

Xây dựng qui trình định lượng đồng thời quercitrin, vitexin, scutellarein 7-O- β -D-GlcA methyl ester và quercetin 3-O- β -D-GlcA trong tâm sen bằng phương pháp HPLC với đầu dò PDA

Đỗ Châu Minh Vĩnh Thọ¹, Trần Hùng², Nguyễn Đức Tuấn^{2*}

¹Khoa Dược, Trường Đại học Y Dược Cần Thơ

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

*E-mail: diemnhim@yahoo.com

Summary

A reversed-phase HPLC method was developed for simultaneous determination of quercitrin, vitexin, scutellarein 7-O- β -D-GlcA methyl ester, and quercetin 3-O- β -D-GlcA in the embryos of *Nelumbo nucifera*. Column - Phenomenex Synergi RP-Polar column (250 x 4.6 mm; 4 μ m); mobile phase in gradient mode - acetonitrile and 0.1% formic acid solution; detector - UV (254 nm). This procedure was validated to meet all requirements of system suitability, selectivity, linearity range, precision and accuracy. The validated method was applied for simultaneous determination of the flavonoids in embryos of the native lotus (*Nelumbo nucifera* L.) collected from 14 provinces in Vietnam both in and out of the lotus season.

Keywords. HPLC, quercitrin, vitexin, scutellarein 7-O- β -D-GlcA methyl ester, quercetin 3-O- β -D-GlcA, *Nelumbo nucifera* embryo.

Đặt vấn đề

Cây sen (*Nelumbo nucifera* Gaertn, Nelumbonaceae) là một trong số ít các dược liệu mà tất cả các bộ phận đều là những vị thuốc quý, có giá trị sinh học cao. Nhiều nghiên cứu gần đây cho thấy dịch chiết tâm sen có hoạt tính được lý và sinh học *in vivo* như an thần [1], hạ huyết áp [2,3], chống oxy hóa [4], chống loạn nhịp tim [5], hạ đường huyết [6]. Các hoạt tính này đều được chứng minh trên các nghiên cứu *in vivo* và đều có liên quan đến sự có mặt của một số flavonoid chính có tác dụng sinh học trong tâm sen. Tại Việt Nam hiện nay, việc sử dụng tâm sen phục vụ công tác điều trị, hỗ trợ điều trị bệnh ngày càng trở nên phổ biến ở dạng cao chiết hay dịch chiết toàn phần. Tuy nhiên, chưa có công trình nào công bố việc xác định hàm lượng các flavonoid có tác dụng sinh học trong tâm Sen bằng các phương pháp phân tích hiện đại. Vì vậy nghiên cứu này được thực hiện nhằm góp phần xây dựng chỉ tiêu định tính, định lượng một số flavonoid trong tâm sen, giúp kiểm soát chất lượng nguyên liệu và chế phẩm từ nguồn nguyên liệu có giá trị sinh học này.

Nguyên liệu và phương pháp

Chất đối chiếu, trang thiết bị, hóa chất, dung môi

Chất đối chiếu: Vitexin (97,7%), scutellarein 7-O- β -D-GlcA methyl ester (98,1%), quercitrin (97,3%) và quercetin 3-O- β -D-GlcA (97,6%) do Khoa Dược, Đại học Y Dược TP. Hồ Chí Minh cung cấp.

Trang thiết bị: Hệ thống HPLC Hitachi Elite L-2000 với đầu dò DAD L-2455. Cột phân tích Kern với độ chính xác 0,01 mg. Bể siêu âm Elmasoonic S-70H. Máy cô quay HeidolphHei – VAP Value.

Hóa chất, dung môi: Acid tartaric, acid acetic băng, acid sulfuric, cloroform, amoni hydroxyd, triethylamin (TEA), acid formic và methanol đạt tiêu chuẩn phân tích. Acetonitril (ACN) và methanol (MeOH) đạt tiêu chuẩn sắc ký (Merck).

