

ĐỊNH LƯỢNG ĐỒNG THỜI ACID DEACETYLASPERULOSIDIC VÀ RUTIN TRONG QUẢ NHÀU BẰNG PHƯƠNG PHÁP HPLC-DAD

Nguyễn Nhật Minh, Đinh Trường Sơn, Nguyễn Thanh Phong, Nguyễn Văn Trí, Lê Văn Minh*

Trung tâm Sâm và Dược liệu thành phố Hồ Chí Minh - Viện Dược liệu

*Email: lvminh05@gmail.com

(Nhận bài ngày 15 tháng 12 năm 2022)

Tóm tắt

Quả nhàu (*Morinda citrifolia* L.) thuộc họ Cà phê (Rubiaceae) là dược liệu thông dụng được dùng nhiều trong y học cổ truyền ở Việt Nam. Hiện nay, Dược Điển Việt Nam V chưa có quy định về chỉ tiêu định lượng cho quả nhàu. Để kiểm soát chất lượng một cách hiệu quả hơn cần thiết có quy định về hàm lượng các hoạt chất chính trong quả nhàu. Trong nghiên cứu này, acid deacetylasperulosidic và rutin được sử dụng làm chất đánh dấu để đánh giá chất lượng quả nhàu bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC-DAD). Phương pháp Bảng 4d deacetylasperulosidic và rutin được thẩm định thỏa mãn độ đặc hiệu, tính tương thích hệ thống, độ lặp lại, độ đúng và độ nhạy cao. Quy trình định lượng được sử dụng để xác định hàm lượng acid deacetylasperulosidic và rutin trong 45 mẫu quả nhàu thu hái ở 15 tỉnh khác nhau. Hàm lượng acid deacetylasperulosidic và rutin của các mẫu quả nhàu lần lượt có giá trị trong khoảng 0,56 - 3,46% và 0,019 - 0,093%. Kết quả nghiên cứu có ý nghĩa trong việc nâng cấp tiêu chuẩn đối với chỉ tiêu định lượng của quả nhàu.

Từ khóa: *Morinda citrifolia* L., Acid deacetylasperulosidic, Rutin, Sắc ký lỏng hiệu năng cao, Định lượng, thẩm định quy trình.

Summary

Simultaneous Determination of Deacetylasperulosidic Acid and Rutin of Noni Fruit (*Morinda citrifolia* L.) by HPLC-DAD

Morinda citrifolia L. belongs to the Rubiaceae family. Noni fruit is a common medicinal herb widely used in traditional medicine in Vietnam. Currently, Vietnam Pharmacopoeia V does not have stipulated on quantity in Noni fruit monograph. To control quality more effectively, it is necessary to have regulations on the content of the main active components of Noni fruit. In this study, deacetylasperulosidic acid and rutin were used as markers for quality control of Noni fruit by high performance liquid chromatography method (HPLC-DAD). The simultaneous quantification of deacetylasperulosidic acid and rutin was developed with high specificity, system compatibility, repeatability, accuracy and sensitivity. The analytical procedure was used to determine the content of deacetylasperulosidic acid and rutin in 45 Noni fruit samples collected at 15 different provinces. The deacetylasperulosidic acid and rutin contents of the Noni fruit samples were found to have values in the range of 0.56 - 3.46% and 0.019 - 0.093%, respectively. The results are meaningful in upgrading the standard for quantitative assay of Noni fruit monograph in the Vietnam Pharmacopoeia.

Keywords: *Morinda citrifolia* L. fruit, Deacetylasperulosidic acid, Rutin, High performance liquid chromatography (HPLC), Simultaneous quantification, Validation.

1. Đặt vấn đề

Cây nhàu *Morinda citrifolia* L., họ Cà phê (Rubiaceae) từ lâu dùng trong các bài thuốc dân gian: quả giúp nhuận tràng, lợi tiểu, giảm ho, hạ sốt; lá dùng chữa mụn nhọt, kiết lỵ; rễ trị sung huyết, trĩ [1]. Dịch chiết từ quả nhàu có hoạt tính kháng oxy hóa [2], kháng khuẩn [3], kháng viêm [4], hạ huyết áp [7], giảm đường huyết [8], tăng cường miễn dịch [9], hạ lipid huyết [10]. Nghiên cứu thành phần hóa học cho thấy nhàu chứa các hợp chất iridoid glycosid, flavonoid, anthraquinon, coumarin, alkaloid, polysaccharid. Trong đó, acid deacetylasperulosidic và rutin là hai hoạt chất quan trọng có hàm lượng tương đối cao, mang lại nhiều tác dụng quý cho quả nhàu. Acid deacetylasperulosidic thuộc nhóm iridoid glycosid đã được chứng minh là có tác dụng kháng ung thư, tăng cường miễn dịch, hạ huyết áp, chống béo phì, rutin là flavonoid điển hình hiện có trong nhiều dược liệu, có tác dụng kháng oxy hóa, kháng viêm mạnh, ức chế nhiều chủng vi khuẩn, giúp hạ huyết

áp và ức chế nhiều dòng tế bào ung thư khác nhau [11],[12]. Hiện nay ở các nước trên thế giới, quả nhàu được phát triển thành sản phẩm trên nhiều lĩnh vực như y dược, hóa sinh, mỹ phẩm. Tuy vậy, ở Việt Nam các cơ sở để đánh giá và kiểm soát chất lượng của quả nhàu vẫn còn hạn chế. Dược Điển Việt Nam V quy định một số chỉ tiêu về hình thái, vi học, định tính và hàm lượng chất chiết được trong quả nhàu nhưng chưa có quy định cho chỉ tiêu định lượng. Do đó, việc xây dựng quy trình Bảng 4d deacetylasperulosidic và rutin trong quả nhàu là cần thiết để định hướng bổ sung và nâng cấp cho chỉ tiêu định lượng đối với chuyên luận quả nhàu trong Dược điển Việt Nam.

