

4. **Phạm Trung Việt, Nguyễn Thị Ngọc Thảo, Hoàng Bá Dũng.** Tình hình sử dụng kháng sinh theo kinh nghiệm đối với các trường hợp nhiễm trùng cổ sâu tại khoa tai mũi họng bệnh viện chợ rẫy từ tháng 01/2019 đến tháng 01/2020. 2020,
5. **Fazili T, Riddell S, Kiska D, et al.** Streptococcus anginosus Group Bacterial Infections. Am J Med Sci. Sep 2017;354(3):257-261. doi:10.1016/j.amjms.2017.05.011
6. **Haenni M, Lupu A, Madec JY.** Antimicrobial Resistance in Streptococcus spp. Microbiol Spectr. Mar 2018;6(2)doi:10.1128/microbiolspec.ARBA-0008-2017
7. **Al Majid F, Aldrees A, Barry M, Binkhamis K, Allam A, Almohaya A.** Streptococcus anginosus group infections: Management and outcome at a tertiary care hospital. Journal of Infection and Public Health. 2020/11/01/ 2020;13(11):1749-1754. doi:https://doi.org/10.1016/j.jiph.2020.07.017

XÂY DỰNG QUY TRÌNH CHIẾT CAO ĐỊNH CHUẨN KIỂM SOÁT HÀM LƯỢNG NUCIFERIN TỪ LÁ SEN (NELUMBO NUCIFERA GAERTN) THU HÁI TẠI ĐỒNG THÁP

Đặng Quỳnh Trân¹, Dương Thị Bé Nhi¹, Trà Thị Kim Thiện¹, Nguyễn Thanh Sĩ¹, Huỳnh Huỳnh Anh Thi¹, Phạm Đoàn Vi², Đỗ Châu Minh Vĩnh Thọ¹

TÓM TẮT

Đặt vấn đề: Sen là một trong số ít các dược thảo mà tất cả các bộ phận đều được sử dụng và đều là những vị thuốc quý, có giá trị sinh học cao. Sen có ở khắp mọi miền đất nước nhưng nổi tiếng nhất là ở Đồng Tháp Mười, nơi được xem là xứ sở Sen. Các nghiên cứu dược lý đã chứng minh thành phần nuciferin trong dịch chiết lá Sen có nhiều hoạt tính sinh học in vivo như: an thần, giảm cholesterol trong máu, ức chế sự phát triển của tế bào ung thư, chống oxy hóa. Hiện nay, có rất nhiều chế phẩm bào chế từ nguồn nguyên liệu lá Sen, tuy nhiên việc kiểm soát thành phần nuciferin liên quan tác dụng sinh học hạ cholesterol trong các chế phẩm này hầu như chưa được thực hiện, dẫn đến không kiểm soát được chất lượng, hiệu quả và tính an toàn của sản phẩm. **Mục tiêu:** Xây dựng quy trình chiết cao định chuẩn có kiểm soát hàm lượng nuciferin từ lá Sen hồng thu hái tại Đồng Tháp. **Đối tượng và phương pháp nghiên cứu:** lá Sen thu hái tại Đồng Tháp đạt các chỉ tiêu kiểm nghiệm dược liệu về độ ẩm, định tính, định lượng theo Dược điển Việt Nam V. Dựa vào tính chất lý hóa của nuciferin có trong lá Sen và tham khảo các chuyên luận dược điển, một số công trình đã công bố thì phương pháp ngâm lạnh được lựa chọn để khảo sát điều kiện chiết xuất (dung môi chiết, thời gian, số lần, lượng dung môi cần dùng để chiết kiệt nuciferin trong lá Sen) và khảo sát quy trình loại tạp. Cao định chuẩn lá Sen có kiểm soát hàm lượng nuciferin được xác định bằng phương pháp sắc ký lỏng ghép với đầu dò dây diod quang (HPLC/PDA). **Kết quả:** Các thông