Mẫu nghiên cứu

Các mẫu tâm sen được thu hái vào mùa thu hái sen và không phải mùa thu hái sen ở 14 tỉnh, thành phố thuộc ba miền của Việt Nam. Nhóm 1 (NE-1): Đồng Tháp, Cần Thơ, Hậu Giang, Kiên Giang, An Giang, Sóc Trăng; Nhóm 2 (NE-2): Kon Tum, Đà Nẵng, Nghệ An, Huế; Nhóm 3 (NE-3): Hà Nội,

Hung Yên, Thái Nguyên, Bắc Ninh), được phơi khô, xay thành bột và sau đó được xác định độ ẩm của bột làm sen bằng phương pháp cân hồng ngoại. Tất cả các mẫu đã được định danh và lưu tại Khoa Dược, Trường Đại học Y Dược Cần Thơ.

Phương pháp nghiên cứu

Dựa vào cấu trúc hóa học của vitexin, scutellarein 7-O- β -D-GlcA methyl ester, quercitrin và quercetin 3-O- β -D-GlcA là những chất phân cực từ trung bình đến mạnh và qua tham khảo một số tài liệu [3,8], nên kỹ thuật sắc ký pha đảo đã được áp dụng với hệ dung môi phân cực ban đầu là methanol và nước. Trong quá trình thực nghiệm, các yếu tố ảnh hưởng đến hiệu quả tách và độ chọn lọc của phương pháp đã được khảo sát như bản chất pha tĩnh, dung môi, tỷ lệ dung môi và pH pha động, chương trình rửa giải, tốc độ dòng và bước sóng phát hiện. Qua các khảo sát thực nghiệm sẽ chọn được điều kiện sắc ký thích hợp sao cho pic các chất phân tích tinh khiết (theo phổ UV-Vis), hệ số bất đối nằm trong khoảng 0,8 – 1,5 và tách hoàn toàn (độ phân giải $R_s \geq 1,5$). Sau khi tìm được điều kiện sắc ký thích hợp, sẽ tiến hành thẩm định phương pháp theo hướng dẫn của ICH [7] bao gồm khảo sát tính phù hợp của hệ thống, tính chọn lọc, khoảng tuyến tính, độ chính xác, độ đúng, giới hạn phát hiện (LOD) và giới hạn định lượng (LOQ). Quy trình sau khi được thẩm định sẽ được ứng dụng để định lượng đồng thời các flavonoid trên trong một số mẫu nguyên liệu làm sen.

Chuẩn bị mẫu

Dung dịch đối chiếu: Chuẩn bị các dung dịch đối chiếu gốc có nồng độ của quercitrin, vitexin, scutellarein 7-O- β -D-GlcA methyl ester và quercetin 3-O- β -D-GlcA là 1000 ppm. Từ các dung dịch gốc này, pha loãng với methanol để thu được hỗn hợp chuẩn có nồng độ phù hợp cho từng yêu cầu phân tích.

Dung dịch mẫu thử: Cân chính xác 0,5000 g bột làm sen, làm ẩm bằng dung dịch H_2SO_4 2%. Chiết với 30 ml ethyl acetat bằng siêu âm 15 phút (4000 vòng/phút), lặp lại quy trình này 3 lần. Lọc lấy dịch chiết, cô tới gần bằng máy cô quay chân không, nhiệt độ 40°C, hòa cần trong 10 ml methanol, lọc qua màng lọc 0,45 μm .