2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Đối tượng nghiên cứu

Quả nhàu già hoặc chín sau khi thu hái ở 45 điểm khác nhau từ 05/2022 đến 07/2022 (Bảng 1), được xử lý rửa sạch, thái lát mỏng, phơi khô và xay thành bột mịn (qua rây 355), lưu giữ trong túi nilon kín bảo quản nơi khô mát.

Bảng 1. Địa điểm thu hái và kí hiệu các mẫu quả nhàu

TT	Địa điểm thu hái	Kí hiệu	TT	Địa điểm thu hái	Kí hiệu
1	An Giang - Tịnh Biên	AG-1	24	HCM - Bình Thạnh	HC-3
2	An Giang - Châu Phú	AG-2	25	Khánh Hòa - Nha Trang	KH-1
3	An Giang - Tri Tôn	AG-3	26	Khánh Hòa - Cam Ranh	KH-2

TT	Địa điểm thu hái	Kí hiệu	TT	Địa điểm thu hái	Kí hiệu
4	BRVT - tp. Bà Rịa	BRVT-1	27	Khánh Hòa - Ninh Hòa	KH-3
5	BRVT - tp. Vũng Tàu	BRVT -2	28	Kiên Giang - U Minh Thượng	KG-1
6	BRVT - Xuyên Mộc	BRVT -3	29	Kiên Giang - Hòn Đất	KG-2
7	Bình Dương - Thủ Dầu Một	BD-1	30	Kiên Giang - Rạch Giá	KG-3
8	Bình Dương - Tân Uyên	BD-2	31	Kon Tum - tp. Kon Tum	KT-1
9	Bình Dương - Dĩ An	BD-3	32	Kon Tum - Đắk Hà	KT-2
10	Bình Phước - Bù Gia Mập	BP-1	33	Kon Tum - Đắk Tô	KT-3
11	Bình Phước - Lộc Ninh	BP-2	34	Long An - Đức Hòa	LA-1
12	Bình Phước - Đồng Xoài	BP-3	35	Long An - Tân An	LA-2
13	Cà Mau - Năm Căn	CM-1	36	Long An - Châu Thành	LA-3
14	Cà Mau - tp. Cà Mau	CM-2	37	Ninh Thuận - Thuận Nam	NT-1
15	Cà Mau - Đầm Dơi	CM-3	38	Ninh Thuận - Bác Ái	NT-2
16	Đồng Nai - Long Khánh	ĐN-1	39	Ninh Thuận - Ninh Sơn	NT-3
17	Đồng Nai - Xuân Lộc	ĐN-2	40	Tiền Giang - Cai Lậy	TG-1
18	Đồng Nai - Gia Kiệm	ĐN-3	41	Tiền Giang - Cái Bè	TG-2
19	Đồng Tháp - Sa Đéc	ĐT-1	42	Tiền Giang - tp. Mỹ Tho	TG-3
20	Đồng Tháp - Cao Lãnh	ĐT-2	43	Tây Ninh - Châu Thành	TN-1
21	Đồng Tháp - Châu Thành	ĐT-3	44	Tây Ninh - tp. Tây Ninh	TN-2
22	HCM - Thủ Đức	HCM-1	45	Tây Ninh - Trảng Bàng	TN-3
23	HCM - Quận 12	HCM-2		-	

2.2. Dung môi, hóa chất, trang thiết bị nghiên cứu

Dung môi và hóa chất: Methanol, acetonitril (Merck, Đức, độ tinh khiết $\geq 99\%$), acid formic (Merck, Đức, độ tinh khiết $\geq 98\%$).

Chất chuẩn đối chiếu: Acid deacetylasperulosidic (Chengdu Biopurity Phytochemicals Ltd., CAS 14259-55-3, Lot. PRF-10012341, độ tinh khiết $\geq 98\%$); rutin (Viện Kiểm Nghiệm tp. HCM, CAS 207671-50-9, Lot. QT152 050417, độ tinh khiết $\geq 98\%$).

Thiết bị: Bể siêu âm Branson 3510 (Đức); bếp ớn nhiệt cách thủy Memmert W40 (Đức); cân phân tích Presisa XR205-SM-DR (Đức); cân sấy ẩm hồng ngoại Kern (Đức); hệ thống sắc ký lỏng hiệu năng cao HPLC - đầu dò DAD Model: SPD-M20A (Shimadzu, Nhật Bản), cột sắc ký Supelco C18 (250 $\times$ 4,6 mm, 5 μ m).

2.3. Phương pháp nghiên cứu

2.3.1. Xây dựng quy trình định lượng:

Phương pháp Bảng 4d deacetylasperulosidic (DAA) và rutin được xây dựng dựa trên các nghiên cứu trước đây [13],[14]. Các điều kiện sắc ký được khảo sát bao gồm thành phần và tỉ lệ pha động, tốc độ dòng, bước sóng phân tích, từ đó lựa chọn được điều kiện phân tích tối ưu.

2.3.2. Thẩm định quy trình định lượng:

Phương pháp phân tích được thẩm định dựa trên hướng dẫn của AOAC 2016 [15] theo các yêu cầu về độ đặc hiệu, tính thích hợp của hệ thống; tính tuyến tính và khoảng xác định; độ chính xác (độ lặp lại và độ chính xác trung gian); độ đúng; giới hạn phát hiện và giới hạn định lượng.

2.3.3. Xác định hàm lượng DAA và rutin trong các mẫu dược liệu quả nhàu:

Tiến hành phân tích hàm lượng DAA và rutin trong 45 mẫu quả nhàu đã thu hái theo quy trình định lượng đã thẩm định. So sánh các kết quả thu được để đưa ra nhận định về sự khác biệt các mẫu thu hái giữa các vùng địa lý khác nhau.

