượng LoQ = 3,3 LoD.

Kết quả và bàn luận

Xây dựng quy trình định lượng

Chuẩn bị mẫu

Mẫu thử: Cân chính xác khoảng 0,2 g lá nhàu đã xay mịn vào ống nghiệm có nắp, thêm chính xác 10 ml methanol, đậy nắp, cân. Chiết bằng siêu âm trong 60 phút, mỗi 20 phút lắc đều ống, cân bù lại khối lượng đã mất bằng methanol để được khối lượng ban đầu. Sau khi chiết xong lọc qua màng 0,45 μ m dùng cho phân tích định lượng.

Mẫu chuẩn: Cân chính xác 10 mg mỗi chất chuẩn acid deacetylasperulosidic (DAA), rutin rồi hòa tan và định mức đến 5 ml bằng methanol được hỗn hợp chuẩn gốc. Từ đó, pha loãng thành dãy hỗn hợp chuẩn có nồng độ DAA trong khoảng 25 - 200 μ g/ml và rutin trong khoảng 50 - 400 μ g/ml.

Điều kiện phân tích sắc ký

Dựa trên các phương pháp của Wada (2016) và Deng (2010) [7-8], điều kiện sắc ký được khảo sát và hiệu chỉnh theo các thông số như sau:

Cột pha tĩnh C18 (250 x 4,6 mm; 5 μ m);

tốc độ dòng 0,7 ml/phút; bước sóng phân tích 254 nm; chương trình pha động theo gradient nồng độ của acetonitril (A) và acid formic 0,1% (B).

Bảng 1. Chương trình pha động

Thời gian (phút)	Acetonitrile (A)	Acid formic (B)
0 - 30	1 → 30	99 → 70
30 - 40	30 → 80	70 → 20
40 - 45	80	20
45 - 50	80 → 30	20 → 70
50 - 60	30 → 1	70 → 99
60 - 65	1	99

Xử lý số liệu

Hàm lượng hoạt chất trong mẫu thử

được tính theo công thức:

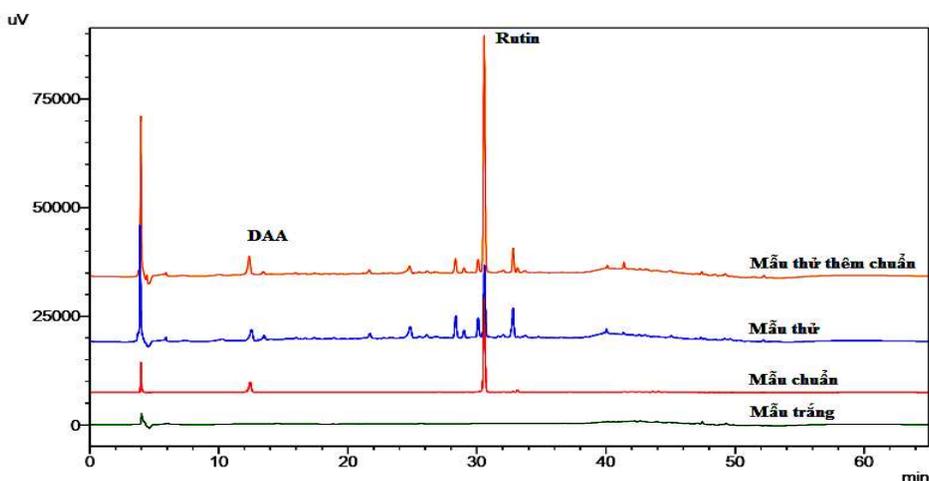
$$X(\%) = \frac{C \times V \times p}{m \times (100 - h) \times 10000}$$

Trong đó:

X(%) là hàm lượng hoạt chất trong mẫu thử,
 C (µg/ml) là nồng độ hoạt chất trong mẫu thử được suy ra từ đường chuẩn,
 V (ml) là thể tích pha loãng mẫu,
 p (%) độ tinh khiết của chuẩn,
 m (g) là khối lượng mẫu thử dùng cho định lượng,
 h (%) là độ ẩm của mẫu thử.

Thảm định quy trình định lượng

Độ đặc hiệu



Hình 1. Sắc ký đồ thể hiện độ đặc hiệu của phương pháp phân tích

Hình 1 cho thấy mẫu thử có hai pic có thời gian lưu tương đồng với thời gian lưu của pic DAA và rutin của mẫu chuẩn, hơn nữa diện tích pic của mẫu thử thêm chuẩn tương ứng và lớn hơn so với mẫu thử. Trên sắc ký đồ mẫu trắng không có pic sắc ký tương đồng với chuẩn. Kết quả phân tích cho thấy phương pháp phân tích

thỏa mãn độ đặc hiệu.