số chiết thích hợp thu được, bao gồm: dung môi chiết là cồn 70 độ, qua ba lần chiết với tỷ lệ dược liệu: dung môi (1:10). Từ 5 kg lá sen khô đạt tiêu chuẩn ĐVN V thu được 80,5g cao định chuẩn lá Sen chứa 10% nuciferin. **Kết luận:** Nghiên cứu này đã xây dựng thành công quy trình chiết cao định chuẩn có kiểm soát hàm lượng nuciferin từ lá Sen hồng thu hái tại Đồng Tháp từ quy mô 5 kg lá sen khô. Quy trình đề xuất này có tiềm năng triển khai trên quy mô pilot để phát triển các dạng sản phẩm bào chế có tính an toàn và hiệu quả hơn từ nguyên liệu lá Sen hồng Đồng Tháp.

Từ khóa: Nuciferin, cao định chuẩn, lá sen.

SUMMARY

DEVELOPMENT OF A STANDARDIZED EXTRACTION PROCEDURE TO CONTROL NUCIFERINE CONTENT FROM LEAVES OF LOTUS (NELUMBO NUCIFERA GAERTN.) COLLECTED IN DONG THAP PROVINCE

Background: Lotus is one of the few herbs in which all parts are used and are precious medicinal herbs with high biological values that can find in all provinces of the country, and the most famous is in Dong Thap Muoi, considering the land of Sen. The pharmacological studies have proved that the nuciferine component in Lotus leaf extract has many biological activities in vivo such as insomnia, antihyperlipidemic, inhibiting the growth of cancer cells, and antioxidant effects. Currently, there are many preparations made from the raw materials of Lotus leaves. However, the control of nuciferine components related to anti-hyperlipidemia biological effects in these preparations has not been done, significantly impacting product safety and effectiveness. **Objectives:** Develop a standardized extraction procedure to control nuciferine content from Lotus leaves collected in Dong Thap province. **Materials and methods:** Lotus leaf collected in Dong Thap province met the criteria of testing for medicinal herbs regarding moisture, quality, and

¹Khoa Dược, Trường Đại Học Y Dược Cần Thơ

²Khoa Dược, Trường Đại học Tây Đô

Chịu trách nhiệm chính: Đỗ Châu Minh Vĩnh Thọ

Email: dcmvtho@ctump.edu.vn

Ngày nhận bài: 5.9.2022

Ngày phản biện khoa học: 17.10.2022

Ngày duyệt bài: 28.10.2022

quantity of Vietnamese Pharmacopoeia V. We used the cold soaking method to examine the extraction conditions (extraction solvent, time, the number of extraction times, the amount of solvent) and the process of removing impurities. The controlled extract of nuciferine was determined by utilizing high-performance liquid chromatography coupled with a photodiode arrays detector (HPLC-PDA). **Results:** The optimum extraction parameter include 70° alcohol, three times of extraction, material-solvent ratio (1:10). From 5 kg of dried lotus leaf to obtain 80,5g of controlled extract of nuciferine with 10% of nuciferine were determined by HPLC/PDA method. **Conclusion:** This study successfully developed a standardized extraction procedure with controlled nuciferine content from Folium Nelumbinis collected in Dong Thap province at the 5 kg of dried leaves. This proposed process can implement on an industrial scale to produce safe and effective products.

Keywords: Nuciferine, standardized extraction, lotus leaf.

