

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., Thiruvaga Raian 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., Yan 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, scopulin, 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 Bàng 4d deacetylasperulosidic và rutin trong lá nhàu (*Morinda citrifolia* L.) Bàng 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 C₁₈ 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 R²>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 C₁₈ 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 (R²>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.

1. Đặt vấn đề

Từ lâu, quả của cây tiêu lốt (*Piper longum* Linn.) (thuộc họ Hồ tiêu Piperaceae) đã được sử dụng phổ biến làm gia vị ở Việt Nam. Theo y học cổ truyền, quả tiêu lốt có vị cay, tính nóng, có tác dụng ôn trung, tán hàn, hạ khí, chỉ thống, kiện vị [1]. Người Trung Quốc sử dụng tiêu lốt để trị các chứng bụng lạnh, đau, nôn, buồn ói, tiêu chảy. Y học cổ truyền Việt Nam dùng tiêu lốt để trị đau bụng, tiêu chảy, đau nhức đầu, chảy nước mũi, viêm xoang, kinh nguyệt không đều [1],[2]. Y học hiện đại đã chứng minh quả tiêu lốt có một số tác dụng như kích thích miễn dịch, chống loét, chống oxy hóa, bảo vệ gan, tim mạch và chống viêm [1],[3]. Các hoạt tính này chủ yếu là do sự có mặt của các chất chuyển hóa thứ cấp trong quả tiêu lốt, đáng kể đến là một lượng lớn các alkaloid và các hợp chất liên quan như piperin, methyl piperin, piperonalin, guineesin, piperlongumin, piperlonguminin [3],[4]. Nhiều phương pháp đã được phát triển và áp dụng để phân tích hàm lượng alkaloid trong quả tiêu lốt [5],[8]. Quả khô của tiêu lốt đã được Dược điển Trung Quốc quy định thành chuyên luận riêng, trong đó piperin được dùng làm chất đánh dấu trong các chỉ tiêu định tính và định lượng [5]. Dược điển Ai Cập có chuyên luận *Pippali* quy định cho quả của loài *Piper longum*, gồm các chỉ tiêu mô tả, vi phẫu, bột, định tính bằng TLC, chưa có chỉ tiêu định lượng thành phần hóa học chính [6]. Hiện nay, Dược điển Việt Nam V chưa có chuyên luận đối với tiêu lốt (*Piper longum*) [2]. Nghiên cứu này được thực hiện nhằm phát triển phương pháp HPLC-DAD để định lượng đồng thời ba hợp chất piperin, guineesin, piperonalin trong quả tiêu lốt thu tại Việt Nam. Phương pháp HPLC-DAD phát triển được nhằm góp phần nâng cao công tác tiêu chuẩn hóa và đánh giá chất lượng của quả tiêu lốt (*Piper longum*) ở Việt Nam.

2. Nguyên liệu và phương pháp nghiên cứu

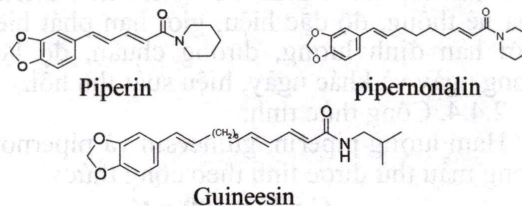
2.1. Nguyên liệu

Mẫu dùng cho nghiên cứu phát triển phương pháp phân tích là bộ phận quả của cây tiêu lốt được thu hái vào 12/09/2020 tại Chư Sê, Gia Lai (M1); Hai mẫu quả tiêu lốt (M2, M3) thu tại Đắk Song, Đắk Nông được dùng để áp dụng phương pháp định lượng phát triển được. Các mẫu nghiên cứu được PGS.TS. Phạm Thanh Huyền, Viện Dược liệu giám định tên khoa học là *Piper longum* L., thuộc họ Hồ tiêu - Piperaceae (Mã tiêu bản N12-PL). Mẫu sau khi thu hái được sấy khô trong tủ sấy ở nhiệt độ 50°C, để nguội và bảo quản trong túi nilon kín để phục vụ quá trình nghiên cứu.

2.2. Dung môi, hóa chất

Các chất đối chiếu piperin, guineesin và piperonalin được nhóm nghiên cứu phân lập từ quả tiêu lốt (mẫu M1). Cấu trúc của các chất được xác định dựa trên dữ liệu phổ (MS, IR,

NMR) và so sánh với các tài liệu tham khảo (Hình 1). Độ tinh khiết của các chất đối chiếu đều đạt trên 95,0% (kiểm tra bằng phương pháp HPLC, tính theo phần trăm diện tích pic). Các dung môi, hóa chất sử dụng đều là hoá chất tinh khiết phân tích (PA) của hãng Merck (Đức) hoặc tương đương.



Hình 1. Cấu trúc hóa học của các chất đối chiếu dùng trong nghiên cứu

2.3. Thiết bị

Thiết bị chính dùng trong nghiên cứu là hệ thống HPLC (Shimadzu, Nhật Bản) gồm bơm LC-20AD, bộ tiêm mẫu tự động SIL-20AHT, detector DAD, phần mềm Labsolution để truy xuất hình ảnh và số liệu từ hệ thống.

