

Phân lập và khảo sát hàm lượng aloe-emodin trong dược liệu Phan tả diệp (*Cassia angustifolia* Valh.)

Lê Thị Minh Thu

Khoa Dược, Đại học Nguyễn Tất Thành
ltmthu@ntt.edu.vn

Tóm tắt

Phan tả diệp (*Cassia angustifolia* Valh.) thuộc họ Đậu (Fabaceae) là loại cây có giá trị y dược cao. Phan tả diệp được trồng tại Tuy Hòa, Phú Yên và bước đầu được các tác giả trong nước quan tâm nghiên cứu. Một anthraquinone rất phổ biến trong nhiều loài thuộc chi *Cassia* là aloe-emodin. Aloe-emodin là một loại thuốc chống ung thư, táo bón, chữa bệnh dị ứng, chữa tụ máu, làm trắng và giữ ẩm da,...

Phương pháp phân tích bằng sắc kí lỏng hiệu năng cao có ưu điểm: độ nhạy cao, khả năng định lượng đồng thời nhiều chất, tách các hợp chất không bay hơi và chịu nhiệt. Đề tài chọn phương pháp này để phân lập, đánh giá chất lượng aloe-emodin từ dược liệu Phan tả diệp. Cấu trúc hóa học của aloe-emodin được xác định bằng các phương pháp phân tích (IR, UV, MS, 1H-NMR)

© 2020 Journal of Science and Technology - NTTU

Nhận 26.11.2019
Được duyệt 18.05.2020
Công bố 29.06.2020

Từ khóa
aloe-emodin, *Cassia angustifolia*, cô lập anthraglycoside, cấu trúc hóa học

1 Đặt vấn đề

Phan tả diệp (*Cassia angustifolia* Valh.) thuộc họ Đậu (Fabaceae) [1], còn có tên Phan tả diệp Alexandria, Phan tả diệp lá nhọn,... [2,3,4]. Các công trình nghiên cứu về lá cây Phan tả diệp tập trung nhiều vào công dụng của nhóm nhuận tràng anthraglycosid. Anthraglycosid giúp đẩy mạnh quá trình bài tiết của ruột để đào thải cặn bã tồn đọng gây độc cho đường tiêu hóa, hạn chế sự sinh sôi của các loài sinh vật đường ruột có hại - là một loại thuốc xổ giun hữu hiệu.

Một anthraquinone rất phổ biến trong nhiều loài thuộc chi *Cassia* là aloe-emodin [5]. Aloe-emodin dạng rắn tinh thể hình kim, màu vàng, tan trong ether, chloroform, benzen. Nhiệt độ nóng chảy: 221 - 223°C. Aloe-emodin là một loại thuốc chống ung thư, có sự gia tăng sản sinh của các loài có các phản ứng oxi hóa khử, có thể chữa bệnh dị ứng. Aloe-emodin làm tăng hàm lượng nước trong ruột kích thích nhu động dẫn đến tăng sự co bóp cơ trơn đường ruột bằng cách giải phóng acetylcholin nội sinh. Ngoài ra, aloe-emodin đặc biệt hữu ích cho người già, có thể thúc đẩy sự thèm ăn và tăng tốc độ kích hoạt chất độc hại trong ruột. Với chức năng làm trắng và giữ ẩm da, aloe-emodin có thể làm cho da đàn hồi và mềm; Cũng có thể ngăn ngừa thiệt hại từ tia UV [6].

Phương pháp phân tích bằng sắc kí lỏng hiệu năng cao có ưu điểm: độ nhạy cao, khả năng định lượng đồng thời nhiều chất, tách các hợp chất không bay hơi và chịu nhiệt. Đề tài chọn phương pháp này để đánh giá chất

lượng các thành phần của thuốc được chiết xuất từ cây Phan tả diệp.

2 Phương pháp nghiên cứu

2.1 Chiết xuất

Chiết xuất dược liệu bằng phương pháp ngâm kiệt với ethanol 60%. Dược liệu được làm ẩm bằng ethanol 60%, cho vào bình ngâm kiệt, không nén chặt, đặt một miếng giấy lọc lên trên dược liệu, chèn lại.

Mở khóa rút dịch chiết, cho từ từ ethanol 60% lên khối dược liệu đến khi có vài giọt dịch chiết chảy ra. Đóng khóa và tiếp tục thêm ethanol 60% sao cho ngập trên mặt dược liệu khoảng 2 cm. Ngâm 24 giờ.

Rút dịch chiết sau 24 giờ. Cô dịch chiết bằng bép cách thủy ở 70°C đến sệt. Cao thu được phân tán lại vào nước. Lắc dịch nước lần lượt với ether dầu, ethyl acetat. Kiểm tra bằng SKLM và dựa vào tính chất nhóm hợp chất anthraquinone tan trong dung môi phân cực trung bình và chọn cao EtOAc (II) sử dụng để tiếp tục nghiên cứu. Dịch ethyl acetat này được cô dưới áp suất giảm, thu được cao ethyl acetat dưới dạng cao dẻo màu nâu đen.

2.2 Phân lập và tinh chế

2.2.1 Sắc kí cột chân không (VLC)

Giai đoạn này bao gồm thăm dò hệ dung môi cho pha động, chuẩn bị cột, khai triển cột, để bay hơi từ từ thu được dịch đậm đặc.



2.2.2 Phương pháp tinh chế phân đoạn

Dịch đậm đặc của các phân đoạn kết tinh thành các dạng tinh thể, các tinh thể này được rửa với các dung môi thích hợp, lặp lại nhiều lần để thu được chất tinh khiết.

2.3 Xác định cấu trúc của các hợp chất đã phân lập được

2.3.1 Kiểm tra độ tinh khiết

Bằng phương pháp sắc kí lớp mỏng

Các hợp chất phân lập được sơ bộ xác định độ tinh khiết bằng SKLM. Sản phẩm được khai triển trên bản mỏng với các hệ dung môi khác nhau.