3. Kết quả và bàn luận

3.1. Lựa chọn điều kiện sắc ký

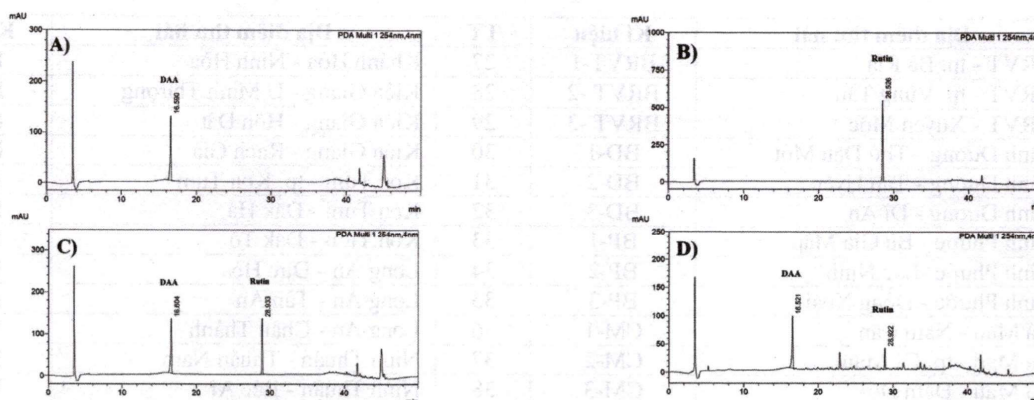
3.1.1. Thành phần dung môi và tỉ lệ pha động:

Theo báo cáo trước đây [13],[14], thành phần dung môi pha động được sử dụng để Bảng 4d deacetylasperulosidic và rutin trong lá nhàu là acetonitril và acid formic 0,1%. Sau khi tiến hành thẩm dò và hiệu chỉnh quy trình phù hợp với mẫu quả nhàu, hệ pha động của quy trình đã được thiết lập như ở Bảng 2.

Bảng 2. Chương trình pha động

Thời gian (phút)	Acetonitril (% tt/tt)	Acid formic 0,1% (% tt/tt)
0 - 5	0	100
5 - 30	0 $\rightarrow$ 35	100 $\rightarrow$ 65
30 - 35	35 $\rightarrow$ 90	65 $\rightarrow$ 10
35 - 40	90	10
40 - 45	90 $\rightarrow$ 0	10 $\rightarrow$ 100
45 - 50	0	100

Sắc ký đồ các mẫu phân tích sau khi khai triển sắc ký theo chương trình pha động đã thiết lập được ghi nhận ở Hình 1. Trên sắc ký đồ mẫu chuẩn, các pic của DAA và rutin đều tách tốt. Trên sắc ký đồ mẫu thử, tại vị trí thời gian tương ứng với chuẩn DAA và rutin, các pic cũng tách ra khỏi các pic khác trong mẫu thử. Do đó, hệ pha động đã thiết lập là phù hợp để xác định DAA và rutin.



Hình 1. Sắc ký đồ HPLC khảo sát chương trình pha động
A: chuẩn DAA, B: chuẩn rutin, C: hỗn hợp chuẩn DAA và rutin, D: mẫu thử quả nhàu

3.1.2. Bước sóng phân tích:

Thực hiện quét phổ UV-Vis từ 200 - 800 nm của các pic chuẩn DAA và rutin cho thấy DAA hấp thụ cực đại tại bước sóng 238 nm, rutin hấp thụ cực đại tại bước sóng 254 nm và 354 nm. Lựa chọn bước sóng phân tích ở 254 nm là phù hợp.

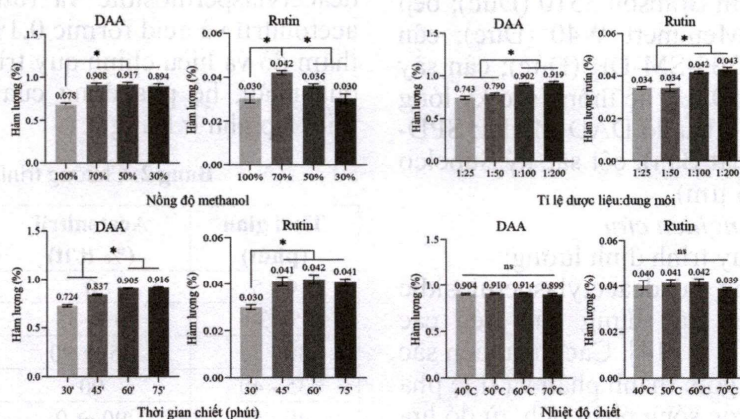
3.1.3. Tốc độ dòng và thể tích tiêm mẫu:

Tiến hành chạy sắc ký theo hệ dung môi đã thiết lập với tốc độ dòng từ 0,6 đến 1,2 mL/phút và thể tích tiêm mẫu là 20 μ l. Kết quả cho thấy độ phân giải đạt ($R_s > 1,6$) với tốc độ dòng 0,8 mL/phút.

3.2. Khảo sát phương pháp chiết mẫu quả nhàu

Cân chính xác 0,1 g mẫu bột quả nhàu và tiến hành khảo sát các điều kiện chiết mẫu thử bao gồm dung môi chiết, tỉ lệ được liệu : dung môi,

thời gian chiết và nhiệt độ chiết. Để xác định dung môi thích hợp, mẫu thử được chiết với methanol ở các nồng độ 100%, 70%, 50% và 30%. Kết quả cho thấy methanol ở nồng độ 70% cho hiệu quả chiết rutin cao nhất, còn ở nồng độ 50% cho khả năng chiết DAA cao nhất tuy nhiên không khác biệt so với khi chiết ở nồng độ 70%. Khảo sát tỉ lệ được liệu : dung môi ở các mức 1:25, 1:50, 1:100 và 1:200 cho thấy mức 1:100 tương đương mức 1:200 và hiệu quả hơn so mức 1:25, 1:50. Khảo sát thời gian siêu âm từ 30, 45, 60, 75 phút thì hàm lượng DAA và rutin tăng lên, tuy nhiên ở mốc thời gian 60, 75 phút không khác biệt. Khi tăng dần nhiệt độ chiết từ 40°C, 50°C, 60°C đến 70°C, thì hàm lượng DAA và rutin không khác biệt (Hình 2).