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Bên cạnh là nguồn thực phẩm giá trị, cây Sen (*Nelumbo nucifera* Gaertn.) với tất cả các bộ phận đều được sử dụng trong y học cổ truyền, là nguyên liệu cây thuốc có giá trị sinh học cao. Cây Sen được phân bố mọi miền đất nước Việt Nam nhưng nổi tiếng nhất là ở Đồng Tháp Mười. Các nghiên cứu dược lý đã chứng minh dịch chiết lá sen có nhiều hoạt tính sinh học in vivo như: an thần [3],[7], chống béo phì [3][7], hạ cholesterol huyết [4],[7], chống oxy hóa, hạ đường huyết, chống lại sự phát triển của tế bào ung thư [7]. Các nghiên cứu thành phần hóa học học và dược lý hiện đại cho thấy lá Sen nguồn nguyên liệu dồi dào, sẵn có chứa thành phần hóa học chính là các alkaloid, flavonoid. Trong đó, nuciferin liên quan đến nhiều tác dụng sinh học được chứng minh [7], [8].

Hiện nay có nhiều chế phẩm được bào chế từ nguyên liệu hay cao chiết lá sen. Tuy nhiên chưa có nghiên cứu hay sản phẩm nào bào chế từ cao định chuẩn được kiểm soát hàm lượng nuciferin từ lá Sen. Do đó, việc nghiên cứu "Xây dựng quy trình chiết cao định chuẩn có kiểm soát hàm lượng nuciferin từ lá Sen hồng thu hái tại Đồng Tháp" nhằm cải thiện chất lượng và hiệu quả sử dụng của sản phẩm là một yêu cầu rất cấp thiết.

II. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu. Lá sen thu hái vào tháng 9 năm 2021 ở huyện Tháp Mười tỉnh Đồng Tháp. Mẫu được phơi khô trong mát, loại tạp cơ học, xay ra thành bột sau khi thử đạt ẩm $\leq 12\%$ [1]. Định danh bằng cách so sánh và mô tả hình thái thực vật với các thông tin trên các tài

liệu tham khảo thực vật học chuyên ngành, được điển Việt Nam V và lưu tại bộ môn Hóa phân tích-Kiểm nghiệm-Độc chất, khoa Dược, Đại học Y Dược Cần Thơ.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Thiết kế nghiên cứu: nghiên cứu thực nghiệm. Cỡ mẫu và phương pháp chọn mẫu: 5 kg lá sen.

Chiết xuất. Bột dược liệu được tẩm với acid đến pH 1-2 chiết ngâm lạnh với dung môi khảo sát, thu được dịch chiết. Cô giảm áp dịch chiết thu được cao mềm. Cao mềm được hòa với nước acid pH 1-2. Dịch nước acid để lắng, lọc, chuyển dạng base pH 9-10 rồi lắc phân bố với các dung môi khảo sát và cô để thu được cao alkaloid toàn phần. Nghiên cứu khảo sát dung môi chiết, số lần chiết, phương pháp loại tạp tối ưu để thu được hàm lượng cao nuciferin trong lá Sen.

Xác định hàm lượng Nuciferin trong cao alkaloid toàn phần. Bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao kết hợp với phương pháp sắc ký lớp mỏng sử dụng kỹ thuật chấm đồng lượng để so sánh sánh nồng độ một cách tương đối.

- Điều kiện sắc ký lớp mỏng (SKLM) [2]:

Bản mỏng silicagel F₂₅₄, hệ dung môi khai triển: CHCl₃: MeOH: NH₃ (9:6:1). Dung dịch thử: Lấy 1ml dung dịch thử cô trên cách thủy đến còn khoảng 0,5 ml. Dung dịch đối chiếu: Hòa tan 1 mg nuciferin chuẩn trong 1 ml MeOH (TT).

Cách tiến hành: Chấm riêng biệt lên bản mỏng 20 μ l mỗi dung dịch trên. Sau khi triển khai sắc ký, lấy bản mỏng ra, để khô ở nhiệt độ phòng. Quan sát dưới đèn UV 254, 365. Phun thuốc thử Dragendorff (TT). Trên sắc ký đồ của dung dịch thử xuất hiện nhiều vết, trong đó có vết cùng màu sắc và giá trị R_f với vết của nuciferin trên sắc ký đồ của dung dịch đối chiếu.