Quan sát bản mỏng dưới đèn UV 254 nm, 365 nm và bằng thuốc thử VS trong cồn. Sau khi nhúng thuốc thử, sấy nhẹ bản mỏng đến khi hiện màu. Các vết chấm của hợp chất phân lập – nếu tinh khiết – phải cho một vết duy nhất. Sắc kí đồ lưu lại bằng máy ảnh.

Bằng phương pháp sắc kí lỏng hiệu năng cao

Các hợp chất phân lập được kiểm tra độ tinh khiết bằng phương pháp sắc kí lỏng hiệu năng cao trên máy HPLC Waters Alliance 2695, đầu dò PDA 2996

2.3.2 Xác định cấu trúc hợp chất phân lập được

Các sản phẩm sau khi kiểm tra độ tinh khiết bằng SKLM, HPLC được đo phổ UV, IR, MS, NMR. Từ các dữ liệu ghi nhận được và các dữ liệu trong tài liệu tham khảo có thể xác định được cấu trúc hóa học của các hợp chất phân lập được.

2.4 Xây dựng qui trình định lượng aloe-emodin bằng phương pháp sắc kí lỏng hiệu năng cao

2.4.1 Chuẩn bị mẫu để khảo sát cho qui trình

- Pha dung dịch chuẩn gốc: Cân chính xác 1 mg chất chuẩn aloe-emodin cho vào bình định mức 10 ml, thêm MeOH đến vạch để thu được dung dịch chuẩn gốc có nồng độ aloe-emodin là 100 µg/ml.

- Pha dung dịch mẫu chuẩn: Hút chính xác 1 ml dung dịch chuẩn gốc aloe-emodin cho vào bình định mức 10 ml, thêm MeOH đến vạch thu được dung dịch mẫu chuẩn có nồng độ 10 µg/ml.

- Chuẩn bị mẫu thử: Cân chính xác 1 g bột dược liệu Phan tá diệp đã xay nhỏ, tiến hành chiết xuất với EtOH 60% 3 lần, mỗi lần 10 ml đánh siêu âm trong 15 phút ở nhiệt độ 40°C. Lọc qua giấy lọc có đường kính 8 cm, sau đó dịch chiết được cô đến cạn trong chén sứ, cần được hòa lại với 10 ml nước cất. Dịch nước được tiếp tục lắc với n-Hex 3 lần để loại chlorophyl. Tiếp theo dịch nước được lắc với EtoAc 3 lần, mỗi lần 10 ml đánh siêu âm trong 15 phút ở nhiệt độ 40°C. Sau đó dịch chiết ethyl acetat được cô đến cạn trong chén sứ, cần được hòa lại với MeOH cho vào bình định mức 10 ml, điều chỉnh MeOH đến vạch thu được dung dịch mẫu thử. Hút chính xác 2ml dung dịch mẫu thử pha trong bình định mức 10 ml, điều chỉnh MeOH đến vạch.

2.4.2 Khảo sát các điều kiện tiến hành HPLC

- Khảo sát bước sóng phát hiện: Dựa vào phổ hấp thụ UV của aloe-emodin để chọn bước sóng phát hiện, thường là bước sóng gần sát với cực đại hấp thụ.

- Khảo sát pha động: Triển khai trên mẫu thử trong cùng điều kiện sắc kí lần lượt các pha động khác nhau để chọn ra pha động phù hợp.

Từ kết quả cách thức tiến hành HPLC chọn ra các điều kiện tối ưu cho qui trình định lượng aloe-emodin trong cây Phan tá diệp.

Tính toán kết quả: Hàm lượng aloe-emodin có trong dược liệu được tính theo công thức sau:

$$X_{(mg/g)} = \frac{S_t}{S_c} \times C_c \times \frac{50 \times 100}{m \times (100 - h)} \times \frac{1}{1000}$$

Trong đó:

X: hàm lượng aloe-emodin có trong dược liệu khô (mg/g)

S_t: diện tích peak aloe-emodin của mẫu thử (mAU.s)

S_c: diện tích peak aloe-emodin của mẫu chuẩn (mAU.s)

C_c: nồng độ chất chuẩn (µg/ml)

m: khối lượng bột dược liệu (g)

h: hàm ẩm dược liệu (%)

2.5 Đánh giá qui trình định lượng aloe-emodin

2.5.1 Tính tuyến tính

Chuẩn bị mẫu: Từ dung dịch chuẩn gốc có nồng độ 1 mg/ml, pha giai mẫu có nồng độ chất chuẩn: 15; 25; 45; 55; 75; 150 µg/ml để xây dựng đường chuẩn, khảo sát tính tuyến tính với điều kiện tiến hành HPLC như đã chọn sau khi khảo sát.

Đại lượng đặc trưng cho tuyến tính hệ số tương quan R hay giá trị của hệ số tương quan R². Yêu cầu: R > 0,995.

Sử dụng phân tích hồi qui với trắc nghiệm t (Student) để kiểm tra ý nghĩa của các hệ số trong phương trình hồi qui và trắc nghiệm F (Fisher) để kiểm tra tính thích hợp hệ của phương trình hồi qui.

2.5.2 Tính phù hợp hệ thống

Mục đích: để đảm bảo hệ thống sắc kí có hiệu năng phù hợp có thể xác định độ phân giải và độ lặp lại của hệ thống sắc kí đối với phép phân tích thực hiện.

Đại lượng đặc trưng cho tính tương thích hệ thống là độ lệch chuẩn (SD) hay độ lệch chuẩn tương đối (RSD%).

Yêu cầu: RSD% ≤ 2; 0,8 ≤ As ≤ 1,5; R_s > 1,5 [7].