Hình 2. Khảo sát điều kiện chiết mẫu quả nhàu
(*): khác biệt có ý nghĩa với $p < 0,05$; (ns): khác biệt không có ý nghĩa.

Từ các khảo sát trên đã chọn được điều kiện chiết mẫu phù hợp là: Cân chính xác 0,1 g bột quả nhàu vào ống nghiệm có nắp, thêm chính xác 10 ml methanol 70%, cân xác định khối lượng, chiết bằng siêu âm trong 60 phút ở 40°C, mỗi 20 phút lắc đều ống. Sau khi chiết xong để nguội rồi cân bù lại khối lượng đã mất bằng methanol 70% để được khối lượng ban đầu, lọc dịch chiết qua màng PTFE 0,45 μ m thu được dung dịch mẫu thử.

3.3. Công thức tính hàm lượng DAA và rutin
Hàm lượng DAA và rutin trong mẫu quả nhàu được xác định bởi công thức:

$$X(\%) = \frac{C \times 10 \times 98}{m} \times 10^{-4}$$

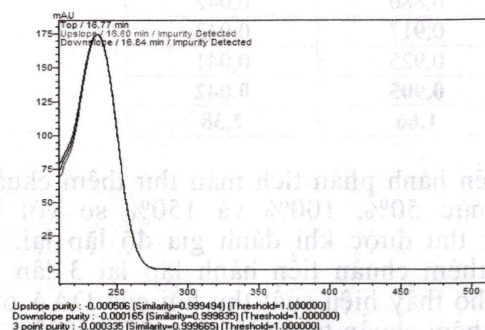
Trong đó: C là nồng độ hoạt chất DAA hoặc rutin của mẫu thử suy ra từ đường chuẩn (μ g/ml);

10 là thể tích dung môi chiết mẫu (ml), 98 là độ tinh khiết của chuẩn (%), m là khối lượng mẫu đã trừ ẩm dùng để định lượng (g)

3.4. Thẩm định quy trình

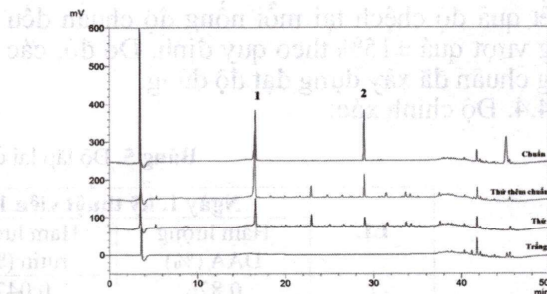
3.4.1. Độ đặc hiệu (tính chọn lọc):

Tiến hành phân tích định lượng mẫu trắng (MeOH 70%), mẫu hỗn hợp chuẩn (DAA 100 µg/ml, rutin 25 µg/ml), mẫu thử và mẫu thử thêm chuẩn ở mức 100%. Kết quả thu được ghi nhận ở Hình 2.

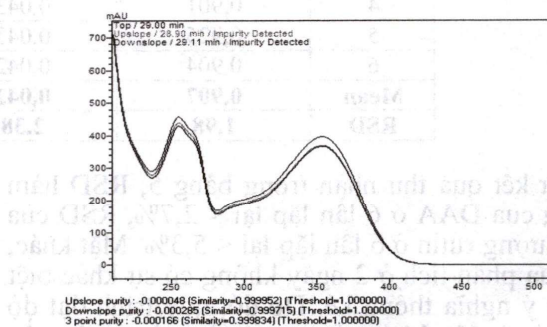


Hình 3. Phổ UV đánh giá độ tinh khiết của pic DAA và rutin

Quan sát sắc ký đồ mẫu thử có các pic có thời gian lưu tương đồng với các pic của chuẩn DAA và rutin. Ở mẫu thử thêm chuẩn, diện tích pic DAA và rutin tăng lên so với diện tích pic của mẫu thử. Mặt khác, đánh giá độ tinh khiết pic khi so sánh phổ UV của mẫu thử ở 3 điểm, hệ số tương đồng phổ của



Hình 2. Sắc ký đồ HPLC thể hiện độ đặc hiệu của quy trình định lượng. 1: DAA, 2: rutin



DAA và rutin đều > 0,999 (Hình 3). Do đó quy trình định lượng đạt độ đặc hiệu.

3.4.2. Tính tương thích hệ thống:

Tiến hành phân tích lặp lại 6 lần dung dịch hỗn hợp chuẩn DAA 100 µg/ml và rutin 25 µg/ml, kết quả thể hiện ở Bảng 3.

Bảng 3. Tính tương thích hệ thống của quy trình định lượng

Thông số hệ thống	DAA	Rutin
Thời gian lưu (min)	$\bar{x} = 16,697$; RSD = 0,67%	$\bar{x} = 28,917$; RSD = 0,15%
Diện tích pic (mV*s)	$\bar{x} = 590779$; RSD = 0,90%	$\bar{x} = 1079942$; RSD = 0,56%

Kết quả phân tích mẫu hỗn hợp chuẩn DAA và rutin cho thấy, RSD thời gian lưu và diện tích pic của DAA và rutin đều < 2%. Các thông số hệ thống đều đạt theo yêu cầu của AOAC.

