

SƠ BỘ XÂY DỰNG TIÊU CHUẨN CƠ SỞ CAO CHIẾT DƯỢC LIỆU BÌM BA RĂNG (*MERREMIA TRIDENTATA* L., CONVULVULACEAE)

Preliminary construction of basic standard for extract from *Merremia tridentata* L. Convolvulaceae

Nguyễn Thị Thùy Trang^{1a}, Nguyễn Dương Ngọc Thới^{*1b}, Võ Văn Lệnh^{1c}

¹Khoa Dược, Trường Đại học Lạc Hồng

Email: ^atrangthuy0097@gmail.com, ^bthoinguyen@lhu.edu.vn, ^clenhvophar@gmail.com

Received: 20th October 2020; Revised: 02nd November 2020; Accepted: 16th November 2020

*Corresponding Author: thoinguyen@lhu.edu.vn

TÓM TẮT. Nghiên cứu này nhằm xây dựng tiêu chuẩn cơ sở cao chiết từ thân Bìm ba răng để ứng dụng sử dụng các cao chiết cho các nghiên cứu về sau. Định tính cao dược liệu bằng phương pháp phản ứng hóa học đặc trưng và kỹ thuật sắc ký lớp mỏng, xác định hàm lượng flavonoid bằng kỹ thuật HPLC. Cao chiết nước và cồn 50% có độ ẩm lần lượt là 7,32% và 9,96%. Xác định được sự hiện diện của flavonoid bằng phản ứng hóa học. Kỹ thuật sắc ký lớp mỏng xác định cao Bìm ba răng có năm flavonoid là apigenin, luteolin, quercitrin, apigetrin và cynarosid. Hàm lượng cynarosid trong cao nước và cao cồn 50% từ thân cây Bìm ba răng lần lượt là 0,4768% và 0,7264%. Như vậy, bằng phương pháp hóa học và kỹ thuật sắc ký lớp mỏng, xác định hàm lượng cynarosid bằng HPLC góp phần xây dựng tiêu chuẩn cơ sở của cao thân Bìm ba răng.

TỪ KHOÁ: Bìm ba răng, *Merremia tridentata* L., Convolvulaceae, flavonoid.

ABSTRACT. This study aims to establish the basic standards of extract from *Merremia tridentata* stems for the extract researches in the future. The qualitative analysis of extract were determined by characteristic chemical reactions and thin layer chromatography fingerprints method, flavonoids was determined by HPLC method. The water and ethanol 50% extract have average humidity 7.32% and 9.96% respectively. There is the presence of flavonoids in the extract. Thin layer chromatography of extract showed five flavonoids: apigenin, luteolin, quercitrin, apigetrin and cynarosid. The concentration of cynarosid in water and ethanol 50% extract is 0.4768% and 0.7264%, respectively. Thus, the chemical reaction methods, thin layer chromatography fingerprints methods, the determination of cynarosid concentration by HPLC could apply to standardize the extract of *M. tridentata* stems.

KEYWORDS: *Merremia tridentata* L., Convolvulaceae, flavonoid.

1. GIỚI THIỆU

Bìm ba răng (*Merremia tridentata* L., Convolvulaceae) là một cây thuốc dân gian được ứng dụng rất rộng rãi trong y học dân gian trong và ngoài nước để chữa một số bệnh phổ biến như thấp khớp, liệt nửa người, trĩ, đau nhức xương khớp, lậu, sốt rét, bệnh dờ leo, viêm nhiễm ngoài da [1]. Các công trình nghiên cứu cho thấy cao chiết Bìm ba răng còn có tác dụng giảm đau, kháng viêm rất tốt [3-5], làm hạ đường huyết đáng kể ở chuột tăng đường huyết gây bởi streptozotocin [6]. Kết quả của một nghiên cứu mới đây còn cho thấy cao Bìm ba răng có khả năng phục hồi vết mô, làm lành vết thương [2]. Nguồn dược liệu Bìm ba răng ở Việt Nam rất phong phú, phân bố trải khắp từ Nam Trung Bộ đến Tây Nam Bộ. Hơn

nữa, dược liệu Bìm ba răng lại có nhiều ứng dụng trong điều trị, mang lại một tiềm năng lớn trong khai thác và sử dụng ở nước ta. Để tạo cơ sở cho các nghiên cứu ứng dụng cao Bìm ba răng trong chiết xuất và sử dụng điều trị, nghiên cứu này được thực hiện với mong muốn xây dựng và tiêu chuẩn hóa các cao chiết từ thân dược liệu bìm ba răng, từ đó làm tiền đề cho các nghiên cứu sâu hơn.