- Điều kiện sắc ký lỏng hiệu năng cao thích hợp (HPLC) [2]: Cột sắc ký pha đảo Phenomenex Gemini NX RP-C18 (150 x 4,6 mm, 5 μ m); Pha động: ACN-Triethylamin 0,1% điều chỉnh đến pH 8,5 (55:45, tt/tt); Bước sóng phát hiện 272 nm; Tốc độ dòng: 1 mL/phút; Thể tích tiêm mẫu: 20 μ L; Nhiệt độ cột: 25°C.

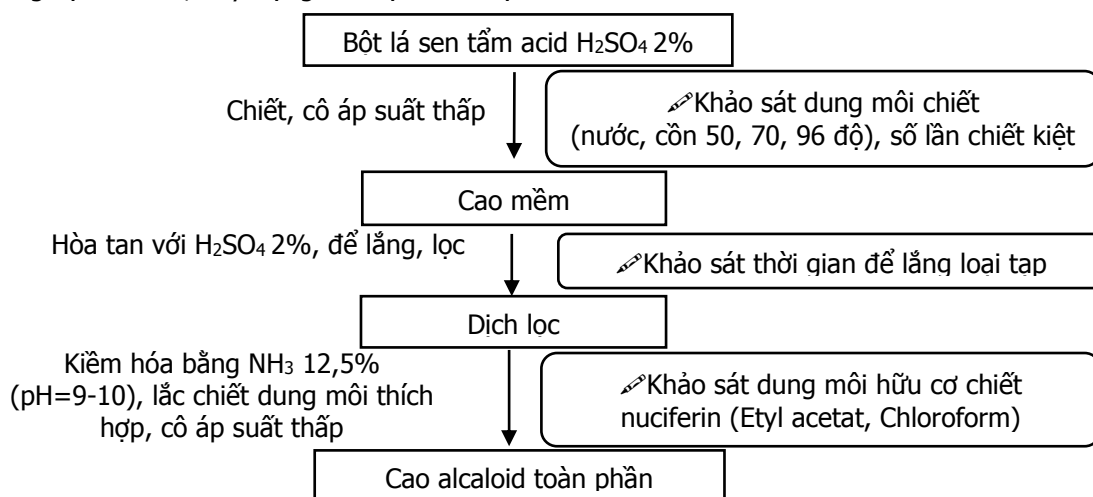
Dung dịch chuẩn gốc: Cân chính xác khoảng 2 mg nuciferine chuẩn, cho vào bình định mức dung tích 10 ml, hòa tan và bổ sung methanol vừa đủ thể tích được dung dịch chuẩn Nuciferin 200 ppm.

Dung dịch chuẩn làm việc: Lấy 0,5 ml dung dịch chuẩn gốc cho vào bình định mức 5 ml bổ sung vừa đủ bằng MeOH, lắc đều thu được dung dịch chuẩn có nồng độ 20 ppm và lọc qua màng lọc kích thước 0,45 μ m.

Dung dịch thử: Hoàn tan 0,5 g gam cao cho vào bình định mức 100 ml. Thêm khoảng 90 ml MeOH, siêu âm trong thời gian 20 phút để hòa tan. Thêm MeOH vừa đủ đến vạch, lắc đều. Hút 0,3 ml dung dịch cho vào bình định mức 5 ml, bổ sung MeOH vừa đủ, lắc đều và lọc qua màng lọc kích thước 0,45 μ m.

Phương pháp đường chuẩn; chuẩn bị một dãy dung dịch chuẩn, xây dựng đồ thị chuẩn sự

phụ thuộc giữa nồng độ chất chuẩn và diện tích pic thu được, sau đó xử lý thống kê. Phương trình hồi qui của đường chuẩn theo diện tích pic có dạng: $y = ax + b$ (x: nồng độ; y: diện tích pic; a, b: hằng số). Đo diện tích pic của chất nghiên cứu trong mẫu (trong cùng điều kiện thực nghiệm) như đường chuẩn, thay y vào phương trình trên ta tìm được C_M .