3.4.3. Khoảng tuyến tính và đường chuẩn:

Chuẩn DAA và rutin hòa tan và pha loãng bằng methanol tạo thành dãy hỗn hợp chuẩn có

nồng độ DAA trong khoảng 12,5 - 400 µg/ml và rutin trong khoảng 3,13 - 100 µg/ml. Phân tích các mẫu chuẩn theo điều kiện sắc ký đã chọn, thu được đường hồi quy tuyến tính của DAA và rutin với hệ số tương quan $R > 0,995$. Chứng tỏ nồng độ chuẩn DAA, rutin và diện tích pic có tương quan rất chặt chẽ.

Bảng 4. Đường chuẩn và khoảng tuyến tính của chuẩn DAA và rutin

DAA				Rutin			
Nồng độ (µg/ml)	Diện tích pic (mV*s)	Nồng độ tính lại (µg/ml)	Độ chệch (%)	Nồng độ (µg/ml)	Diện tích pic (mV*s)	Nồng độ tính lại (µg/ml)	Độ chệch (%)
400	2395532	403,3	0,84	100	4563166	100,6	0,59
200	1136876	193,0	-3,53	50	2200560	49,0	-2,09
100	581792	100,2	0,16	25	1083554	24,5	-1,83
50	278825	49,5	-0,97	12,5	530642	12,5	-0,33
25	147115	27,5	9,99	6,25	278080	6,9	11,02
12,5	66594	14,0	12,31	3,13	115652	3,4	8,27
$y = 5982,3x - 17387$, $R = 0,9997$				$y = 45756x - 39412$, $R = 0,9998$			

Kết quả độ chệch tại mỗi nồng độ chuẩn đều không vượt quá $\pm 15\%$ theo quy định. Do đó, các đường chuẩn đã xây dựng đạt độ đúng.

3.4.4. Độ chính xác:

Tiến hành phân tích định lượng mẫu thử lặp lại 6 lần, với quy trình chiết tương tự ở phần chuẩn bị mẫu thử, trong 2 ngày liên tiếp và thực hiện bởi 2 kỹ thuật viên khác nhau.

Bảng 5. Độ lặp lại của quy trình phân tích

LL	Ngày 1, kỹ thuật viên 1		Ngày 2, kỹ thuật viên 2	
	Hàm lượng DAA (%)	Hàm lượng rutin (%)	Hàm lượng DAA (%)	Hàm lượng rutin (%)
1	0,876	0,042	0,890	0,042
2	0,911	0,042	0,911	0,042
3	0,925	0,042	0,903	0,042
4	0,901	0,043	0,886	0,042
5	0,925	0,043	0,917	0,043
6	0,904	0,042	0,925	0,041
Mean	0,907	0,042	0,905	0,042
RSD	1,98	2,38	1,66	2,38

Từ kết quả thu nhận trong bảng 5, RSD hàm lượng của DAA ở 6 lần lặp lại $< 2,7\%$, RSD của hàm lượng rutin ở 6 lần lặp lại $< 5,3\%$. Mặt khác, kết quả phân tích ở 2 ngày không có sự khác biệt mang ý nghĩa thống kê. Do đó, quy trình đạt độ lặp lại và độ chính xác trung gian theo yêu cầu của AOAC.

3.4.5. Độ đúng:

Tiến hành phân tích mẫu thử thêm chuẩn ở các mức 50%, 100% và 150% so với hàm lượng thu được khi đánh giá độ lặp lại. Mỗi mức thêm chuẩn tiến hành lặp lại 3 lần. Kết quả cho thấy hiệu suất thu hồi của DAA ở các mức thêm chuẩn trong khoảng 97 - 103%, hiệu suất thu hồi rutin trong khoảng 95 - 105%, đạt theo yêu cầu của AOAC.

Bảng 6. Mức thêm chuẩn và hiệu suất thu hồi của quy trình định lượng ($n = 3$)

Mức thêm chuẩn	Lượng ban đầu (μg)		Lượng thêm vào (μg)		Lượng thu hồi (μg)		Hiệu suất thu hồi (%)	
	DAA	Rutin	DAA	Rutin	DAA	Rutin	DAA	Rutin
50%	907	42	450	20	1364,7	61,2	99,1 - 102,2	96,0 - 99,3
100%	907	42	900	40	1821,2	81,0	100,8 - 102,1	96,4 - 99,0
150%	907	42	1400	60	2327,8	100,1	101,9 - 102,7	95,5 - 99,8

3.4.6. Giới hạn phát hiện (LOD), giới hạn định lượng (LOQ):

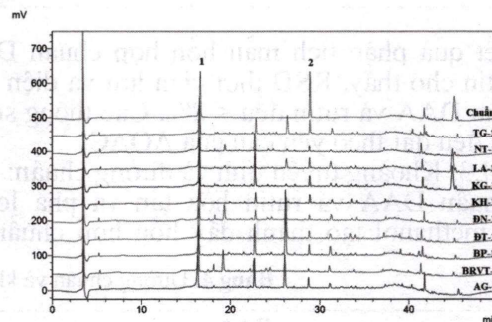
Tiến hành pha loãng mẫu thử đến nồng độ thấp dần sao cho tỉ lệ tín hiệu pic DAA và rutin so với nhiễu nền $S/N = 2 - 3$. Kết quả khảo sát cho thấy tín hiệu pic rutin có $S/N = 2,93$ tương ứng với nồng độ mẫu là $0,08 \mu\text{g/ml}$. Tín hiệu pic DAA có $S/N = 2,76$, tương ứng với nồng độ DAA là $0,44 \mu\text{g/ml}$. Giới hạn phát hiện của DAA và rutin lần lượt là $50 \mu\text{g/g}$ và $9,1 \mu\text{g/g}$ suy ra giới hạn định lượng của DAA và rutin lần lượt là $165 \mu\text{g/g}$ và $30 \mu\text{g/g}$ tính theo khối lượng mẫu khô.