2.5.3 Tính chọn lọc (tính đặc hiệu)

Chuẩn bị dung dịch mẫu trắng (MeOH), dung dịch chuẩn aloe-emodin, dung dịch thử và dung dịch thử thêm chuẩn aloe-emodin. Tiến hành triển khai HPLC các dung dịch trên. Quan sát các sắc kí đồ và nhận định kết quả thu được.

2.5.4 Độ lặp lại

Chuẩn bị riêng rẽ ít nhất 6 mẫu thử. Thực hiện bởi một người trong cùng một ngày trên cùng điều kiện và trên cùng một thiết bị, tiến hành định lượng bằng phương pháp HPLC với các điều kiện đã chọn, tính hàm lượng trung bình của aloe-emodin có trong mẫu dược liệu. Tính SD và RSD (%) của các kết quả hàm lượng từ 6 lần đo được. Với



phương pháp HPLC và đối tượng được liệu cho phép giá trị $RSD\% \leq 2$ [7].

2.5.5 Độ đúng

Chuẩn bị riêng rẽ mẫu thử thêm chuẩn 80%, 100%, 120% (mỗi mức 3 bình). Xử lý mẫu theo qui trình, tiêm vào hệ thống HPLC và đối tượng được liệu cho phép giá trị $RSD\% \leq 2$ [7].

3 Kết quả

3.1 Chiết xuất

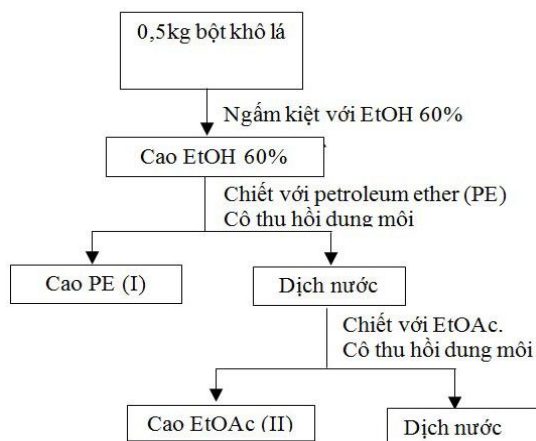
Qui trình chiết xuất 0,5 kg bột lá Phan tá diệp được thực hiện theo sơ đồ 1.

3.2 Phân lập các chất bằng sắc kí

3.2.1 Tách các phân đoạn bằng sắc kí cột chân không (VLC)

- Khảo sát pha động với các hệ dung môi khác nhau
- Tiến hành VLC

Dựa vào tính chất nhóm hợp chất anthraglycosid tan trong dung môi phân cực trung bình mà chọn cao II sử dụng để tiếp tục nghiên cứu hóa học [8]. Cao ethyl acetat (cao II) khi triển khai SKLM thấy có nhiều vết. Tiến hành tinh chế cao II bằng cách lắc với n-hexan để loại bớt chlorophyl. Sau khi loại chlorophyl thu được cặn của cao II là 2,5 g.

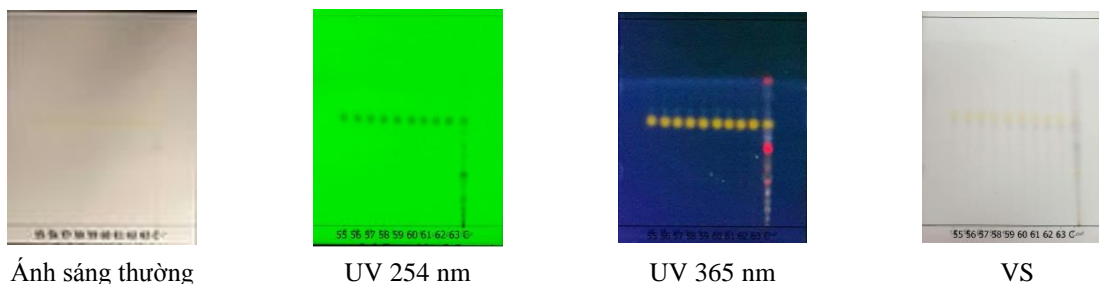


Sơ đồ 1 chiết cao anthraquinone toàn phần từ cao còn lá Phan tá diệp

Tách các phân đoạn từ cao ethyl acetat chứa anthraglycosid toàn phần bằng VLC

- Xử lý phân đoạn 55-63

Phân tách phân đoạn cao ethyl acetat (cao II) bằng VLC, thu được 117 ống với dung môi tăng dần độ phân cực. Kiểm tra bằng SKLM, ống từ 55 - 63 được chọn để tách tiếp vì có nhiều anthraglycosid và tương đối ít tạp.



Hình 2 Sắc kí đồ kiểm tra các ống hứng từ 55 – 63 qua cột VLC.

T: Vết chấm cao anthraglycosid toàn phần. 55; 56; 57- 63: Vết chấm của các ống hứng từ 55 đến 63

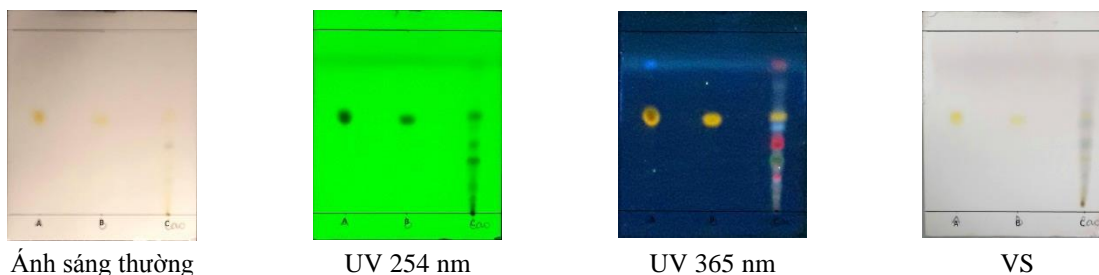
- Tinh chế phân đoạn

Ống hứng từ 55 - 58 có nhiều tủa hình kim màu vàng lắng dưới đáy và tủa hạt trên thành ống nghiệm. Kiểm tra bằng SKLM thấy có các vết R_f tương đương nên được nhập chung 55 và 56 (tủa A), 57 và 58 (tủa B). Lọc riêng các tủa này, sau đó rửa tủa với $CHCl_3$, kiểm tra độ tinh khiết tủa

bằng SKLM thấy tủa A có 2 vết (một vết vàng phủ lên một vết đen) (Hình 2).