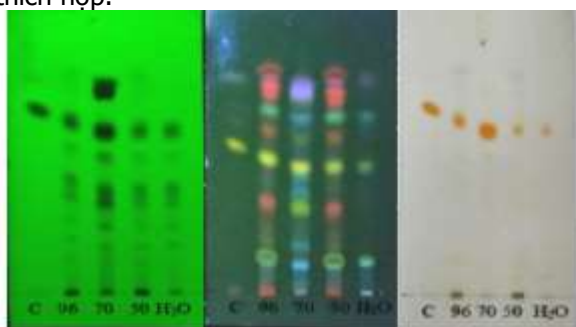
Sơ đồ 1: Khảo sát quy trình chiết cao định chuẩn từ lá Sen

III. KẾT QUẢ

3.1. Chiết xuất

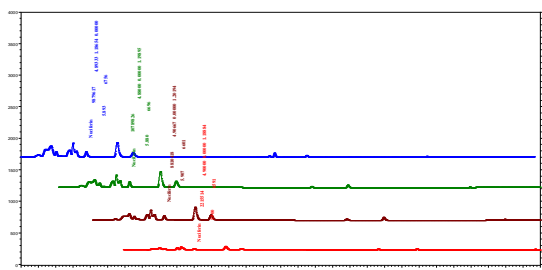
3.1.1. Khảo sát dung môi chiết xuất.

Chúng tôi tiến hành chiết xuất mẫu dược liệu trong cùng một điều kiện phương pháp ngâm lạnh nhưng với các dung môi chiết khác nhau: EtOH 96^o, EtOH 70^o, EtOH 50^o, H₂O. So sánh SKLM, HPLC đánh giá và lựa chọn dung môi chiết thích hợp.



(C): chuẩn Nuciferin; (96): dịch chiết cồn 96^o; (70): dịch chiết cồn 70^o; (50): dịch chiết cồn 50^o; (H₂O): dịch chiết H₂O.

Hình 1. Sắc ký đồ alkaloid toàn phần khảo sát với dung môi chiết



(a) cồn 96^o; (b) - cồn 70^o; (c)- cồn 50^o; (d) – nước

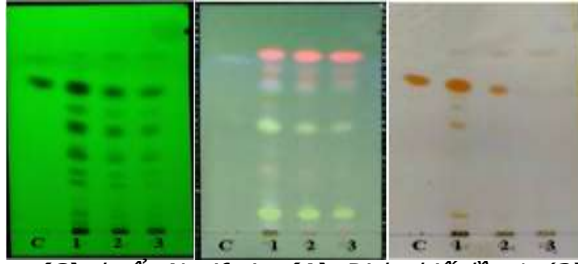
Hình 2. Ghép SKĐ khảo sát dung môi chiết
Bảng 1. Diện tích pic khảo sát các dung môi chiết khác nhau

Dung môi chiết	Cồn 96 ^o	Cồn 70 ^o	Cồn 50 ^o	Nước
Diện tích pic	9879617	10789826	8810418	490000

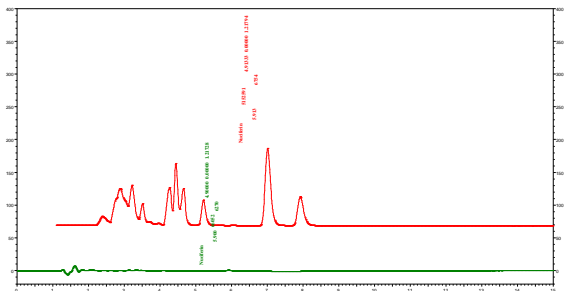
Nhận xét: Trên hình ảnh sắc ký lớp mỏng và sắc ký đồ nhận thấy dịch chiết cồn 70^o thu được hàm lượng nuciferin tối ưu.