3.5. Xác định hàm lượng acid deacetylasperulosidic và rutin trong các mẫu quả nhàu

Quy trình định lượng đồng thời DAA và rutin sau khi thẩm định đạt các tiêu chí của AOAC 2016 được áp dụng phương pháp đã xây dựng để định lượng 45 mẫu quả nhàu thu hái ở 15 tỉnh khác nhau.

Trên sắc ký đồ HPLC các mẫu quả nhàu ở Hình 4 đều có pic tương ứng với pic chuẩn DAA và rutin, chứng tỏ các mẫu quả nhàu ở các địa điểm thu hái đều có chứa DAA và rutin. Tuy

nhiên, hàm lượng DAA và rutin ở các mẫu không đồng đều (Bảng 7).



Hình 4. Sắc ký đồ HPLC một số quả nhàu mẫu đại diện cho các địa điểm thu mẫu

1: DAA, 2: rutin

Hàm lượng DAA trung bình của các mẫu khảo sát là $1,32\%$. Trong 45 mẫu khảo sát thì có 19 mẫu (chiếm $42,2\%$) đạt trên giá trị trung bình và 26 mẫu (chiếm $57,8\%$) dưới giá trị trung bình. Nhìn chung, các mẫu có hàm lượng DAA cao tập trung ở vùng Tây Nam Bộ gồm có An Giang,

Kiên Giang, Tiền Giang, Cà Mau, Đồng Tháp. Mẫu có hàm lượng DAA cao nhất là Cai Lậy - Tiền Giang (3,459%), các tỉnh ở vùng Nam Trung Bộ - Tây Nguyên có hàm lượng tương đối thấp hơn so với các tỉnh ở Đông Nam Bộ. Mẫu Xuyên Mộc - Bà Rịa - Vũng Tàu có hàm lượng DAA thấp nhất (0,587%). Deng và cs. (2011) cũng đã xác định hàm lượng DAA trong quả nhàu thu hái tại 5 nước khác nhau có giá trị từ 1,38 - 4,29%, trong đó quả nhàu thu hái ở Thái Lan là nước kế cận Việt Nam có hàm lượng DAA cao nhất đạt 4,29% [16]. Kết quả này cũng khá tương đồng với các nghiên cứu của Choi và cs. (2021) khi xác định hàm lượng DAA trong

quả nhàu là 1,53 - 3,41% [14].

Đối với rutin, trung bình hàm lượng trong 45 mẫu khảo sát là 0,042%. Trong đó, có 20 mẫu (chiếm 44,4%) đạt trên trung bình và 25 mẫu (chiếm 55,6%) thấp hơn giá trị trung bình. So sánh tương quan giữa hàm lượng rutin và vùng thu hái thì thấy rằng các mẫu thu ở các vùng chưa thể hiện sự khác biệt rõ ràng. Nếu đánh giá trên độ chín của quả thấy rằng mẫu quả già, trái còn cứng sẽ có hàm lượng rutin cao hơn mẫu quả chín, trái mềm. Mẫu quả Đắk Tô - Kon Tum, có hàm lượng rutin cao nhất đạt 0,093%, mẫu Thủ Đức - Hồ Chí Minh và thành phố Vũng Tàu - Bà Rịa - Vũng Tàu có hàm lượng rutin thấp nhất chỉ đạt 0,019%.

Bảng 7. Hàm lượng DAA và rutin các mẫu quả nhàu ($n = 3$)

TT	Mẫu	Hàm lượng (%)		TT	Mẫu	Hàm lượng (%)	
		DAA	Rutin			DAA	Rutin
1	AG-1	1,456 ± 0,039	0,054 ± 0,002	24	HCM-3	0,815 ± 0,016	0,090 ± 0,002
2	AG-2	1,987 ± 0,052	0,037 ± 0,001	25	KG-1	1,495 ± 0,042	0,046 ± 0,001
3	AG-3	1,471 ± 0,032	0,051 ± 0,001	26	KG-2	1,792 ± 0,030	0,033 ± 0,001
4	BD-1	1,032 ± 0,027	0,037 ± 0,000	27	KG-3	1,811 ± 0,025	0,034 ± 0,001
5	BD-2	1,144 ± 0,019	0,032 ± 0,001	28	KH-1	1,119 ± 0,013	0,045 ± 0,002
6	BD-3	0,630 ± 0,020	0,051 ± 0,002	29	KH-2	0,863 ± 0,006	0,049 ± 0,001
7	BP-1	1,196 ± 0,032	0,048 ± 0,000	30	KH-3	1,086 ± 0,021	0,057 ± 0,002
8	BP-2	0,793 ± 0,014	0,048 ± 0,001	31	KT-1	1,491 ± 0,019	0,032 ± 0,001
9	BP-3	1,109 ± 0,022	0,037 ± 0,001	32	KT-2	0,882 ± 0,007	0,054 ± 0,000
10	BRVT-1	0,561 ± 0,009	0,026 ± 0,000	33	KT-3	1,441 ± 0,018	0,093 ± 0,003
11	BRVT-2	1,550 ± 0,015	0,019 ± 0,000	34	LA-1	1,141 ± 0,022	0,050 ± 0,001
12	BRVT-3	0,867 ± 0,026	0,051 ± 0,001	35	LA-2	0,639 ± 0,021	0,031 ± 0,000
13	CM-1	1,345 ± 0,038	0,021 ± 0,001	36	LA-3	1,489 ± 0,033	0,043 ± 0,002
14	CM-1	1,688 ± 0,016	0,046 ± 0,002	37	NT-1	1,289 ± 0,013	0,050 ± 0,002
15	CM-3	2,357 ± 0,029	0,041 ± 0,001	38	NT-2	1,391 ± 0,034	0,065 ± 0,001
16	ĐN-1	1,119 ± 0,019	0,036 ± 0,001	39	NT-3	1,058 ± 0,008	0,039 ± 0,000
17	ĐN-2	1,163 ± 0,010	0,025 ± 0,000	40	TG-1	1,959 ± 0,032	0,039 ± 0,001
18	ĐN-3	0,901 ± 0,042	0,068 ± 0,001	41	TG-2	3,459 ± 0,015	0,037 ± 0,001
19	ĐT-1	1,937 ± 0,028	0,035 ± 0,000	42	TG-3	1,829 ± 0,024	0,031 ± 0,000
20	ĐT-2	1,153 ± 0,020	0,028 ± 0,001	43	TN-1	1,256 ± 0,036	0,034 ± 0,001
21	ĐT-3	1,661 ± 0,035	0,053 ± 0,002	44	TN-2	0,730 ± 0,023	0,031 ± 0,001
22	HCM-1	0,870 ± 0,011	0,019 ± 0,000	45	TN-3	1,274 ± 0,025	0,025 ± 0,000
23	HCM-2	1,096 ± 0,008	0,038 ± 0,001				