Tiếp tục rửa tủa B với EtOAc, kiểm tra độ tinh khiết tủa bằng SKLM thấy có 1 vết vàng là vết sạch. Từ tủa B thu được 21 mg chất màu vàng tươi (Gọi tên là A1).

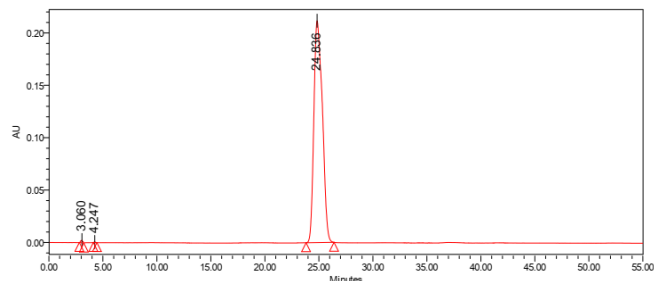
Chất A1 này được tiếp tục khảo sát để xác định cấu trúc.



Hình 3 Sắc kí đồ kiểm tra các tủa A và B sau khi rửa với $CHCl_3$

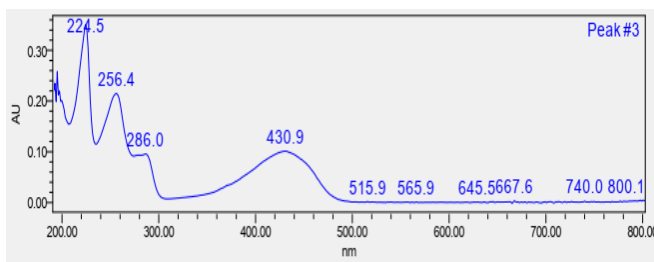
T: Vết chấm cao anthraglycosid toàn phần; A, B: Vết chấm của các anthraglycosid tinh khiết phân lập được

3.2.2 Kiểm tra độ tinh khiết A1 bằng HPLC
Tiến hành kiểm tra độ tinh khiết peak bằng HPLC

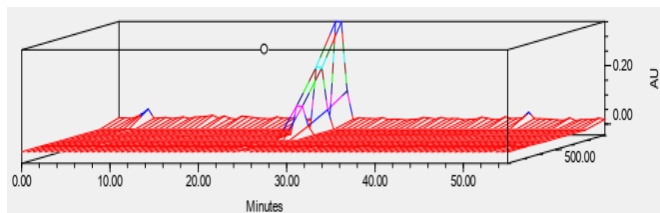


Hình 4 Sắc kí đồ (HPLC) của hợp chất A1

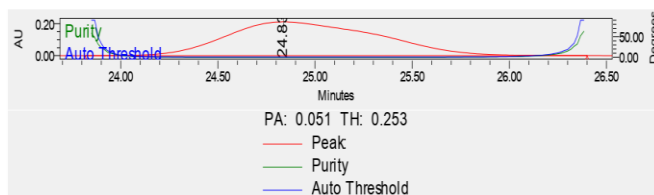
Kết quả thu được trình bày ở các Hình 3 - 7 và Bảng 1:



Hình 5 Phổ hấp thụ UV của hợp chất A1



Hình 6 Phổ 3D của hợp chất A1



Hình 7 Độ tinh khiết của peak A1

Bảng 2 Kết quả kiểm tra độ tinh khiết A1 bằng HPLC

Peak	t _R (phút)	Diện tích peak	% Diện tích peak
1	3,060	31883	0,28
2	4,247	4358	0,04
3 (A1)	24,836	11528628	99,69

Từ kết quả HPLC cho thấy A1 phân lập được chỉ cho một peak chính trên sắc kí đồ với độ tinh khiết sắc kí là 99,69%.

3.3 Xác định cấu trúc hóa học của hợp chất A1.

Tính chất của hợp chất A1: màu vàng, hình kim, tan trong methanol, ethyl acetat.

3.3.1 Phổ UV của hợp chất A1

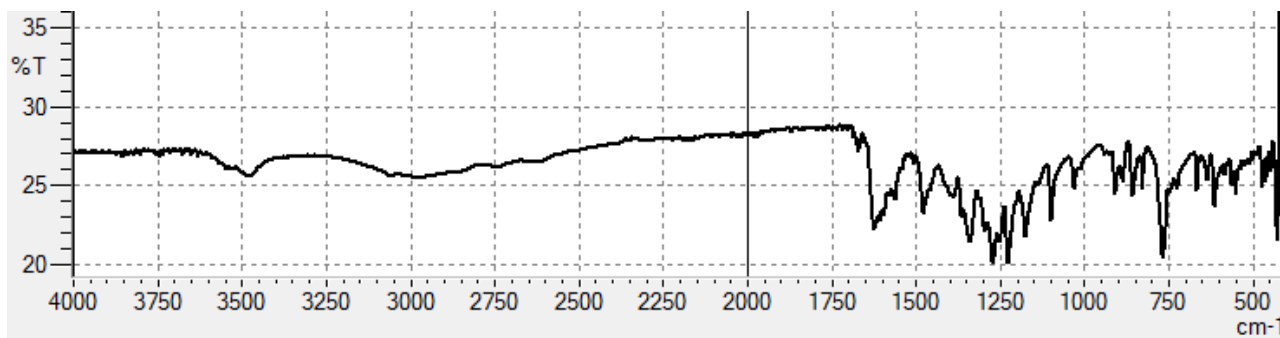
Sử dụng máy quang phổ UV-Vis (Shimadzu). Chọn chế độ Spectrum để quét phổ UV của hợp chất A1.