2.4. Phương pháp nghiên cứu

2.4.1. Tối ưu hóa điều kiện phân tích sắc ký:

Để tối ưu hóa các điều kiện phân tích sắc ký, sử dụng các dung dịch sau:

- Dung dịch chuẩn: có nồng độ từng chất khoảng 40 µg/ml, pha trong ethanol 80%.

- Dung dịch mẫu thử: Cân chính xác khoảng 0,1 g bột mẫu thử vào bình tam giác dung tích 100 ml. Thêm 50 ml ethanol 80%. Tiến hành chiết siêu âm trong 30 phút. Để nguội yên 10 phút, lọc dịch chiết vào bình định mức 50 ml, bổ sung đến vạch mức bằng ethanol 80%, lắc đều, thu được dung dịch mẫu thử.

- Khảo sát bước sóng phát hiện: quét phổ UV của các dung dịch chất đối chiếu piperin, guineesin và piperonalin để xác định cực đại hấp thụ ($\lambda_{\max}$). Lựa chọn bước sóng tại vị trí cực đại hấp thụ làm bước sóng phát hiện (kết hợp với các TLTK).

- Khảo sát chương trình pha động: Tiến hành khảo sát chương trình rửa giải gradient với pha động gồm acetonitril hoặc methanol (kênh B) và nước (kênh A) theo các tỉ lệ khác nhau.

2.4.2. Khảo sát quy trình xử lý mẫu:

- Khảo sát dung môi chiết: Khảo sát các dung môi chiết là hỗn hợp nước - ethanol, nước - methanol với các tỷ lệ khác nhau để lựa chọn được dung môi chiết phù hợp nhất.

- Khảo sát phương pháp chiết: siêu âm và hồi lưu cách thủy.

- Khảo sát thời gian chiết: 15 phút, 30 phút, 45 phút, 60 phút, 90 phút, 120 phút.

- Khảo sát tỷ lệ khối lượng được liệu/thể tích dung môi chiết (g/ml): 0,1 g/10 ml; 0,1 g/25 ml; 0,1 g/50 ml; 0,1 g/75 ml; 0,1 g/100 ml.

- Khảo sát số lần chiết: 1 lần, 2 lần, 3 lần.

2.4.3. Thẩm định phương pháp:

Sau khi khảo sát quá trình xử lý mẫu và các điều kiện sắc ký, tiến hành thẩm định phương pháp định lượng piperin, guineesin và pipernonalin trong quả tiêu lột theo hướng dẫn của ICH và có tham chiếu theo AOAC (trích dẫn). Các chỉ tiêu thẩm định bao gồm: tính thích hợp của hệ thống, độ đặc hiệu, giới hạn phát hiện và giới hạn định lượng, đường chuẩn, độ lặp lại trong ngày và khác ngày, hiệu suất thu hồi.

2.4.4. Công thức tính:

Hàm lượng piperin, guineesin và pipernonalin trong mẫu thử được tính theo công thức:

$$X(\%) = \frac{C \times V \times 100 \times K}{m \times 10^6 \times (100 - B)} \times 100$$

Trong đó: X(%): Hàm lượng của chất định phân tương ứng; C: Nồng độ của chất định phân có trong dung dịch mẫu thử tính từ phương trình đường chuẩn (μg/ml); m: Khối lượng mẫu thử (g); B: Độ ẩm của mẫu thử (%); K: hệ số pha loãng. Chú thích V

3. Kết quả nghiên cứu

3.1. Lựa chọn điều kiện phân tích sắc ký

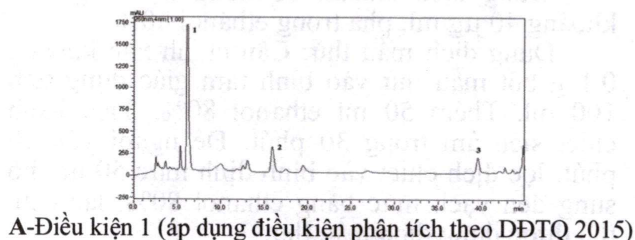
3.1.1. Khảo sát bước sóng phát hiện:

Phổ UV của piperin có cực đại hấp thụ tại 254

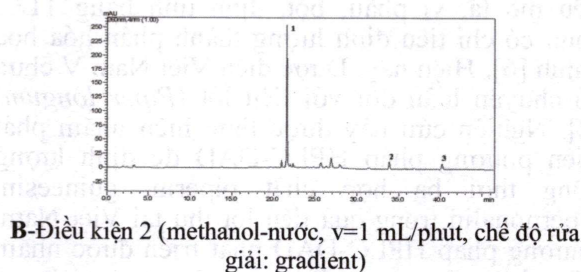
nm, 309 nm và 343 nm; trong khi đó guineesin và pipernonalin có phổ UV tương đối giống nhau, cùng có cực đại hấp thụ ở các bước sóng 260 nm, 305 nm. Kết hợp với một số tài liệu tham khảo, chúng tôi lựa chọn bước sóng 343 nm để định lượng piperin và 260 nm để định lượng guineesin, pipernonalin trong tiêu lột.