3.1.2. Khảo sát số lần chiết. Chúng tôi tiến hành chiết mẫu dược liệu nhiều lần, sử dụng thuốc thử Dragendorff để nhận biết lúc nào dịch

chiết thu được không xuất hiện alcaloid thì dừng lại. Dựa vào SKLM và HPLC để đánh giá.



(C) chuẩn Nuciferin, (1): Dịch chiết lần 1, (2): Dịch chiết lần 2, (3): Dịch chiết lần 3
Hình 3. Sắc ký đồ alcaloid toàn phần khảo sát với 3 lần chiết cồn 70°.



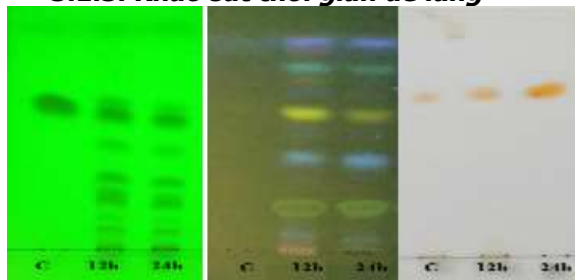
a: Dịch chiết lần 1 và 2; b: Dịch chiết lần 3
Hình 4. Ghép SKĐ alcaloid toàn phần khảo sát với 3 lần chiết cồn 70°

Bảng 2 Diện tích pic các lần chiết

	Diện tích pic
CHIẾT LẦN 1-2	$S_{1+2} = 18156720,5$
CHIẾT LẦN 3	$S_3 = 136089$
S_3/S_{1+2}	0,75%

Nhận xét: Trên hình ảnh sắc ký lớp mỏng và sắc ký đồ nhận thấy với ba lần chiết tỷ lệ được liệu và dung môi (1:10) thu được lượng nuciferin đã chiết kiệt.

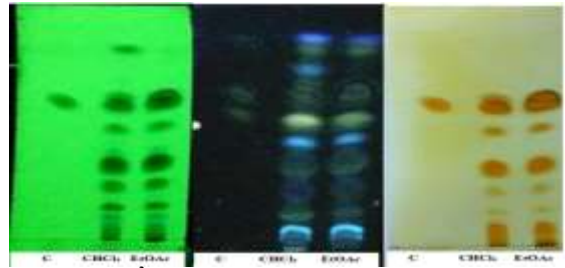
3.1.3. Khảo sát thời gian để lắng



C: Chuẩn nuciferin; 12h: Dịch chiết để lắng 12h; 24h: Dịch chiết để lắng 24h

Hình 5: SKĐ khảo sát thời gian lắng loại tạp
Nhận xét: Trên hình ảnh sắc ký lớp mỏng nhận thấy để lắng 24h tạp kém phân cực được loại sạch.

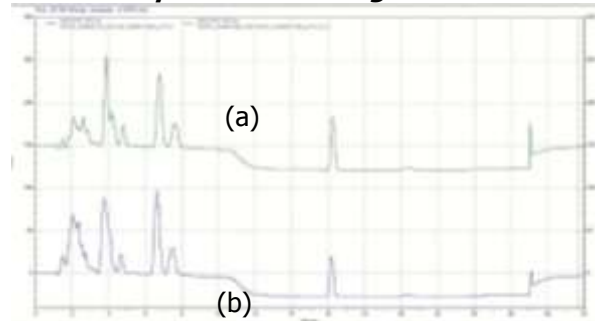
3.1.4. Khảo sát dung môi hữu cơ chiết



C: chuẩn, CHCl₃: dịch chiết kiềm hóa lắc với chloroform,

EtOAc: dịch chiết kiềm hóa lắc với etyl acetat

Hình 6. Sắc ký đồ alcaloid toàn phần khảo sát lắc phân bố với dung môi hữu cơ



a: Cao định chuẩn lắc phân bố với Chloroform;