Phổ UV của hợp chất A1 đo trong MeOH có các peak hấp thụ cực đại ở 225,5 nm, 255,5 nm, 286 nm, 429 nm.

3.3.2 Phổ IR của hợp chất A1

Kết quả đo phổ IR của hợp chất A1 được trình bày trong Hình 7.

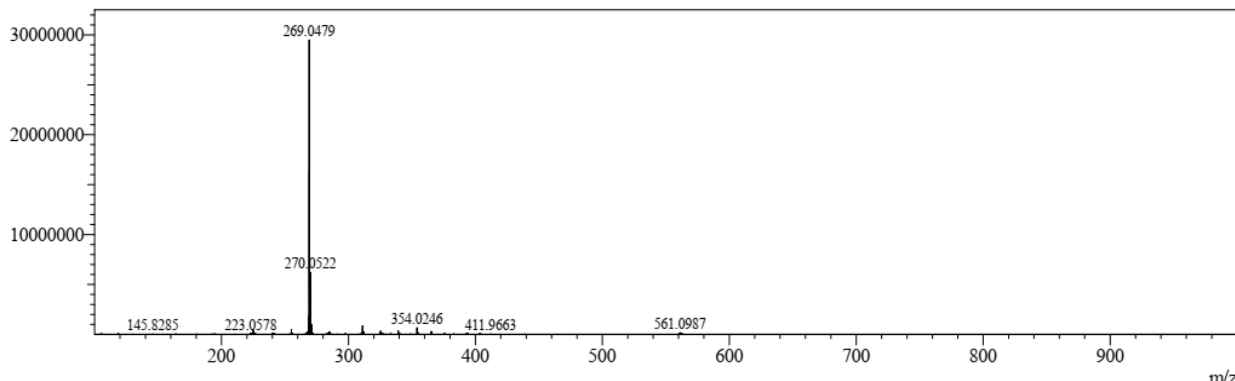
Các băng hấp thụ đặc trưng trên phổ IR của hợp chất A1: ν (cm⁻¹) dao động của nhóm -OH (3458); -CH₂- no (2979); >C=O (1677; 1623); vòng benzen (1476; 1388; 1338).



Hình 8 Phổ IR của hợp chất A1

3.3.3 Phổ MS của hợp chất A1

Trên phổ MS (ES⁻) của hợp chất A1 cho thấy peak m/z : 269,0479 [M-H]⁻, suy ra khối lượng phân tử của hợp chất A1 là 270 (g/mol).



Hình 9 Phổ MS (ES⁻) của hợp chất A1

3.3.4 Phổ NMR của hợp chất A1

Dữ liệu phổ NMR của hợp chất A1 bao gồm phổ ¹H-NMR, ¹³C-NMR, DEPT, HSQC, HMBC, COSY.

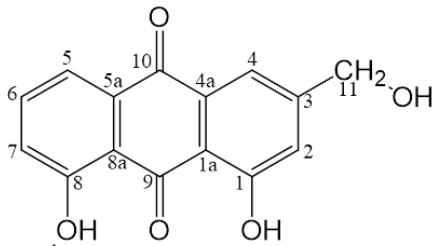
Chi tiết ban đầu ở phổ ¹³C-NMR đo trong CDCl₃ (500 MHz) cho thấy 1 tín hiệu >C=O (δ_C 181,78). Giả sử trường hợp B chỉ có 1 nhóm >C=O ở vị trí C-9 thì ở C-10 phải là nhóm -CH₂ hoặc -CH-OH => điều này không phù hợp với phổ DEPT (không có tín hiệu của CH₂), và MS⁻ = 269Da. Như vậy, tín hiệu δ_C 181,78 là của nhóm >C=O.

Thông tin kết hợp trên các phổ phổ ¹H-NMR, ¹³C-NMR, DEPT, HSQC, HMBC, COSY cho thấy B có 15 tín hiệu carbon bao gồm:

- 5 nhóm methyl thơm (=CH-sp²) (δ_C ; δ_H ppm): (121,54; 7,28*d*; 8,5 Hz); (124,54; 7,36*d*; 13 Hz); (137,05; 7,80*d*; 7,5 Hz); (118,11; 7,32*dd*; 13 Hz, 8,5 Hz); (119,91; 7,67*t*; 8 Hz).
- 1 nhóm -CH₂-O- (63,59 ppm).
- 2 nhóm >C=O (192,77 và 181,78 ppm).
- 2 nhóm carbinol thơm =C-OH: (163,11 và 162,63 ppm).
- 5 C bậc IV: (153,48; 114,72; 133,70; 133,95 và 116,11 ppm).

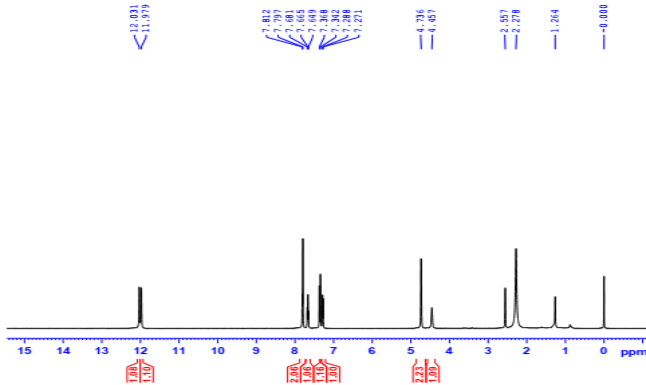
Bảng 3 Bảng so sánh phổ ¹H-NMR và ¹³C-NMR so với aloe-emodin [1,9]