Tính thích hợp của hệ thống

Tiến hành phân tích lặp lại 6 lần hỗn hợp chuẩn có nồng độ DAA 100 µg/ml và rutin 200 µg/ml. Kết quả thời gian lưu và diện tích pic được ghi nhận trong bảng 2.

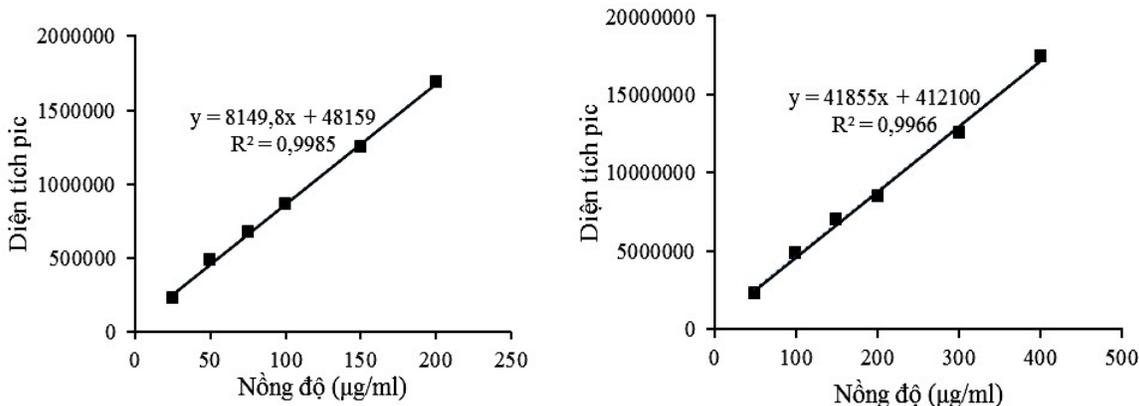
Bảng 2. Kết quả tính thích hợp của hệ thống

STT	DAA		Rutin	
	Thời gian lưu (phút)	Diện tích pic (mAU.s)	Thời gian lưu (phút)	Diện tích pic (mAU.s)
1	12,541	869467	30,627	8498742
2	12,463	836487	30,645	8525858
3	12,478	862259	30,637	8528407
4	12,532	849686	30,648	8563191
5	12,544	833654	30,570	8560342
6	12,467	856628	30,675	8222293
Trung bình	12,504	851364	30,634	8483139
RSD (%)	0,31	1,67	0,11	1,53

Độ lệch chuẩn tương đối của thời gian lưu các chuẩn DAA và rutin lần lượt là 0,31% và 0,11%; độ lệch chuẩn tương đối của diện tích pic các chuẩn DAA và rutin lần lượt là 1,67% và 1,53% đều thỏa mãn yêu cầu $\leq 2\%$. Như vậy,

điều kiện sắc ký đã lựa chọn có độ lặp lại tốt về thời gian lưu và diện tích pic, suy ra phương pháp phân tích có tính thích hợp hệ thống.

Tính tuyến tính và khoảng xác định



Hình 2. Đường tuyến tính thể hiện tương quan giữa nồng độ và diện tích pic của DAA (trái) và rutin (phải).

Kết quả xây dựng đường chuẩn cho thấy hệ số xác định giữa nồng độ chuẩn và diện tích pic thu được của DAA và rutin đều lớn hơn 0,9 ($R^2 > 0,99$). Chứng tỏ hai biến này có mối quan hệ tuyến tính chặt chẽ trong khoảng xác định là 25 - 200 µg/ml đối với DAA và 50 - 400 µg/ml đối với rutin.

Độ lặp lại của phương pháp được xác định bằng cách xác định hàm lượng của DAA và rutin mẫu lá nhàu với 6 lần lặp lại. Kết quả ở bảng 3 cho thấy độ lệch chuẩn tương đối (RSD) của hàm lượng DAA và rutin ở các lần lặp lại trong 2 ngày phân tích khác nhau đều nhỏ hơn 2%. Chứng tỏ phương pháp phân tích thỏa mãn độ lặp lại và độ chính xác trung gian.

Độ lặp lại

Bảng 3. Kết quả độ lặp lại và độ chính xác trung gian

STT	Ngày 1, kĩ thuật viên 1		Ngày 2, kĩ thuật viên 2	
	Hàm lượng DAA (%)	Hàm lượng rutin (%)	Hàm lượng DAA (%)	Hàm lượng rutin (%)
1	0,043	0,256	0,044	0,260
2	0,042	0,260	0,045	0,258
3	0,043	0,263	0,043	0,261
4	0,041	0,257	0,043	0,269
5	0,042	0,261	0,044	0,259
6	0,043	0,267	0,043	0,262
Trung bình	0,042	0,261	0,044	0,262
RSD (%)	1,80	1,51	1,58	1,49

Độ đúng

Hiệu suất thu hồi ở mỗi mức thêm chuẩn đối với 2 hoạt chất DAA và rutin đều nằm trong giới hạn cho phép 93 - 107% với độ lệch chuẩn

ở mỗi mức đều $< 2\%$. Như vậy phương pháp phân tích có độ đúng dao động trong khoảng sai lệch cho phép theo quy định của ICH (2005) và AOAC (2016).