b: Cao định chuẩn lắc phân bố với Etyl acetat

Hình 7. Ghép SKĐ alcaloid toàn phần khảo sát lắc phân bố với dung môi hữu cơ

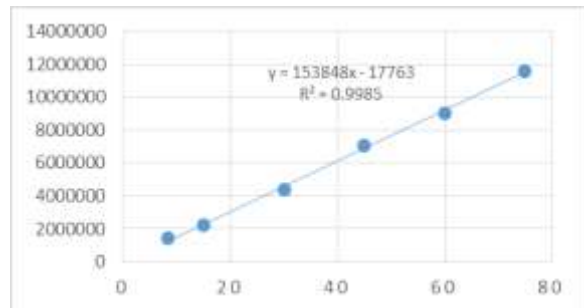
Nhận xét: Dùng etyl acetat để chiết alcaloid toàn phần lượng nuciferin thu được nhiều hơn và không bị nhũ hóa trong quá trình lắc chiết.

3.2. Hàm lượng nuciferin trong lá sen

Đường tuyến tính:

Bảng 3. Kết quả khảo sát tính tuyến tính

C (ppm)	S
75	11615768
60	9072883
45	7063620
30	4387706
15	2237985
8,4	1423559

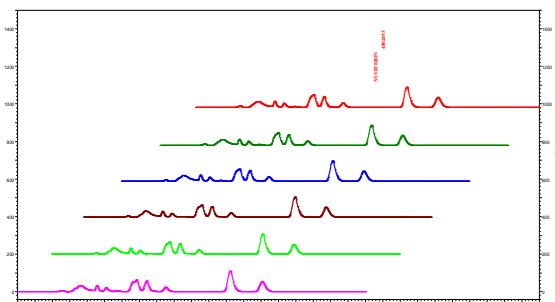


Hình 8. Đồ thị tuyến tính của Nuciferin
Xác định hàm lượng Nuciferin

Dung dịch thử: Hoàn tan 0,5 g gam cao cho vào bình định mức 100 ml. Thêm khoảng 90 ml MeOH, siêu âm trong thời gian 20 phút để hòa tan. Thêm MeOH vừa đủ đến vạch, lắc đều. Hút 0,3 ml dung dịch cho vào bình định mức 5 ml, bổ sung MeOH vừa đủ, lắc đều và lọc qua màng lọc kích thước 0,45 μ m. Tiêm lặp lại 6 lần tính S_{tb} . Thay S (trung bình) vào ta được $C=31,396$ (ppm). Hàm lượng Nuciferin trong cao 10,465%.

Bảng 4. Kết quả của 6 lần tiêm

Lần	S
1	4893620
2	4745697
3	4794865
4	4834929
5	4803416
6	4802493
TB	4812503,333
SD	49070,98433
RSD	0,010196561



Hình 9. Overlay sắc ký đồ 6 lần tiêm

IV. BÀN LUẬN

Nghiên cứu này đã cải thiện phương pháp loại tạp dùng acid để lắng so với nghiên cứu [4] đã sử dụng Helianthin để loại tạp tăng thêm một thành phần tạp chất là phức hợp của helianthin, trong quá trình kiểm soát nhiều thông số pH tối ưu của môi trường, thời gian thủy phân, khó áp dụng ở qui mô công nghiệp

Nghiên cứu này đã cải thiện dung môi chiết cồn 70° so với nghiên cứu [5] dùng PE chiết alkaloid dạng bazo tổn kém, dễ bay hơi, khó triển khai trên qui mô công nghiệp.

Nghiên cứu này đã thu được nhiều kết quả mới bằng cách sử dụng acid H_2SO_4 2% điều chỉnh pH phù hợp và để lắng, môi trường lạnh với thời gian 24 giờ đã mang lại hiệu quả loại được rất nhiều tạp kém phân cực như chlorophyll, chất béo..., dịch chiết thu được ít tạp, làm giàu thành phần chính nuciferin. Dung môi chiết bằng cồn 70°: rẻ tiền, dễ tìm, ít độc dễ dàng ứng dụng trên qui mô công nghiệp, sau khi chiết xong, cô thu hồi tái sử dụng. Dung môi hữu

cơ chiết alkaloid toàn phần Etyl acetat không bị nhũ hóa, ít độc hại hơn Chloroform.