2. ĐỐI TƯỢNG – PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu

Nguyên liệu

Toàn thân trên mặt đất của Bìm ba răng tươi được thu hái vào tháng 9 năm 2019 tại xã Ân Hào Đông, huyện Hoài Ân, tỉnh Bình Định. Việc định danh loài được thực hiện tại bộ

môn Dược liệu, Khoa Dược, Đại học Lạc Hồng (tra cứu theo thông tin trong sách Từ điển cây thuốc Việt Nam và sách Từ điển thực vật thông dụng của tác giả Võ Văn Chi) [1,7]. Dược liệu được rửa sạch, thái nhỏ, phơi khô trong nắng râm, sau đó xay thành bột mịn (cỡ bột 0,5-1,0 mm).

Hóa chất – Trang thiết bị

- Chất đối chiếu: Apigenin, luteolin, quercetin 3-O- α -L-rhamnopyranosid (quercitrin), apigenin-7-O- β -D-glucopyranosid (apigetrin), luteolin-7-O- β -D-glucopyranosid (cynarosid) từ đề tài nghiên cứu phân lập trước đó đã được kiểm độ tinh khiết, đo phổ NMR, MS, IR. [10]
- Tủ sấy Memmert IN5 (Đức).
- Bản sắc ký trắng sẵn silica gel F254 (Merck)
- Đèn UV 254 và 365 nm (Vilber Lourmat CN-15-LC).
- Bể siêu âm Elma S108H tần số 37 kHz.
- Hệ thống HPLC-PDA của Agilent.
- Và các trang thiết bị, dụng cụ thông thường trong phòng thí nghiệm.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Chiết xuất cao thân Bìm ba răng

Dược liệu gồm toàn thân trên mặt đất Bìm ba răng được xay mịn (cỡ bột 0,5-1,0 mm). Chiết với dung môi nước và cồn 50% bằng phương pháp hãm ở nhiệt độ 100 °C trong 20 phút, chiết 3 lần, mỗi lần với 1000 ml dung môi. Gôm dịch chiết, cô cách thủy ở 50 °C đến khi thu được lần lượt cao nước và cao cồn từ thân cây Bìm ba răng.

Xây dựng tiêu chuẩn cơ sở cao thân Bìm ba răng

Độ ẩm cao dược liệu: Áp dụng phương pháp trọng lượng (dùng tủ sấy) theo ĐĐVN V, phụ lục 9.6 để xác định độ ẩm cao dược liệu Bìm ba răng [8].

Tính kết quả: độ ẩm được tính theo công thức:

$$X = \frac{a - (c - b)}{a} \times 100\%$$

a (g): khối lượng cao đem thử.

b (g): khối lượng chén không.

c (g): khối lượng chén có cao sau khi sấy.

X (%): độ ẩm dược liệu tính theo phần trăm.

Định tính

Phương pháp hóa học:

Lấy khoảng 1 g cao cho vào chén sứ. Hòa cao với 2 ml ethanol và gạn dịch ethanol vào một ống nghiệm nhỏ. Thêm

vào dung dịch một ít Magnesi kim loại và thêm từ từ 0,5 ml HCl đđ. Quan sát màu của ống nghiệm, nếu sau phản ứng dung dịch có màu hồng tới đỏ thì kết luận có flavonoid.