Bảng 4. Độ đúng của phương pháp phân tích

STT	Mức thêm chuẩn	Hàm lượng thêm vào (μg)		Hàm lượng tìm thấy (μg)		Hiệu suất thu hồi (%)		Trung bình (%)		RSD (%)	
		DAA	Rutin	DAA	Rutin	DAA	Rutin	DAA	Rutin	DAA	Rutin
1	80%	67,2	417,6	63,8	428,1	94,9	102,5	96,8	102,6	1,85	0,53
2		67,2	417,6	65,1	430,8	96,9	103,2				
3		67,2	417,6	66,2	426,3	98,5	102,1				
4	100%	84,0	522,0	81,5	530,6	97,0	101,6	96,1	101,8	1,07	1,22
5		84,0	522,0	80,9	525,3	96,3	100,6				
6		84,0	522,0	79,8	538,2	95,0	103,1				
7	120%	100,8	626,4	95,3	638,7	94,5	102,0	94,9	101,6	1,81	0,45
8		100,8	626,4	97,6	633,4	96,8	101,1				
9		100,8	626,4	94,2	637,8	93,5	101,8				

Giới hạn phát hiện (LoD) và giới hạn định lượng (LoQ)

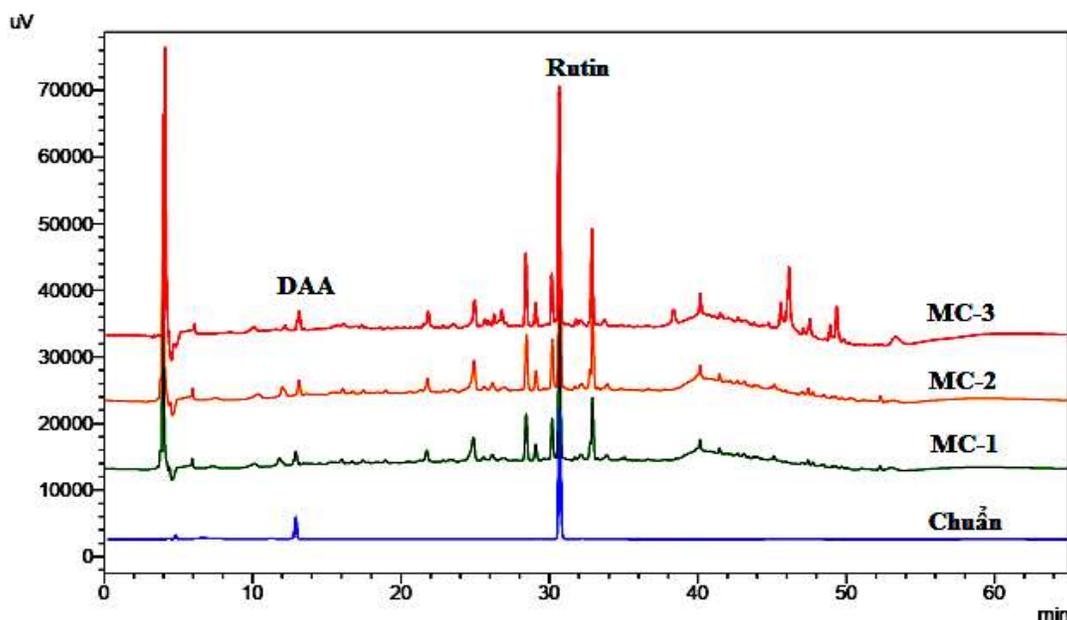
Tiến hành pha loãng các chuẩn đến nồng độ thấp sao cho có thể xác định được pic DAA và rutin có tỉ lệ chiều cao so với nhiễu đường nền $S/N \approx 2 - 3$. Kết quả cho thấy khi pha loãng DAA đến nồng độ 0,10 $\mu\text{g/ml}$ và rutin đến nồng độ 0,02 $\mu\text{g/ml}$ thì tỉ lệ S/N thu được lần lượt là 2,93 và 2,87. Do đó giới hạn phát hiện của DAA và rutin lần lượt là 0,1 $\mu\text{g/ml}$ và 0,02 $\mu\text{g/ml}$. Suy ra LoQ của DAA và rutin lần lượt là 0,33 $\mu\text{g/ml}$ và 0,07 $\mu\text{g/ml}$.

Dựa trên kết quả thẩm định quy trình

phân tích cho thấy phương pháp định lượng đã xây dựng có độ tin cậy và phù hợp để định lượng đồng thời DAA và rutin trong lá nhàu.