Vị trí C/H	DEPT	B (phân lập được; CDCl ₃ , 500MHz)			Aloe emodin (CDCl ₃)	
		δ_C	δ_H (J, Hz)	HMBC (H→Cn)	δ_H (J, Hz)	δ_C
1	=C-O-	163,11				162,5
2	-CH=	121,54	7,28 <i>d</i> (8.5 Hz)	H2→C8, C4, C8a	7,26	121,2
3	>C=	153,48				152,5
4	-CH=	119,91	7,67 <i>t</i> (8 Hz)	H4→C1, C8, C4a, C5a, C5	7,69	119,9
5	-CH=	118,11	7,32 <i>dd</i> (13 Hz, 8,5 Hz)	H5→C1a, C8a, C8, C8, C4, C8a	7,74	117,7
6	-CH=	137,05	7,80 <i>d</i> (7.5 Hz)	H6→C1a, C8a, C2, C7, C8, C10	7,60	136,9
7	-CH=	124,54	7,36 <i>d</i> (13 Hz)	H2→C1a, C8a, C8	7,22	124,5
8	=C-O-	162,63				162,0
9	>C=O	192,77				192,4
10	>C=O	181,78				182,0
11	-CH ₂ -O-	63,59	4,74 <i>s</i>		4,65	63,1
			4,46 <i>s</i> (11-OH)			
1a	>C=	114,72				114,9
4a	>C=	133,70				133,3
5a	>C=	133,95				133,4
8a	>C=	116,11				115,7

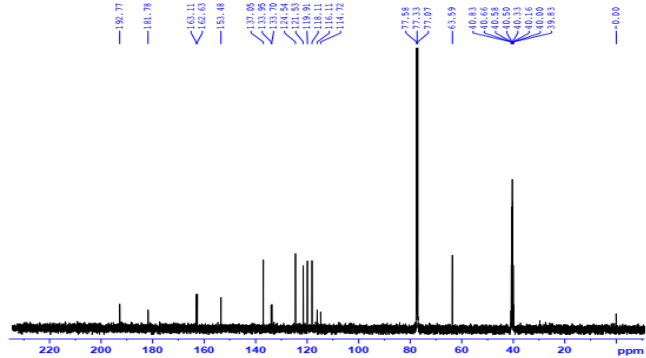


Hình 10 Cấu trúc hóa học của aloe-emodin (hợp chất A1)

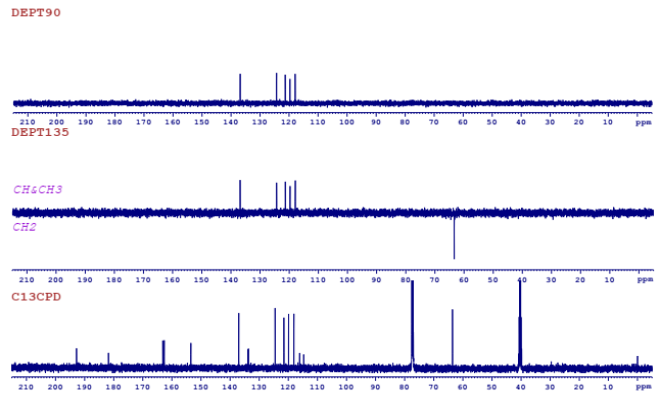
Như vậy, từ các tính chất vật lí, tính chất hóa học, các dữ liệu phổ UV, IR, MS, nmR và so sánh với tài liệu tham khảo có thể khẳng định B chính là aloe-emodin ($C_{15}H_{10}O_5 = 270$).



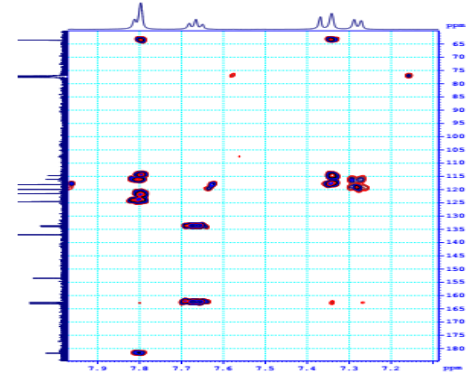
Hình 11 Phổ 1H -NMR của hợp chất A1 (CDCl₃, 500MHz)



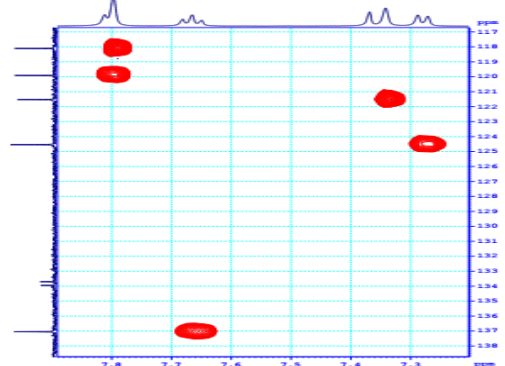
Hình 12 Phổ ^{13}C -NMR của hợp chất A1 (CDCl₃, 125MHz)



Hình 13 Phổ DEPT của hợp chất A1 (CDCl₃, 125 MHz)



Hình 14 Phổ HMBC của hợp chất A1 (CDCl₃, 500 MHz)



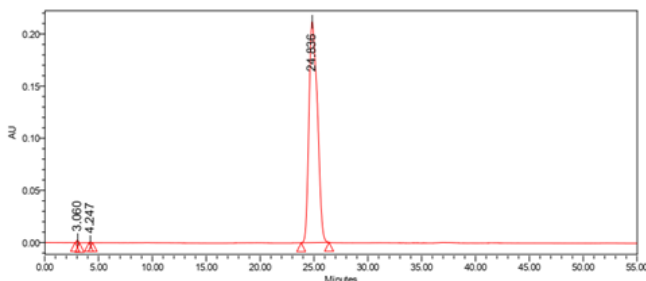
Hình 15 Phổ HSQC của hợp chất A1 (CDCl₃, 500 MHz)