Đánh giá sự góp mặt của DAA và rutin vào tổng hàm lượng hai chất thấy rằng DAA chiếm từ 90 - 99% tổng hàm lượng hai chất, trong khi đó rutin chỉ chiếm từ 1 - 10%. Hàm lượng trung bình DAA là 1,32% gấp 31,4 lần so với hàm lượng trung bình rutin (0,042%). Từ hai lý do trên, chọn lựa DAA làm chất chỉ dấu (marker) để đánh giá chất lượng quả nhàu sẽ đảm bảo về độ tin cậy khoa học hơn so với rutin. Mức tiêu chuẩn đề nghị được tính theo hàm lượng trung bình của DAA × 85%, tức là hàm lượng DAA trong mẫu quả nhàu không được thấp hơn 1,1% tính trên khối lượng được liệu khô.

Dựa trên mức tiêu chuẩn đã xây dựng, có 31 mẫu quả nhàu (chiếm 68,9%) đạt yêu cầu. Các mẫu đạt tập trung chủ yếu ở vùng Tây Nam Bộ, do đó các tỉnh Tây Nam Bộ như An Giang, Cà Mau, Đồng Tháp, Kiên Giang, Tiền Giang được xem là các địa phương có tiềm năng để phát triển vùng

trồng nhàu trên quy mô lớn, cung cấp nguyên liệu cho sản xuất.

4. Kết luận

DAA và rutin là hai hoạt chất đóng vai trò quan trọng trong quả nhàu. Nghiên cứu đã sử dụng DAA và rutin để kiểm soát chất lượng cho được liệu quả nhàu. Phương pháp được thẩm định đạt các yêu cầu của AOAC 2016 và quy trình cũng được áp dụng để xác định hàm lượng DAA và rutin trong 45 mẫu quả nhàu thu ở các khu vực khác nhau. Kết quả của nghiên cứu đã xác định DAA là chất chỉ dấu có độ tin cậy cao, có tính khoa học để đề nghị tiêu chuẩn định lượng đối với chuyên luận quả nhàu cho Dược Điển Việt Nam ở ấn bản tiếp theo.

Lời cảm ơn: Nhóm tác giả xin gửi lời cảm ơn đến Viện Dược liệu đã tài trợ kinh phí cho các nội dung nghiên cứu của bài báo trong khuôn khổ Đề tài cơ sở cấp Viện Dược liệu - 2022 "Nghiên cứu đánh giá chất lượng lá, quả nhàu và nâng cấp tiêu chuẩn quả nhàu so với ĐDVN V".