3.1.2. Khảo sát thành phần pha động:

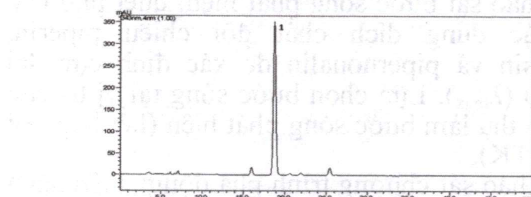
Tiến hành áp dụng điều kiện phân tích HPLC-DAD theo các chuyên luận dược liệu tiêu lột - ĐĐTQ 2015 [5]. Điều kiện sắc ký gồm: Cột C18 (250 × 4,6 mm, 5μm); Tốc độ dòng: 1 mL/phút; Thể tích tiêm: 10 μl; Pha động: methanol - H₂O (77/23, v/v). Kết quả thu được (Hình 2A) cho thấy, tín hiệu pic của piperin tách tương đối tốt, tuy nhiên thời gian lưu của piperin ngắn (t_R khoảng 6 phút), dễ bị chồng pic với các thành phần khác có trong mẫu; Ngoài ra, tín hiệu pic của guineesin tách chưa tốt, có sự xen phủ với thành phần khác có trong nền mẫu tiêu lột. Điều này được thể hiện qua các giá trị độ phân giải (Rs) của pic guineesin đạt 1,158 < 1,5 (Bảng 1), chứng tỏ chưa đáp ứng yêu cầu pic trong phân tích định lượng. Để lựa chọn được điều kiện phân tích tối ưu hơn, tiến hành khảo sát một số điều kiện rửa giải khác. Kết quả thu được như Bảng 1 và Hình 2.



A-Điều kiện 1 (áp dụng điều kiện phân tích theo ĐĐTQ 2015)



B-Điều kiện 2 (methanol-nước, v=1 mL/phút, chế độ rửa giải: gradient)



C-Điều kiện 3 (ACN-Nước, v= 0,6 mL/phút, 0-15 min (50% ACN), 15-20 min (50-70% ACN), 20-30 min (70% ACN), 30-35 min (70-90% ACN), 35-45 min (90% ACN), 45-60 min (90-100% ACN))

Hình 2. Sắc ký đồ HPLC khảo sát một số điều kiện phân tích khác (1-piperin; 2- pipernonalin; 3- guineesin)

Bảng 1. Các thông số sắc ký của 3 chất định phân ứng với các điều kiện khảo sát

Thông số	Hệ số đối xứng (As) (Yêu cầu: 0,8<As < 1,5)			Độ phân giải (Rs) (yêu cầu > 1,5)		
	piperin	guineesin	Pipernolanine	piperin	guineesin	Pipernolanine
Điều kiện 1	1,658	1,680	1,287	2,207	1,158	1,366
Điều kiện 2	1,334	1,531	1,208	2,296	1,819	1,768
Điều kiện 3	1,032	1,082	1,043	2,522	1,815	1,679

Kết quả thu được cho thấy với điều kiện 3, tín hiệu pic của 3 chất định phân đều cân đối và tách tốt trên nền mẫu thử. Vì vậy, điều kiện 3 được

lựa chọn để tiến hành các nghiên cứu tiếp theo.

3.2. Xây dựng đường chuẩn

Chuẩn bị một dãy các dung dịch hỗn hợp chứa

piperin, guineesin và pipernonalin với khoảng nồng độ của piperin từ 1,99 - 99,30 µg/ml, guineesin từ 1 - 40 µg/ml và pipernonalin từ 0,99 - 99,20 µg/ml. Kết quả xây dựng các đường chuẩn (Bảng 2) cho thấy các giá trị R^2 đều lớn hơn 0,99 và các giá trị độ lệch giữa giá trị nồng

độ chất định phân thực tế và nồng độ chất định phân tính lại từ đường chuẩn (Δ) là dưới 15%, chứng tỏ các đường chuẩn được xây dựng có độ tuyến tính cao đảm bảo để thực hiện phép phân tích định lượng piperin, guineesin và pipernonalin.

Bảng 2. Quan hệ tuyến tính giữa nồng độ và diện tích pic của các chất

TT	Piperin			Guineesin			pipernonalin		
	Nồng độ (µg/ml)	S_{pic} (mAU.s)	Δ (%)	Nồng độ (µg/ml)	S_{pic} (mAU.s)	Δ (%)	Nồng độ (µg/ml)	S_{pc} (mAU.s)	Δ (%)
1	1,99	193902	2,12	1	118617	14,84	0,99	49128	9,15
2	3,97	383594	-7,35	2	233448	4,65	1,98	97422	2,69
3	9,93	1176222	6,58	4	477666	2,55	3,97	192686	-1,20
4	19,86	2092821	-6,51	10	1256274	5,07	9,92	517225	4,18
5	39,72	4652729	2,88	20	2238702	-7,05	19,84	921804	-7,60
6	99,30	11333343	-0,25	40	4909465	1,40	39,68	2064002	3,09
							99,20	5001471	-0,23
PTHQ	$Y = 114817.X - 38951$			$Y = 121559.X - 20981$			$Y = 50593.X - 5652,3$		
R^2	0,9995			0,9977			0,9995		

PTHQ: phương trình hồi quy có dạng $Y=a.X+b$; Y là giá trị diện tích pic (mAU.s); X là nồng độ chất định phân trong dung dịch (µg/ml).