3.4 Xây dựng quy trình định lượng aloe-emodin trong cây Phan tả diệp bằng phương pháp HPLC

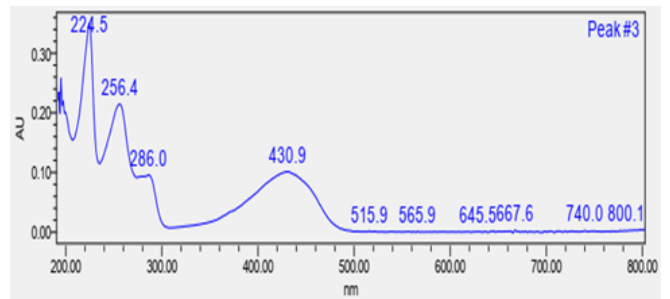
3.4.1 Khảo sát điều kiện HPLC

- Khảo sát bước sóng phát hiện

Tiến hành: Theo mục 2.3.1 Kết quả thu được trình bày ở Hình 15 và Hình 16.



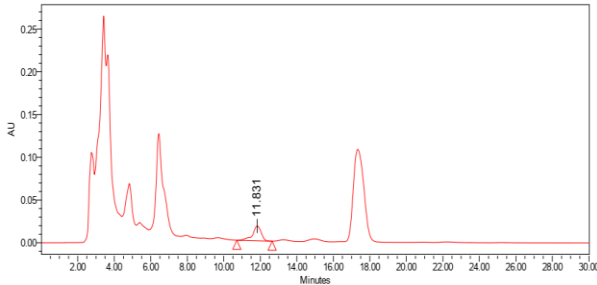
Hình 15 Sắc kí đồ mẫu chuẩn aloe-emodin



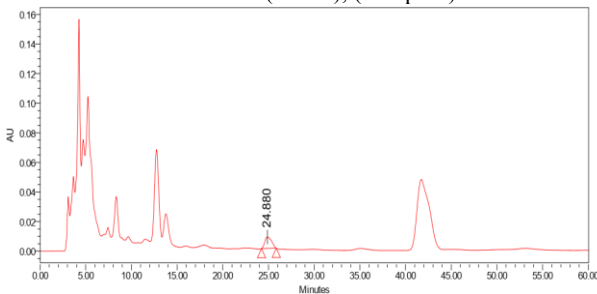
Hình 16 Phổ hấp thụ UV của aloe-emodin

Nhận xét:

Dựa trên phổ UV – Vis, ta nhận thấy: aloe-emodin có peak hấp thụ ở bước sóng 224,5 nm, 256,4 nm, 286 nm và 430,9 nm. Tuy nhiên, aloe-emodin có peak hấp thụ mạnh nhất ở bước sóng 224,5 nm. Như vậy, bước sóng 224 nm được chọn làm bước sóng phát hiện.



Hình 16 Sắc ký đồ mẫu thử với pha động MeOH – acid phosphoric 0.1% (70:30), (1ml/phút)



Hình 18 Sắc ký đồ mẫu thử với pha động MeOH – acid phosphoric 0.1% (60:40), (1ml/phút)

Nhận xét: Tỷ lệ nước acid càng tăng thì thời gian lưu càng kéo dài nhưng các peak tách ra càng ra nhau. Ở tỷ lệ MeOH – nước acid phosphoric 0,1% (70:30) thì peak aloe-emodin tách chưa tốt, độ tinh khiết peak chưa đạt. Ở tỷ lệ MeOH – nước acid phosphoric 0,1% (60:40) các peak tách tốt, độ rộng peak thích hợp, ít kéo đuôi, độ tinh khiết peak aloe-emodin đạt.

Do vậy, chọn pha động là MeOH – nước acid phosphoric 0,1% (60 : 40) để làm pha động.

3.4.3 Qui trình định lượng aloe-emodin trong Phan tả diệp

Bảng 4 Số liệu đường tuyến tính của aloe-emodin

Nồng độ C (µg/ml)	15	35	45	55	150
Diện tích pic(mAU.s)	206797	328100	466877	631801	2019676

Tương quan hồi qui của aloe-emodin được đánh giá tính phù hợp và ý nghĩa các hệ số bằng trắc nghiệm F và t. Kết quả cho thấy phương trình tương thích, hệ số a có ý nghĩa ($p < 0,05$). Vậy phương trình hồi qui là: $y = 14009x$. Vậy có sự phụ thuộc tuyến tính giữa nồng độ và diện tích peak aloe-emodin trong khoảng nồng độ từ 15 đến 150µg/ml.

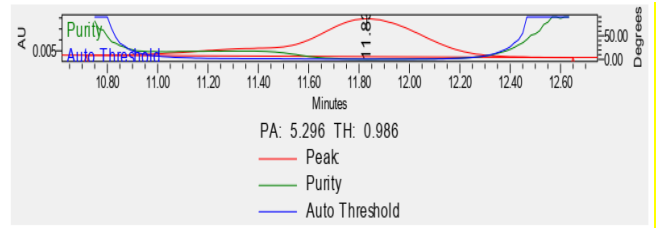
- Khảo sát tính tương thích hệ thống

Tiến hành: Mẫu chuẩn và mẫu thử được chuẩn bị như mục 2.4.1. Triển khai HPLC theo điều kiện đã chọn ở mục 2.3.1, bơm 6 lần liên tiếp cùng một dung dịch mẫu chuẩn. Kết quả được trình bày ở Bảng 4.

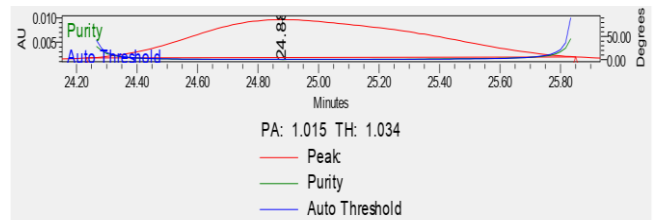
3.4.2 Khảo sát pha động tiến hành HPLC

Mẫu thử được triển khai trên cùng một điều kiện sắc kí với lần lượt các pha động MeOH – nước acid phosphoric 0,1% có tỉ lệ là (60:40); (70:30) với cùng tốc độ dòng 1 ml/phút. Lựa chọn tỉ lệ dung môi dựa trên các tiêu chí đã đặt ra.