Phương pháp sắc ký lớp mỏng:

Áp dụng phương pháp sắc ký lớp mỏng với bản mỏng silica gel F254 (Merck), dung môi triển khai là EtOAc-MeOH-HCOOH-H₂O (30:2:1:0,5), mẫu thử là cao chiết Bìm ba răng hòa tan trong MeOH, lọc qua màng lọc 0,45 μ m.

Các chất chuẩn: apigenin, luteolin, quercitrin, apigetrin và cynarosid hòa tan trong MeOH.

Phát hiện bằng đèn UV ở 254 nm, thuốc thử FeCl₃ 5% trong cồn.

Định lượng

Áp dụng phương pháp HPLC, sử dụng cynarosid làm chất chỉ điểm cho cao Bìm ba răng. Quy trình đạt các yêu cầu thẩm định về độ đúng, độ chính xác, độ lặp lại, tính tương thích hệ thống, khoảng tuyến tính.

Chuẩn bị mẫu thử: Lấy 100 mg cao chiết nước và 100 mg cao chiết cồn 50% từ thân cây Bìm ba răng, hòa tan với hỗn hợp MeOH-H₂O (1:1) trong bình định mức 100 ml, lọc qua màng lọc 0,45 μ m. Mẫu thử được tiêm vào hệ thống HPLC với các điều kiện sắc ký đã được thẩm định theo hướng dẫn của International Conference on Harmonization (ICH). Cột sắc ký Phenomenex Luna C8 (250 \times 4,6 mm, 5 μ m), thể tích tiêm mẫu 10 μ l, nhiệt độ cột là 30 °C, tốc độ dòng 1 ml/phút, đầu dò dây diod quang (DAD) với bước sóng phát hiện 350 nm. Pha động bao gồm acetonitril (A) và dung dịch phosphoric pH 2,5 (B) với chương trình rửa giải gradient là 0-16 phút, 15,5% A; 16-25 phút, 20% A; 25-26 phút, 15,5% A. Thực hiện song song với mẫu đối chiếu cynarosid có nồng độ khoảng 40 μ g/ml. Tính toán hàm lượng (%) cynarosid chiết được từ thân cây Bìm ba răng.

Hàm lượng (%) cynarosid trong các cao BBR được tính theo công thức:

$$X\% = \frac{S_t \times m_c \times H\% \times D_t}{S_c \times D_c \times m_t} \times 100$$

Trong đó:

X: hàm lượng (%) chất phân tích có trong cao dược liệu.

S_t: diện tích pic của chất phân tích trong dung dịch thử.

S_c: diện tích pic của chất phân tích trong dung dịch đối chiếu.

D_t: độ pha loãng mẫu thử. D_c: độ pha loãng mẫu đối chiếu.

H%: hàm lượng chất đối chiếu theo phương pháp quy về 100% diện tích pic.

m_c : khối lượng đối chiếu (mg).

m_t : khối lượng cao để pha mẫu thử (mg).

3. KẾT QUẢ

Chiết xuất và độ ẩm cao dược liệu

Từ 100 g bột thân dược liệu Bìm ba răng, tiến hành chiết với dung môi nước và cồn 50% bằng phương pháp hầm ở nhiệt độ 100 °C, thu được 21,76 g cao chiết nước (độ ẩm 7,32%) và 22,28 g cao chiết cồn (độ ẩm 9,96%). Theo ĐDVN V, các cao Bìm ba răng thu được dưới dạng cao đặc.

Bảng 1. Độ ẩm (%) cao T/N, T/C Bìm ba răng

Cao	Mẫu 1	Mẫu 2	Mẫu 3	Trung bình
T/N	7,59	7,06	7,30	7,32 ± 0,15
T/C	9,72	9,98	10,17	9,96 ± 0,13

Định tính

Phương pháp hóa học: Hợp chất flavonoid dương tính

Phương pháp sắc ký lớp mỏng:

Dựa vào so sánh Rf của các vết trong mẫu thử và Rf các vết chuẩn cho thấy mẫu thử cao T/N có cả năm flavonoid là apigenin, luteolin, quercitrin, apigetrin và cynarosid.