3.3. Nghiên cứu quy trình xử lý mẫu

3.3.1. Khảo sát dung môi chiết:

Do piperin, guineesin và pipernonalin tan tốt trong các dung môi như methanol (MeOH), ethanol (EtOH), vì vậy để lựa chọn được dung môi có hiệu suất chiết cao nhất, chúng tôi tiến

hành khảo sát các dung môi: methanol, ethanol và hỗn hợp của 2 dung môi này với nước ở một số tỷ lệ khác nhau. Hiệu quả chiết của từng dung môi được đánh giá thông qua hàm lượng trung bình piperin, guineesin và pipernonalin trong mẫu. Kết quả thu được như Bảng 3.

Bảng 3. Kết quả khảo sát dung môi chiết

Dung môi	Hàm lượng (%)			Dung môi	Hàm lượng (%)		
	piperin	guineesin	pipernonalin		piperin	guineesin	pipernonalin
EtOH 100%	2,56	0,100	0,46	MeOH 100%	2,56	0,106	0,44
EtOH 90%	2,51	0,096	0,43	MeOH 90%	2,66	0,103	0,46
EtOH 80%	2,72	0,105	0,46	MeOH 80%	2,74	0,107	0,48
EtOH 70%	2,71	0,105	0,46	MeOH 70%	2,48	0,096	0,42
EtOH 60%	2,65	0,104	0,45	MeOH 60%	2,38	0,085	0,41
EtOH 50%	2,69	0,102	0,46	MeOH 50%	2,34	0,053	0,39

Kết quả thu được cho thấy, khi sử dụng dung môi chiết có tỷ lệ dung môi hữu cơ cao (nồng độ 80 - 100%) thì hàm lượng 3 chất định phân xác định được cao hơn khi sử dụng dung môi hữu cơ có nồng độ 50-60%. Kết quả thu được khi sử dụng methanol 80% và ethanol 80% khác biệt không có ý nghĩa thống kê. Từ đó, nhóm nghiên cứu lựa chọn dung môi chiết là ethanol 80%.

3.3.2. Khảo sát phương pháp chiết mẫu và thời gian chiết:

Với mục tiêu lựa chọn được phương pháp chiết và thời gian chiết cho hiệu suất tối ưu, phù hợp có thể áp dụng rộng rãi, tiến hành khảo sát như sau:

Đối với phương pháp siêu âm: Chuẩn bị 6 bình tam giác dung tích 100 ml, cân và chuyển vào mỗi bình chính xác 0,1 g bột mẫu thử. Thêm 50 ml ethanol 80%. Tiến hành chiết siêu âm trong 6 khoảng thời gian khác nhau (15 - 120 phút, theo Bảng 4). Sau đó để yên 10 phút, lọc qua giấy lọc thô vào bình định mức 50 ml, bổ

sung đến vạch mức bằng ethanol 80%, lắc đều, thu được dung dịch thử.

Đối với phương pháp chiết hồi lưu: Chuẩn bị 6 bình cầu dung tích 100 ml, cân và chuyển vào mỗi bình chính xác 0,1 g bột mẫu thử. Thêm 50 ml ethanol 80%. Tiến hành chiết hồi lưu trong 6 khoảng thời gian khác nhau (15 - 120 phút, theo Bảng 4). Sau đó để yên 10 phút, lọc qua giấy lọc thô vào bình định mức 50 ml, bổ sung đến vạch mức bằng ethanol 80%, lắc đều, thu được dung dịch thử.

Tiến hành phân tích các dung dịch thử bằng HPLC-DAD theo điều kiện đã khảo sát, xác định hàm lượng của piperin, guineesin và pipernonalin. Kết quả thu được như Bảng 4.

Nhận xét thấy hàm lượng của cả 3 chất định phân thu được bằng phương pháp chiết siêu âm lớn hơn rõ rệt so với phương pháp chiết hồi lưu. Khi tăng thời gian chiết siêu âm thì hàm lượng các chất trong dung dịch mẫu thử xác định được cũng tăng dần. Khi thời gian chiết tăng từ 30 - 45

phút thì hàm lượng piperin thay đổi đáng kể (>10%). Tuy nhiên, hàm lượng 3 chất định phân thay đổi không đáng kể khi tiến hành tăng thời

gian chiết từ 45 phút lên 60 - 120 phút. Từ kết quả thu được, nhóm nghiên cứu lựa chọn thời gian chiết siêu âm là 45 phút.