Kết quả và bàn luận

Khảo sát điều kiện sắc ký

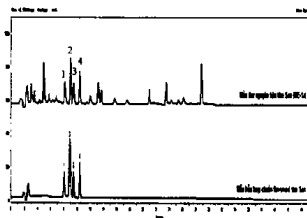
Các kết quả khảo sát ban đầu trên các cột sắc ký Phenomenex C18, C8 (150-250x 4,6 mm; 4-5 μm) dòng Lunar, Gemini, Synergi với hệ

dung môi ACN- H_2O hay MeOH- H_2O có hay không có thêm chất điều chỉnh pH là acid formic hay acetic, cho thấy cột Phenomenex Synergi RP-Polar (250 x 4,6 mm; 4 μm) có khả năng tách 5 flavonoid với hình dạng pic tương đối cân đối, sự hiện diện của acid formic 0,1% trong hệ pha động ACN- H_2O có tác dụng cải thiện hệ số đối xứng của pic. Tiếp theo, chương trình rửa giải đẳng dòng và gradient đã được khảo sát chi tiết để các chất phân tích trong mẫu thử tách hoàn toàn với thời gian rửa giải thích hợp. Cuối cùng, chương trình rửa giải gradient đã được lựa chọn với tỷ lệ dung môi và tốc độ dòng thay đổi theo thời gian sắc ký như sau.

Bảng 1: Chương trình rửa giải gradient

Thời gian (phút)	ACN	Dung dịch acid formic 0,1%	Tốc độ dòng (ml/phút)
5	5	95	1,0
6	15	85	1,0
15	15	85	1,0
16	25	75	1,2
30	25	75	1,2
31	5	95	1,0
45	5	95	1,0

Bước sóng 254 nm được lựa chọn để phát hiện các chất phân tích vì đây là bước sóng hấp thụ đặc trưng của các flavonoid và phù hợp với kết quả thực nghiệm cho tín hiệu của của các chất phân tích cao nhất ở bước sóng này. Hình 1 minh họa sắc ký đồ mẫu thử và hỗn hợp chuẩn.



Hình 1: Sắc ký đồ mẫu thử nguyên liệu làm sen và hỗn hợp chuẩn. Điều kiện sắc ký: cột Phenomenex RP-Polar (250 x 4,6 mm; 4 μm), thể tích tiêm mẫu 20 μl , bước sóng phát hiện 254 nm, pha động: ACN – dung dịch acid formic 0,1%; chương trình rửa giải gradient. Thứ tự các pic: 1: quercitrin, 2: vitexin, 3: scutellarein 7-O- β -D-glcA methyl ester; 4: quercetin 3-O- β -D-glcA).

● Nghiên cứu - Kỹ thuật

Thẩm định qui trình

Khảo sát tính phù hợp của hệ thống

Kết quả khảo sát tính phù hợp của hệ thống được trình bày trong bảng 2. Hệ số đối xứng

Bảng 2: Kết quả khảo sát tính phù hợp của hệ thống trên hỗn hợp chuẩn và mẫu thử ($n = 6$)

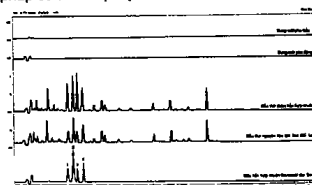
Mẫu	Chất phân tích		t_R (phút)	S ($\mu AU \times giây$)	R_s	A_s
Hỗn hợp chuẩn	Quercitrin	TB	8,0	645547	-	1,2
		RSD%	0,21	1,68		1,98
	Vitexin	TB	8,9	1134236	2,3	1,2
		RSD%	0,62	1,26	1,15	0,89
	Scutellarein 7-O- β -D-glcA methyl ester	TB	9,7	589729	1,8	1,2
		RSD%	0,54	1,45	1,52	1,45
	Quercetin 3-O- β -D-glcA	TB	10,6	813652	2,4	1,1
		RSD%	0,87	1,83	1,89	1,78
Mẫu thử	Quercitrin	TB	8,0	756987	3,9	1,2
		RSD%	1,05	1,56	1,49	1,68
	Vitexin	TB	8,9	1297654	2,3	1,2
		RSD%	1,13	1,49	1,87	0,89
	Scutellarein 7-O- β -D-glcA methyl ester	TB	9,7	657265	1,9	1,2
		RSD%	0,48	1,35	1,42	1,45
	Quercetin 3-O- β -D-glcA	TB	10,6	864351	2,4	1,1
		RSD%	1,12	1,98	1,89	1,18

t_R : thời gian lưu; S : diện tích pic; R_s : độ phân giải; A_s : hệ số đối xứng; TB: trung bình