1. Đỗ Huy Bích, Đặng Quang Chung, Bùi Xuân Chương, Nguyễn Thượng Đông, Đỗ Trung Đàm, Phạm Văn Hiền, Vũ Ngọc Lộ, Phạm Duy Mai, Phạm Kim Mân, Đoàn Thị Nhu, Nguyễn Tân, Trần Toàn (2007). *Cây thuốc và động vật làm thuốc Việt Nam*. Tập II. NXB Khoa học và Kỹ thuật. Hà Nội. 443-446.
2. Li J., Niu D., Zhang Y., Zeng X. A. (2020). Physicochemical properties, antioxidant and antiproliferative activities of polysaccharides from *Morinda citrifolia* L. (Noni) based on different extraction methods. *International Journal of Biological Macromolecules*, 150, 114-121.
3. Noviana R., Fairina A., Eriadi A., Asra R. (2021). Antimicrobial Activity of *Morinda Citrifolia* L. *Asian Journal of Pharmaceutical Research and Development*, 9(1), 141-148.
4. Tanikawa T., Kitamura M., Havashi Y., Tomida N., Uwawa A., Isami F., Inoue Y. (2021). Anti-inflammatory effects of *Morinda citrifolia* extract against lipopolysaccharide-induced inflammation in RAW264 cells. *Medicines*, 8(8), 43-50.
5. Ma L. D., Lin G. B., Yang L. B., Cao J. L., Wang J., Chen O. D., Zhong, W. J. (2021). *Morinda citrifolia* (Noni) juice suppresses A549 human lung cancer cells via inhibiting AKT/nuclear factor- κ B signaling pathway. *Chinese Journal of Integrative Medicine*, 27(9), 688-695.
6. Selvam P., Maddali K., Marchand C., Pommier Y. (2010). Studies of HIV Integrase Inhibitory Activity of *Morinda citrifolia* L. Noni Fruit Extracts. *Antiviral Research*, 86(1), A45-A46.
7. Wizat D., Anwar K., Sudarsono, Nugroho A. E. (2017). Hypotensive activity of ethanolic extracts of *Morinda citrifolia* L. leaves and fruit in dexamethasone-induced hypertensive rat. *Journal of Evidence-Based Complementary & Alternative Medicine*, 22(1), 107-113.
8. Algenstaedt P., Stumpfenhagen A., Westendorf J. (2018). The effect of *Morinda citrifolia* L. fruit juice on the blood sugar level and other serum parameters in patients with diabetes type 2. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2018, 1-10.
9. Pratap U. P., Hima L., Privanka H. P., Thiruganesh S. (2017). Noni (*Morinda citrifolia* L.) fruit juice reverses age-related decline in neural-immune interactions in the spleens of old F344 rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 198, 363-371.
10. Inada A. C., Figueiredo P. S., Santos-Eichler R. A. D., Freitas K. D. C., Hiane P. A., Castro A. P. D., Guimarães R. D. C. A. (2017). *Morinda citrifolia* Linn. (Noni) and its potential in obesity-related metabolic dysfunction. *Nutrients*, 9(6), 540-568.
11. Sina H., Dramane G., Tchekounou P., Assogba M. F., Chabi-Sika K., Bova B., Baba-Moussa, L. (2021). Phytochemical composition and *in vitro* biological activities of *Morinda citrifolia* fruit juice. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 28(2), 1331-1335.
12. Wang M., Wang O., Yang X., Feng S., Wang Z. (2019). Comparison of anthraquinones, iridoid glycosides and triterpenoids in *Morinda officinalis* and *Morinda citrifolia* using UPLC/O-TOF-MS and multivariate statistical analysis. *Molecules*, 25(1), 160-75.
13. Choi S. I., Kwon H. Y., La I. J., Jo Y. H., Han X., Men X., Lee O. H. (2021). Development and validation of an analytical method for deacetylasperulosidic acid, asperulosidic acid, scopolin, asperuloside and scopoletin in fermented *Morinda citrifolia* L. (Noni). *Separations*, 8(6), 80-90.
14. Lê Văn Minh, Nguyễn Nhật Minh, Lâm Bích Thảo, Nguyễn Văn Trí, Lý Hải Triều (2021). Xây dựng và thẩm định phương pháp HPLC-DAD định lượng rutin và các iridoid trong lá noni (*Morinda citrifolia* L.). *Bảng Phương Pháp HPLC/UV-Vis*, *Tạp chí Y Dược học*, 24(7), 81-86.
15. AOAC (2016). Appendix F: Guideline for standard method performance requirements. *AOAC International*, Rockville, MD, USA.
16. Deng S., West B. J., Palu, A. K., & Jensen, C. J. (2011). Determination and comparative analysis of major iridoids in different parts and cultivation sources of *Morinda citrifolia*. *Phytochemical Analysis*, 22(1), 26-30.

Tạp chí Dược liệu, tập 28, số 1/2023 (Trang 34 - 40)

XÂY DỰNG PHƯƠNG PHÁP HPLC-DAD ĐỊNH LƯỢNG ĐỒNG THỜI PIPERIN, GUINEESIN VÀ PIPERNONALIN TRONG QUẢ TIÊU LÓT THU TẠI VIỆT NAM

Nguyễn Thị Hà Ly, Nguyễn Trà My, Nguyễn Thị Thu, Vũ Thị Diệp, Nguyễn Thị Hằng,

Phạm Thị Hiền, Nguyễn Minh Khởi, Đỗ Thị Hà*

Viện Dược liệu

*Email: hado.nimms@gmail.com

(Nhận bài ngày 30 tháng 01 năm 2023)

Tóm tắt

Chúng tôi xây dựng và thẩm định phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC-DAD) đơn giản, độ nhạy cao để định lượng đồng thời piperin, guineesin và pipernonalin trong quả tiêu lốt. Quá trình sắc ký được thực hiện trên cột C_{18} của hãng Agilent (250 x 4,6 mm, 5 μ m) với chương trình rửa giải gradient sử dụng hệ dung môi pha động gồm acetonitril và nước. Tốc độ rửa giải là 0,6 mL/phút, bước sóng phát hiện được lựa chọn là 343 nm đối với hợp chất piperin, 260 nm đối với hai hợp chất guineesin và pipernonalin. Các đường chuẩn xây dựng được đều đạt độ tuyến tính cao với $R^2 > 0,99$. Kết quả thẩm định phương pháp về độ lặp lại, hiệu suất thu hồi, độ chọn lọc đều đạt theo hướng dẫn của ICH và AOAC. Hàm lượng piperin, guineesin và pipernonalin trong 03 mẫu quả tiêu lốt thu thập tại Việt Nam đạt lần lượt là 2,64 - 3,94%, 0,11 - 0,19% và 0,48 - 0,73%.

Từ khóa: Quả tiêu lốt, Piperin, Guineesin, Pipernonalin, HPLC-DAD.

Summary

Development of an HPLC-DAD Method for the Quantification of Piperine, Guineesin and Pipernonaline in the Fruit of *Piper longum* L. Collected in Vietnam

A simple and sensitive high performance liquid chromatography (HPLC-DAD) method for simultaneous quantification of piperine, guineesin, and pipernonaline in the fruit of *Piper longum* was developed and validated. The chromatographic separations were obtained by an Agilent C_{18} column (250 x 4.6 mm i.d., 5 μ m particle size) using gradient elution with acetonitrile and water. The flow rate of 0.6 mL/min and detection wavelength of 343 nm for piperine, 260 nm for guineesin and pipernonaline were selected. All calibration curves displayed a good linear relationship ($R^2 > 0.99$). The validation results displayed the good accuracy, repeatability, linearity, and selectivity according to the ICH guideline. The contents of piperine, guineesin, and pipernonaline in the fruit of *Piper longum* samples collected in Vietnam were 2.64-3.94%, 0.11-0.19% and 0.48-0.73%, respectively.

Keywords: Fruits of *Piper longum* L., Piperine, Guineesin, Pipernonaline, HPLC-DAD.