Bên cạnh đó, việc kiểm soát hàm lượng thành phần nuciferin trong nền mẫu cao chiết phức tạp bằng phương pháp HPLC/PDA cho độ tin cậy, nhạy, đặc hiệu, đúng và chính xác cao.

V. KẾT LUẬN

Qui trình chiết xuất cao toàn phần alkaloid: Bột Lá sen tẩm với H_2SO_4 2% trong 30 phút sau đó tiến hành ngâm lạnh cồn 70° (tỷ lệ được liệu/dung môi 1:10) trong 12h-14h, lặp lại 3 lần. Dịch chiết thu được cô áp suất thấp thu được cao mềm. Hòa cao mềm thu được với H_2SO_4 2% để lắng, môi trường lạnh 24h. Kiểm lớp dịch phía trên bằng NH_3 12,5% đến pH 9-10, khuấy phân bố 3 lần với Etyl acetat tỷ lệ (1:2), tốc độ cánh khuấy 600 rpm trong 5 phút. Lấy lớp dịch chiết Etyl acetat ở trên cô chân không, áp suất giảm thu hồi dung môi thu được cao toàn phần alkaloid.

Nghiên cứu này đã xây dựng thành công quy trình chiết cao định chuẩn có kiểm soát hàm lượng nuciferin từ lá Sen hồng thu hái tại Đồng Tháp từ quy mô 5 kg lá sen khô. Quy trình đề xuất này có tiềm năng triển khai trên quy mô công nghiệp để phát triển các dạng sản phẩm bào chế có tính an toàn và hiệu quả hơn từ nguyên liệu lá Sen hồng Đồng Tháp.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Bộ Y tế (2017)**, Dược điển Việt Nam V, Nxb Y học Hà Nội, tr.1385- 1391.
- Đỗ Châu Minh Vĩnh Thọ (2015)**, Nghiên cứu ứng dụng phương pháp sắc ký để phân tích thành phần alkaloid, flavonoid của lá, tâm sen và các chế phẩm, Luận án tiến sĩ dược, Đại học Y-Dược thành phố Hồ Chí Minh.
- Đỗ Tất Lợi (2004)**. Những cây thuốc và vị thuốc Việt Nam, Nhà xuất bản Y học Hà Nội, tr. 783- 786.
- Đỗ Châu Minh Vĩnh Thọ, Nguyễn Thị Tường Vi, Nguyễn Thị Phương Cúc (2012)**, "Xây dựng qui trình chiết cao chuẩn alkaloid lá sen (*Nelumbo nucifera* Gaertn)", Tạp chí Y học thực hành, số 852+853, 315-319.
- Nguyễn Thị Thu Hường (2014)**, "Nghiên cứu chiết xuất alkaloid toàn phần và phân lập nuciferin từ lá sen" Luận văn tốt nghiệp Dược sĩ đại học, Trường Đại học Dược Hà Nội
- Phạm Thanh Kỳ (2007)**, Dược Liệu Học, tập 2, Nhà xuất bản Y học, tr.9-27, 116-119.
- Chen G, Zhu M, Guo M (2019)** Research advances in traditional and modern use of *Nelumbo nucifera*: phytochemicals, health promoting activities and beyond. Crit Rev Food Sci Nutr. 2019;59(sup1): S189-S209.
- YanWana, JiaXiaa,Jin-feng, Xua, LuChena, et als, (2022)**, "Nuciferine, an active ingredient derived from lotus leaf, lights up the way for the potential treatment of obesity and obesity-related diseases". Pharmacological Research (175)