Tính chọn lọc

Kết quả khảo sát tính chọn lọc cho thấy mẫu thử có bốn pic flavonoid có thời gian lưu tương đương với thời gian lưu của quercitrin, vitexin, scutellarein 7-O- β -D-GlcA methyl ester, quercetin 3-O- β -D-GlcA trong hỗn hợp chuẩn. Dung môi pha mẫu là MeOH và mẫu pha động không xuất hiện các pic có thời gian lưu tương đương với thời gian lưu của các pic trong hỗn hợp chuẩn. Sắc ký đồ mẫu thử thêm hỗn hợp chuẩn có sự tăng lên rõ rệt về chiều cao và diện tích pic của các chất. Phổ UV tại thời gian lưu của bốn pic trong mẫu thử giống với bốn pic trong hỗn hợp chuẩn. Sử dụng chức năng kiểm tra độ tinh khiết của pic đều cho kết quả các pic trong mẫu thử

đều có độ tinh khiết trên 99%. Do đó, phương pháp có tính chọn lọc.



Hình 2: Sắc ký đồ dung môi pha mẫu, pha động, mẫu thử thêm hỗn hợp chuẩn, mẫu thử, hỗn hợp chuẩn. Điều kiện sắc ký như hình 1.

Khoảng tuyến tính, LOD, LOQ, độ chính xác và độ đúng

Bảng 3: Kết quả khảo sát khoảng tuyến tính, độ chính xác, độ đúng, LOD và LOQ

	Quercitrin	Vitexin	scutellarein 7-O- β -D-GlcA methyl ester	Quercetin 3-O- β -D-GlcA
Phương trình hồi qui	$\hat{Y} = 40778x$	$\hat{Y} = 35873x$	$\hat{Y} = 28864x$	$\hat{Y} = 40057x$
Khoảng tuyến tính (ppm)	24,5-800	6,25-800	20-800	12,5-800
R^2	0,9996	0,9998	0,9997	0,9996
LOD (ppm)	12,50	1,63	6,12	3,12
LOQ (ppm)	41,63	5,43	20,38	10,39
Độ chính xác (RSD, $n = 18$)	2,75%	3,05%	2,37%	1,56%
Độ đúng (tỷ lệ hồi phục, $n = 9$)	97,8% - 102,4% RSD = 3,21%	95,4% - 100,5% RSD = 2,70%	98,3% - 101,5% RSD = 2,91%	99,3% - 104,7% RSD = 3,10%

Kết quả thẩm định cho thấy qui trình phân tích có khoảng tuyến tính rộng với giá trị bình phương của hệ số tương quan cao ($R^2 > 0,9995$), đồ đúng thể hiện qua tỷ lệ hồi phục nằm trong khoảng cho phép 90 - 107%^[8] và độ chính xác thể hiện qua giá trị

RSD < 7,30%^[8] ứng với nồng độ các chất phân tích từ 40-250 ppm.

Áp dụng qui trình định lượng đồng thời quercitrin, vitexin, scutellarein 7-O- β -D-GlcA methyl ester, quercetin 3-O- β -D-GlcA trong một số mẫu nguyên liệu tâm sen

Bảng 4: Kết quả xác định hàm lượng quercitrin, vitexin, scutellarein 7-O- β -D-GlcA methyl ester, quercetin 3-O- β -D-GlcA (mg/100mg) có trong một số mẫu nguyên liệu tâm sen (n = 3)