Bảng 4. Kết quả khảo sát phương pháp chiết mẫu và thời gian chiết (n = 3)

Phương pháp chiết - thời gian chiết	Hàm lượng trung bình (%)			Phương pháp chiết - thời gian chiết	Hàm lượng trung bình (%)		
	piperin	guineesin	pipenonalin		piperin	guineesin	pipenonalin
SA-15	2,19	0,11	0,42	HL-15	1,69	0,07	0,29
SA-30	2,39	0,11	0,46	HL-30	1,91	0,07	0,33
SA-45	2,62	0,11	0,47	HL-45	2,08	0,08	0,35
SA-60	2,65	0,11	0,47	HL-60	2,70	0,11	0,48
SA-90	2,65	0,12	0,48	HL-90	2,72	0,11	0,48
SA-120	2,73	0,12	0,49	HL-120	2,74	0,11	0,48

3.3.3. Khảo sát tỷ lệ khối lượng dược liệu/thể tích dung môi chiết và số lần chiết:

Tiến hành khảo sát tỷ lệ khối lượng dược liệu/thể tích dung môi chiết và số lần chiết theo các điều kiện trình bày trong mục 2.4.2. Kết quả thu được cho thấy ứng với tỷ lệ khối lượng dược liệu/thể tích dung môi chiết là 0,1 gam mẫu thử/50 ml dung môi chiết và số lần chiết là 1 lần, hàm lượng các chất phân tích xác định được là ổn định và đạt mức 2,64%, 0,11% và 0,48% đối với lần lượt các chất piperin, guineesin và pipernonalin.

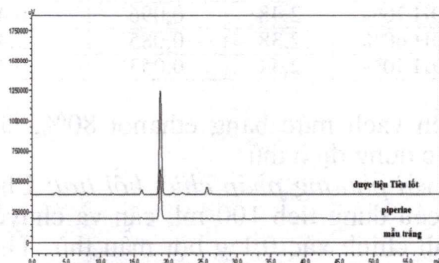
Từ các kết quả khảo sát điều kiện xử lý mẫu, đề xuất được **quy trình xử lý mẫu quả khô tiêu** như sau: Cân chính xác 0,1 g bột mẫu thử (đã xác định độ ẩm) vào bình tam giác dung tích 100 ml. Thêm 50 ml ethanol 80%. Tiến hành chiết siêu âm trong 30 phút. Để nguội yên 10 phút, lọc dịch chiết vào bình định mức 50 ml, bổ sung đến

vạch mức bằng ethanol 80%, lắc đều, thu được dung dịch mẫu thử.

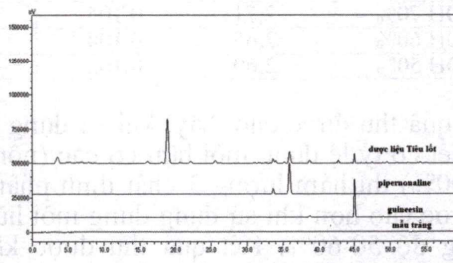
3.4. *Thẩm định phương pháp phân tích*

3.4.1. Độ đặc hiệu của phương pháp:

Tiến hành phân tích dung dịch chuẩn hỗn hợp, dung dịch mẫu thử dược liệu tiêu lốt, dung dịch mẫu trắng ethanol 80% với các điều kiện sắc ký và xử lý mẫu đã tối ưu hóa được. Kết quả thu được như Hình 3 và Bảng 5. Nhận xét thấy tín hiệu pic của piperin, guineesin và pipernonalin được tách hoàn toàn khỏi nhau trên sắc ký đồ dung dịch chuẩn hỗn hợp và dung dịch mẫu thử dược liệu tiêu lốt. Bên cạnh đó, hệ số chồng phổ (*Match ratio*) của piperin, guineesin và pipernonalin của mẫu thử so với mẫu chuẩn đều lớn hơn 0,999. Chứng tỏ phương pháp xây dựng đáp ứng yêu cầu về độ đặc hiệu để định lượng đồng thời piperin, guineesin và pipernonalin trong dược liệu tiêu lốt.



A- Quan sát tại bước sóng 343 nm



B- Quan sát tại bước sóng 260 nm

Hình 3. Sắc ký đồ đánh giá tính chọn lọc của phương pháp

Bảng 5. Thông số pic của các chất định phân

Thông số	Piperin	guineesin	pipernonalin
Thời gian lưu (t_R , phút)	18,876	45,04	35,94
R_s	2,605	2,815	2,677
T_f	1,033	1,09	1,038
N	15449	495918	99483
Hệ số chồng phổ UV	0,9995	0,9990	0,9992

3.4.2. Tính thích hợp của hệ thống:

Tiến hành sắc ký 6 lần hỗn hợp dung dịch chuẩn piperin, guineesin và pipernonalin có nồng độ lần lượt là 19,86 $\mu\text{g/ml}$; 20,0 $\mu\text{g/ml}$ và 19,84 $\mu\text{g/ml}$ với điều kiện đã khảo sát. Tiến hành ghi lại thời gian lưu và diện tích pic tương ứng. Kết quả thu được (Bảng 6) cho thấy các giá trị độ lệch chuẩn tương đối của diện tích pic và thời gian lưu của piperin, guineesin và pipernonalin đều nhỏ hơn 2%, cho thấy các điều kiện sắc ký đã lựa chọn và hệ thống HPLC sử dụng là phù hợp và đảm bảo độ ổn định của phép phân tích định lượng piperin, guineesin và pipernonalin.