Hàm lượng acid deacetylasperulosidic và rutin trong các mẫu lá nhàu

Áp dụng phương pháp đã xây dựng để định lượng một số mẫu lá nhàu thu hái ở các vùng trồng khác nhau ở khu vực miền Nam. Trên sắc ký đồ của các mẫu MC-1, MC-2 và MC-3 ở hình 3 đều xuất hiện các pic có thời gian lưu tương đồng với chuẩn DAA và rutin, chứng tỏ các mẫu lá nhàu khảo sát đều có sự hiện diện của DAA và rutin.



Hình 3. Sắc ký đồ HPLC các mẫu lá nhàu

Kết quả hàm lượng DAA và rutin được xác định thể hiện ở bảng 5.

Bảng 5. Hàm lượng DAA và rutin trong lá nhàu

Mẫu	Khối lượng mẫu (g)	Độ ẩm (%)	Hàm lượng hoạt chất (%)		Trung bình \pm SD (% , n = 3)	
			DAA	Rutin	DAA	Rutin
MC-1	0,2014	11,79	0,031	0,236	0,029 \pm 0,002	0,235 \pm 0,006
	0,2095		0,029	0,229		
	0,2075		0,028	0,241		
MC-2	0,2038	11,32	0,032	0,239	0,032 \pm 0,002	0,229 \pm 0,009
	0,2014		0,033	0,221		
	0,2015		0,030	0,227		
MC-3	0,2014	11,59	0,041	0,257	0,041 \pm 0,001	0,261 \pm 0,004
	0,2022		0,041	0,261		
	0,2003		0,042	0,264		

So sánh các kết quả thu nhận được cho thấy, hàm lượng các hoạt chất trong lá nhàu có sự khác nhau giữa các vùng trồng. Hàm lượng DAA có giá trị trong khoảng từ 0,029% đến 0,041%, trong khi hàm lượng rutin có giá trị trong khoảng từ 0,229% đến 0,261%.

Kết luận

Phương pháp định lượng đồng thời DAA và rutin, hai hoạt chất quan trọng chiếm hàm lượng cao trong lá nhàu, đã được xây dựng và thẩm định. Phương pháp **HPLC** với đầu dò **UV-Vis** được thực hiện trên cột pha tĩnh C18 và rửa giải theo chương trình pha động acetonitril - acid formic 0,1%. Kết quả cho thấy quy trình phân tích thỏa mãn độ đặc hiệu, tính tuyến tính, tính thích hợp hệ thống, độ đúng, độ lặp lại và được áp dụng để xác định hàm lượng DAA và rutin trong một số mẫu lá nhàu thu hái tại các tỉnh phía Nam.

Tài liệu tham khảo

1. Đỗ Huy Bích và CS. (2007), *Cây thuốc và động vật làm thuốc Việt Nam tập II*, NXB Khoa học và Kỹ thuật, Hà Nội, tr. 443-446.
2. Sang S., Cheng X., Zhu N., Wang M., Jhoo J. W., Stark R. E., Ho C. T. (2001), "Iridoid glycosides from the leaves of *Morinda citrifolia*", *Journal of Natural Products*, 64 (6), pp. 799-800.
3. Almeida É. S., Oliveira D., Hotza D. (2019), "Properties and applications of *Morinda citrifolia* (Noni): A review", *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 18 (4), pp. 883-909.

4. Vuanghao, L., Laghari, M. H. (2017), "*Morinda citrifolia* (Noni): A comprehensive review on its industrial uses, pharmacological activities, and clinical trials", *Arabian Journal of Chemistry*, 10, pp. 691-707.

5. Thani W., Vallisuta O., Siripong P., Ruangwises N. (2010), "Anti-proliferative and antioxidative activities of Thai noni/Yor (*Morinda citrifolia* Linn.) leaf extract", *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health*, 41 (2), pp. 482-489.

6. Nayak B. S., Sandiford S., Maxwell A. (2009), "Evaluation of the wound-healing activity of ethanolic extract of *Morinda citrifolia* L. leaf", *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 6 (3), pp. 351-356.

7. Wada M., Yamasaki Y., Nakamura S., Takada M., Kawakami S., Nakashima K. (2016), "Determination of asperulosidic acid and deacetylasperulosidic acid in rat plasma after administration of *Morinda citrifolia* juice", *Chromatography*, 37 (3), pp. 141-145.

8. Deng S., West B. J., Jensen C. J. (2010), "A quantitative comparison of phytochemical components in global Noni fruits and their commercial products", *Food Chemistry*, 122 (1), pp. 267-270.

9. ICH (2005), Validation of analytical procedure: text and methodology Q2(R1). *Harmonised Tripartite Guideline*, 1-13.

10. AOAC (2016), Appendix F: Guideline for standard method performance requirements. *AOAC International*, Rockville, MD, USA.