Flavonoid	Mẫu tâm sen loại <i>N. nucifera</i> (RSD%)					
	NE-1 ^a	NE-1 ^b	NE-2 ^a	NE-2 ^b	NE-3 ^a	NE-3 ^b
Quercitrin	0,19 (1,35)	0,16 (1,02)	0,15 (1,24)	0,09 (1,09)	0,24 (1,09)	0,17 (1,25)
Vitexin	0,36 (1,38)	0,24 (0,69)	0,39 (1,57)	0,28 (1,14)	0,30 (1,26)	0,21 (1,08)
Scutellarein 7-O- β -D-GlcA methyl ester	0,17 (1,07)	0,14 (1,18)	0,13 (1,39)	0,09 (1,45)	0,15 (1,21)	0,13 (1,53)
Quercetin 3-O- β -D-GlcA	0,21 (1,34)	0,17 (1,08)	0,17 (1,23)	0,09 (1,19)	0,24 (1,09)	0,10 (1,52)

^a mùa thu hái sen (tháng 7-9 hàng năm); ^b không phải mùa thu hái sen

Nhận xét: Hàm lượng quercitrin, vitexin, scutellarein 7-O- β -D-GlcA methyl ester và quercetin 3-O- β -D-GlcA có trong mẫu nguyên liệu tâm sen được thu hái theo mùa cao hơn so với mẫu được thu hái không theo mùa. Theo đó, vào mùa thu hái sen, hàm lượng quercitrin (0,19%) và scutellarein 7-O- β -D-GlcA methyl ester (0,17%) đạt cao nhất trong tâm sen vùng Nam Bộ; thành phần vitexin có hàm lượng cao nhất trong tâm sen và đạt cao nhất ở vùng Nam Trung Bộ (0,39%); hàm lượng quercetin 3-O- β -D-GlcA (0,24%) đạt cao nhất ở vùng Bắc Bộ. Các kết quả ban đầu này sẽ là những gợi ý trong việc lựa chọn nguồn nguyên liệu tâm sen có hàm lượng cao các flavonoid có tác dụng sinh học.

Kết luận

Qui trình HPLC-PDA định lượng đồng thời quercitrin, vitexin, scutellarein 7-O- β -D-GlcA methyl ester và quercetin 3-O- β -D-GlcA có trong nguyên liệu tâm sen đã được xây dựng thành công. Phương pháp có tính chọn lọc, độ nhạy cao, cho kết quả đúng và chính xác, có thể được áp dụng để xác định hàm lượng các flavonoid có tác dụng sinh học trên trong nguồn nguyên liệu này, giúp nâng cao công tác kiểm tra chất lượng nguyên liệu tâm sen.

Tài liệu tham khảo

1. Yumi Sugimoto, Sachiko Furutani, *et al.* (2008), "Effects of extracts and neferine from the embryo of *Nelumbo nucifera* seeds on the central nervous system", *Phytomedicine*, 15, pp. 1117-1124.
2. Đỗ Tất Lợi (2005), *Những cây thuốc và vị thuốc Việt Nam*, Nhà xuất bản Y học, Hà Nội, tr. 783-786.
3. Wassel G., A. Saeed (1996), "Flavonoids of *Nelumbo nucifera* Gaertn and biological evaluation", *Egyptian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 37(6), pp. 585-596.
4. Wyhile A., Rai S., *et al.* (2006), "Antioxidant activity of *Nelumbo nucifera* seeds", *J. Ethnopharmacol.*, 104(3), pp. 322-327.
5. Yuan L., Liu B. (2010), "HPLC determination of hyperin and isoquercitrin in *Nelumbo nucifera* Gaertn. of different sources", *Yaowu Fenxi Zazhi*, 30(1), pp. 41-44.
6. Wu Hao, Liu B. (2008), "Quantitative determination of four components in different samples of *Nelumbo nucifera* by HPLC", *Journal of Beijing University of Traditional Chinese Medicine*, 33(14), pp. 1713-1719.
7. ICH Harmonised tripartite guideline (2005), *Validation of analytical procedure: text and methodology*, pp. 1-13.
8. Ludwig Huber (2007), *Validation and qualification in analytical laboratories, second edition*, pp. 144, 146.

(Ngày nhận bài: 12/09/2016 - Ngày phản biện: 14/10/2016 - Ngày duyệt đăng: 01/11/2016)