3.4.3. Độ lặp lại trong ngày và khác ngày:

Phân tích lặp lại 6 lần cùng một mẫu thử thu được kết quả đánh giá độ lặp lại trong ngày của phương pháp. Phân tích lặp lại 6 lần mẫu thử đó

vào một ngày khác để thu kết quả của 12 lần phân tích dùng cho đánh giá độ lặp lại khác ngày. Kết quả được trình bày trong Bảng 6.

Bảng 6. Kết quả thẩm định phương pháp HPLC-DAD phân tích

TT	Đánh giá	Kết quả		
		piperin	guineesin	pipernonalin
1	Tính thích hợp của hệ thống	RSD (t_R) = 0,07% RSD (S) = 1,98%	RSD (t_R) = 0,04% RSD (S) = 1,93%	RSD (t_R) = 0,05% RSD (S) = 1,90%
2	Độ chính xác trong ngày	Hàm lượng trung bình = 2,62% RSD (hàm lượng %) = 0,59 %	Hàm lượng trung bình = 0,11% RSD (hàm lượng %) = 1,85 %	Hàm lượng trung bình = 0,48% RSD (hàm lượng %) = 1,80%
	Độ chính xác khác ngày	Hàm lượng trung bình = 2,64% RSD (hàm lượng %) = 0,79%	Hàm lượng trung bình = 0,11% RSD (hàm lượng %) = 2,27%	Hàm lượng trung bình = 0,49% RSD (hàm lượng %) = 1,81%
3	Hiệu suất thu hồi	96,21 - 103,33%	97,19 - 105,42%	95,10 - 104,31%
4	LOD ($\mu\text{g/ml}$)	0,05	0,01	0,09
5	LOQ ($\mu\text{g/ml}$)	0,17	0,03	0,32

3.4.4. Giới hạn phát hiện (LOD) và giới hạn định lượng (LOQ):

Phân tích mẫu thử đã được xác định nồng độ piperin, guineesin và pipernonalin, sau đó pha loãng dần đến khi trên sắc ký đồ của dung dịch thử, tại thời gian lưu của piperin, guineesin và pipernonalin, xác định được tỷ lệ S/N = 3 - 4 và S/N = 10. Từ đó tìm được LOD và LOQ. Mỗi mẫu làm lặp lại 3 lần và lấy kết quả trung bình. Kết quả thu được như Bảng 6.

3.4.5. Độ đúng:

Độ đúng của phương pháp được đánh giá thông qua hiệu suất thu hồi và được xác định bằng phương pháp thêm chuẩn tại một số mức thêm chuẩn khác nhau 20%, 60% và 100% so với hàm lượng chất phân tích có trong mẫu thử. Tiến hành định lượng mẫu thêm chuẩn và mẫu không thêm chuẩn bằng HPLC. Kết quả thu được (Bảng 6) cho thấy các giá trị hiệu suất thu hồi đạt trong khoảng từ 95,10 - 105,42%, chứng tỏ phương pháp xây dựng có độ đúng cao, phù hợp dùng cho phân tích định lượng piperin, guineesin và pipernonalin trong quả tiêu lốt.

3.5. Phân tích hàm lượng piperin, guineesin và pipernonalin trên các mẫu quả tiêu lốt

Áp dụng phương pháp đã xây dựng, tiến hành đánh giá hàm lượng piperin, guineesin và pipernonalin trong một số mẫu tiêu lốt thu thập được. Kết quả thu được trình bày trong Bảng 7.

Bảng 7. Hàm lượng piperin, guineesin và pipernonalin trong một số mẫu quả tiêu lốt

Kí hiệu mẫu	Hàm lượng (%) (n=3)		
	piperin	Guineesin	pipernonalin
M1	2,64 ± 0,01	0,11 ± 0,00	0,48 ± 0,01
M2	3,31 ± 0,03	0,12 ± 0,00	0,57 ± 0,01
M3	3,94 ± 0,02	0,19 ± 0,01	0,73 ± 0,02

Tiêu lốt (*Piper longum*) được quy định chất lượng trong một số Dược điển như: Dược điển Trung Quốc, Dược điển Ai Cập [5-6]. Dược điển