Bảng 2. Kết quả sắc ký cao Bìm ba răng

Hệ dung môi	Vết	Flavonoid	Rf
EtOAc-	1	Apigenin	0,75
MeOH-	2	Luteolin	0,71
HCOOH-	3	Quercitrin	0,38
H ₂ O	4	Apigetrin	0,31
(30:2:1:0,5)	5	Cynarosid	0,27

Định lượng

Bằng phương pháp HPLC, với khối lượng cao nước và cao cồn 50% từ thân Bìm ba răng là 100,1 mg, hàm lượng chất đối chiếu H% là 98,38%, thu được kết quả hàm lượng cynarosid trong cao nước và cao cồn 50% của thân cây Bìm ba răng lần lượt là 0,4768% và 0,7264%.

4. KẾT LUẬN

Đề tài nghiên cứu đã xây dựng tiêu chuẩn sơ bộ cao chiết từ thân dược liệu Bìm ba răng. Từ 100,1 g thân Bìm ba răng, chiết bằng phương pháp hầm ở 100⁰C trong 20 phút với dung môi nước và cồn 50%, thu được cao đặc. Năm loại flavonoid được xác định có trong cao là apigenin, luteolin, quercitrin, apigetrin và cynarosid. Hàm lượng cynarosid có trong cao nước và cao cồn 50% từ thân Bìm ba răng lần lượt là 0,4768% và 0,7264%.

5. LỜI CẢM ƠN

Nhóm tác giả xin gửi lời cảm ơn chân thành nhất đến Trường Đại Học Lạc Hồng đã tạo điều kiện, cung cấp kinh phí và hỗ trợ phòng thí nghiệm để thực hiện nghiên cứu này. Cảm ơn ban biên tập và phản biện Tạp chí Khoa học Lạc Hồng (Journal of science of Lac Hong University) đã góp ý cho bài báo này.

6. TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Võ Văn Chi, *Từ điển cây thuốc Việt Nam, Tập 1*, Nhà xuất bản Y học, **2018**, pp. 163-164.
- [2] A. P. Ambika, S. N. Nair, Wound healing activity of plants from the Convolvulaceae Family, *Adv Wound Care (New Rochelle)*, **2019**, 8(1), pp. 28-37.
- [3] S. Mohamed, Analgesic activity of *Merremia tridentata* (L.) Hall. F., *AARJMD*, **2013**, 1(14), pp. 307-313.
- [4] K. Arunachalam, T.P., S.Manian, Analgesic and antiinflammatory effects of *Merremia tridentata*. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, **2011**. 3(1).
- [5] Bidkar, Abhijeet A et al., Phytochemical and pharmacological investigation of extracts of *Merremia tridentata* Linn. (Convolvulaceae), *Journal of Natural Remedies*, **2009**, 9 (1), pp. 79-84.
- [6] Karuppusamy Arunachalam, Thangaraj Parimelazhagan, "Antidiabetic activity of aqueous root extract of *Merremia tridentata* (L.) Hall. f. in streptozotocin-induced-diabetic rats", *Asian Pacific journal of tropical medicine*, **2012**, 5 (3), pp. 175-179.
- [7] Võ Văn Chi, *Từ điển thực vật thông dụng, Tập 1*, Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ Thuật Hà Nội, **2004**.
- [8] Bộ Y Tế, *Dược điển Việt Nam V*, Nhà xuất bản Y học Hà Nội, **2018**, Phụ lục 1.1, 9.6, 9.8.
- [9] Nguyễn Việt Cường, Võ Văn Lệnh, Võ Thị Bạch Huệ, Xây dựng quy trình định lượng một số flavonoid trong cao chiết từ cây bìm ba răng (*Merremia tridentata* L.) bằng sắc ký lỏng hiệu năng cao, *Tạp chí dược học*, **2020**, 525, 46-49
- [10] Nguyễn Việt Cường, Võ Văn Lệnh, Võ Thị Bạch Huệ, Chiết xuất, phân lập một số flavonoid từ cây bìm ba răng (*Merremia tridentata* L., Convolvulaceae), *Tạp chí dược học*, **2019**, 518, 69-73.