Việt Nam V mới có quy định cho chuyên luận dược liệu Hồ tiêu (*Piper nigrum*), chưa quy định cho loài tiêu lốt (*Piper longum*). Dược điển Trung Quốc (2015) có quy định chuyên luận cho dược liệu tiêu lốt (*Piper longum*), trong đó chỉ tiêu định lượng quy định hàm lượng piperin không thấp hơn 2,5%. Kết quả phân tích 3 mẫu quả tiêu lốt (*Piper longum*) thu ở Việt Nam cho thấy các mẫu này đều có hàm lượng piperin đạt so với mức quy định trong Dược điển Trung Quốc 2015. Trong 3 mẫu tiêu lốt khảo sát, hàm lượng piperin đạt từ 2,64 - 3,94%, hàm lượng guineesin từ 0,11 - 0,19%, còn hàm lượng pipernonalin đạt trong khoảng từ 0,48 - 0,73%. Với các kết quả thu được cho thấy trong các mẫu tiêu lốt thu ở Việt Nam, piperin và pipernonalin là hai thành phần chính. Kết quả nghiên cứu này có ý nghĩa trong công tác tiêu chuẩn hóa và đánh giá chất lượng dược liệu và sản phẩm từ dược liệu tiêu lốt (*Piper longum*) thu ở Việt Nam.

4. Kết luận

Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã phát triển được một phương pháp HPLC-DAD định lượng đồng thời piperin, guineesin và pipernonalin trong quả tiêu lốt. Phương pháp xây dựng đã được thẩm định về độ đúng và độ chính xác và được sử dụng để định lượng piperin, guineesin và pipernonalin trong một số mẫu quả tiêu lốt thu hái ở Việt Nam. Kết quả cho thấy hàm lượng piperin trong các mẫu tiêu lốt khảo sát dao động từ 2,64 - 3,94%, hàm lượng guineesin dao động từ 0,11 - 0,19% còn hàm lượng pipernonalin đạt trong khoảng từ 0,48 - 0,73%. Kết quả của nghiên cứu này gợi ý cho việc tiêu chuẩn hóa chất lượng dược liệu và các chế phẩm từ tiêu lốt.

Lời cảm ơn: Nghiên cứu được hoàn thành với sự hỗ trợ kinh phí từ Nghị định thư Việt - Hàn "Nghiên cứu hoạt tính kháng ung thư và điều hòa miễn dịch của một số cây thuốc Việt Nam, NĐT.85.KR/20, Hợp đồng số 09/2020/HĐ-NĐT ký ngày 09/9/2020-Bộ KH&CN".

1. Đỗ Huy Bích, Đặng Quang Chung, Bùi Xuân Chương, Nguyễn Thượng Đông, Đỗ Trung Đàm, Phạm Văn Hiên, Vũ Ngọc Lộ, Phạm Duy Mai, Phạm Kim Mẫn, Đoàn Thị Nhu, Nguyễn Tập, Trần Toàn (2006), *Cây thuốc và Động vật làm thuốc ở Việt Nam*, Tập II, NXB Khoa học và Kỹ thuật, 956-958.
2. Bộ Y tế (2017), *Dược điển Việt Nam V*, NXB Y học, chuyên luận Hồ tiêu, 1196-1197.
3. Pradeep C. R., Kuttan G. (2002), Effect of piperin on the inhibition of lung metastasis induced B16F-10 melanoma cells in mice, *Clinical & Experimental Metastasis*, 19(8), 703-708.
4. Sunila E. S., Kuttan G. (2004), Immunomodulatory and antitumor activity of *Piper longum* Linn. and piperin, *Journal of Ethnopharmacology*, 90(2-3)339-346.
5. Pharmacopoeia of the People's Republic of China (2015), *Piperis Longui fructus*, 351; *Piperis fructus*, 349-350.
6. Ministry of Health and Family Welfare, Government of India, *The Ayurvedic Pharmacopoeia of India, Pippali (Fruit)*, Part I, Vol. IV, 105-106.
7. Khound A., Barua P. C., Saud B., Saikia I. A., Kumar S. (2017), Piperin content variation in different *Piper longum* germplasms of -East India determined through RP-HPLC method, *Journal of Applied and Natural Science*, 9(2), 960-965.
8. Liu H. L., Luo R., Chen X. Q., Ba Y. Y., Zheng L., Guo W. W., Wu X. (2015), Identification and simultaneous quantification of five alkaloids in *Piper longum* L. by HPLC-ESI-MSn and UFLC-ESI-MS/MS and their application to *Piper nigrum* L., *Food Chemistry* 177: 191-196.
9. ICH (2005), Validation of analytical procedures: Text and methodology Q2(R1), *ICH Harmonized Tripartite guidelines*, 1-13.
10. AOAC International (2013), Appendix K: Guidelines for Dietary Supplements and Botanicals, *PART I: AOAC Guidelines for Single-Laboratory Validation of Chemical Methods for Dietary Supplements and Botanicals*.

Tạp chí Dược liệu, tập 28, số 1/2023 (Trang 40 - 45)

TRIỂN KHAI MÔ HÌNH GÂY TÂM THẦN PHÂN LIỆT TRÊN CHUỘT NHẮT TRẮNG VÀ ĐÁNH GIÁ TÁC DỤNG CỦA CAO CHIẾT RAU ĐẮNG BIỂN VÀ BAN DI THỰC

Trần Nguyễn Hồng^{1,*}, Phạm Thị Nguyệt Hằng¹, Nguyễn Lê Chiến²

¹Viện Dược liệu; ²Học viện Quân Y 103

*Email: trannguyenhong91@gmail.com

(Nhận bài ngày 05 tháng 01 năm 2023)

Tóm tắt

Tâm thần phân liệt là bệnh rối loạn tâm thần suy giảm kéo dài ảnh hưởng tới 1% dân số, nguyên nhân gây bệnh và sinh lý bệnh vẫn còn nhiều điều chưa biết. Thụ thể N-methyl-D-aspartat (NMDA), thuộc hệ glutamatergic, phân bố rộng trong não bộ đóng vai trò quan trọng trong sự phát triển thần kinh, học tập và ghi nhớ, bệnh lý thoái hóa thần kinh và hình thành tế bào thần kinh, được cho là liên quan tới sự hình thành bệnh lý tâm thần phân liệt. Sử dụng ketamin ức chế thụ thể NMDA kéo dài với liều 100 mg/kg trong 10 ngày gây mô hình tâm thần phân liệt trên chuột nhắt trắng với các thay đổi hành vi cơ bản của tâm thần phân liệt như khả năng vận động, chức năng học tập và ghi nhớ. Chuột gây mô hình bằng ketamin sẽ được chia ngẫu nhiên vào các nhóm và được uống mẫu RDB (cao tiêu chuẩn rau đắng biển) (50 & 100 mg/kg, uống) hoặc BDT (cao cộn ban di thực) (250 & 500 mg/kg, uống) hoặc haloperidol (0,5 mg/kg, i.p) trong 2 tuần trước khi tiến hành các thí nghiệm tiếp theo (thử nghiệm không gian mở, thử nghiệm chữ Y và nhận diện đồ vật). Kết quả cho thấy, mô hình tâm thần phân liệt gây bằng ketamin không làm thay đổi hành vi vận động tự nhiên, nhưng làm suy giảm khả năng ghi nhớ ở chuột nhắt. Chuột gây mô hình tâm thần phân liệt điều trị bằng mẫu cao chiết BDT và RDB đều giúp cải thiện chức năng học tập và ghi nhớ. Kết quả cho thấy tiềm năng sử dụng mẫu dược liệu BDT và RDB trong điều trị giảm nhẹ một số các triệu chứng bệnh, tuy nhiên kết quả đạt được mới là bước đầu đánh giá, cần tiến hành thêm các nghiên cứu sâu hơn để làm rõ cơ chế tác dụng.

Từ khóa: Schizophrenia, Ketamin, NMDA, Học tập, Ghi nhớ, Vận động.

Summary

Deploying a Mouse Model of Schizophrenia and Evaluating the Effects of *Bacopa monnieri* (L) Wettst. and *Hypericum perforatum* L. Extracts

Schizophrenia is a chronic debilitating psychic disorder affecting as many as 1% of the world-wide population. Unfortunately, its etiology and pathophysiology are unclearly understanding. The N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptors, a family of L-glutamate receptors, play an important role in neuronal development, learning and memory, neurodegenerative diseases, and neurogenesis, largely related to development of schizophrenia disease. Ketamine is an antagonist of NMDA receptor, derived of PCP, used chronically with dose of 100 mg/kg body weight for 10 days induced schizophrenia mouse model expressing the characteristic behaviors included exploratory locomotion ability, learning and memory functions. The ketamine-induced schizophrenia mice were treated with RDB (*Bacopa monnieri* (L) Wettst. extract) (50 & 100 mg/kg, orally) or BDT (*Hypericum perforatum* L. extract) (250 & 500 mg/kg, orally) or haloperidol (0.5 mg/kg, i.p) for 2 weeks. After that, the mice were conducted the following experiments: Open-field test, modified Y-maze, and Object Recognition Test. The data showed that the ketamine-induced schizophrenia model did not influence the locomotion behavior, but impaired learning and memory in mice. The BDT and RDB extracts both improved learning and memory functions. There are the initial results indicating these extracts have potential development of schizophrenia-treatment therapies, but need more further studies to consolidate and manifest the underline mechanism of effect on schizophrenia disorder.

Keywords: Schizophrenia, Ketamine, NMDA, Learning, Memory, Locomotion.

1. Đặt vấn đề

Bệnh tâm thần phân liệt (TTPL) ảnh hưởng tới số đông dân số. Theo báo cáo của Tổ chức Y tế Thế giới (WHO), hiện nay trên thế giới có khoảng 24 triệu người mắc bệnh tâm thần phân liệt, chiếm khoảng 0,3 - 1,5% dân số thế giới. Ở

Việt Nam theo thống kê của một số tác giả, tỷ lệ mắc bệnh tâm thần phân liệt là 0,3 - 0,8% (ước tính đến năm 2010 có khoảng 400.000 bệnh nhân tâm thần phân liệt) và hàng năm tăng thêm 0,1 - 0,15% dân số [1]. Cơ chế bệnh sinh của TTPL rất phức tạp và chưa được làm sáng tỏ. Hai hệ dẫn