Kết quả trình bày ở các Hình 17-20.



Hình 17 Kết quả khảo sát độ tinh khiết peak aloe-emodin, pha động MeOH – acid phosphoric 0,1% (70:30), (1ml/phút)



Hình 19 Kết quả khảo sát độ tinh khiết peak aloe-emodin, pha động MeOH – acid phosphoric 0,1% (60:40), (1ml/phút)

Chuẩn bị mẫu như mục 2.4.1.

Các điều kiện sắc kí tiến hành như mục 2.4.2.

Đánh giá hàm lượng aloe-emodin trong dược liệu được tính theo công thức như mục 2.4.2.

3.4.4 Đánh giá qui trình định lượng aloe-emodin

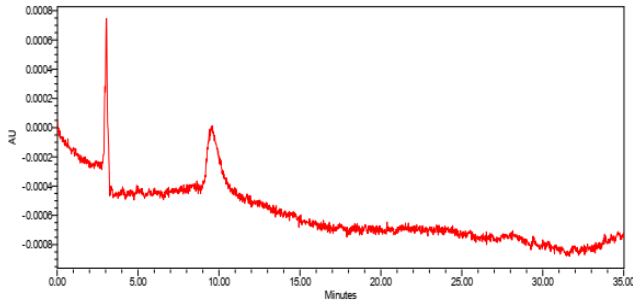
- Khảo sát tính tuyến tính

Tiến hành: Như mục 2.5.1. Triển khai HPLC theo điều kiện ở mục 2.3.1. Khảo sát khoảng tuyến tính aloe-emodin, kết quả trình bày ở Bảng 3 và Hình 21.

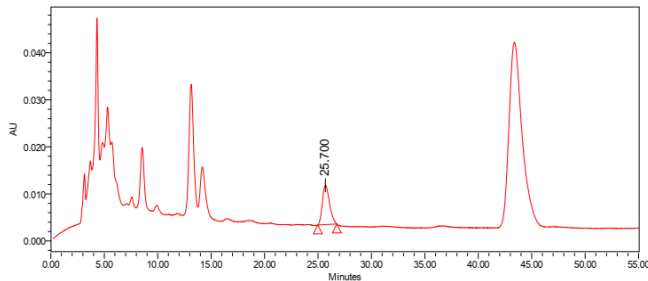
Bảng 5 Kết quả khảo sát tính tương thích hệ thống của phương pháp đối với aloe-emodin

Lần bơm	t_R (phút)	S (mAU.s)	Hệ số kéo đuôi A_s	N_{BK}
1	26,1	406073	1,3	2312
2	25,9	408126	1,3	2352
3	25,6	394622	1,3	2379
4	25,7	411119	1,3	2349
5	25,7	403555	1,3	2419
6	25,6	408098	1,3	2366
TB	25,8	405266	1,3	2363
SD	0.2	5785	0.0	36
RSD (%)	0,76%	1,43%	0,00%	1,50%

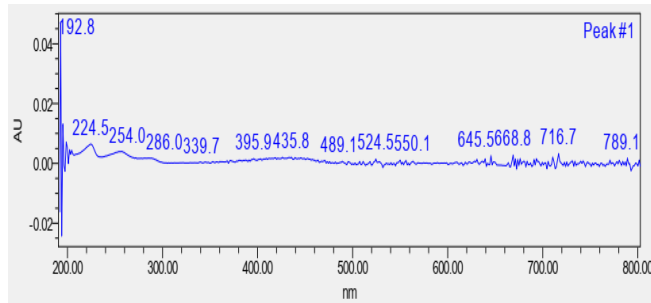
Nhận xét: Độ lệch chuẩn tương đối của các thông số đều nhỏ hơn 2% cho thấy hệ thống HPLC có tính tương thích. Vậy qui trình có tính tương thích hệ thống.



Hình 20 Sắc kí đồ mẫu trắng



Hình 22 Sắc kí đồ mẫu thử



Hình 24 Phổ UV của aloe-emodin trong mẫu chuẩn

Nhận xét:

Độ tinh khiết sắc kí của aloe-emodin trong mẫu chuẩn là 99,69%.

Mẫu trắng không cho peak có thời gian lưu tương đương peak aloe-emodin trong mẫu chuẩn.

Peak chuẩn không cho thành phần nào khác khi sử dụng chức năng kiểm tra độ tinh khiết của peak.

Dung dịch thử phải có thời gian lưu giống peak của mẫu chuẩn aloe-emodin và phổ UV - Vis phải giống với phổ UV của mẫu chuẩn aloe-emodin.

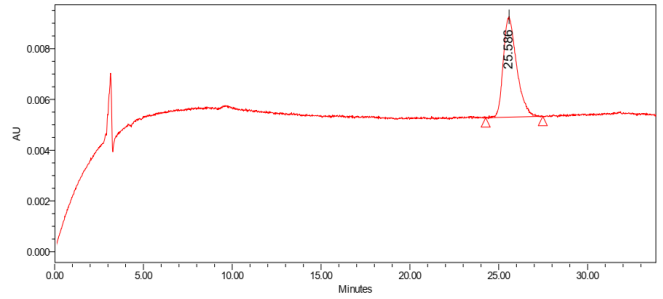
Peak của các dung dịch thử thêm chuẩn aloe-emodin phải có diện tích peak aloe-emodin (hoặc chiều cao) theo tỉ lệ đã thêm vào.

Vậy qui trình có tính đặc hiệu.

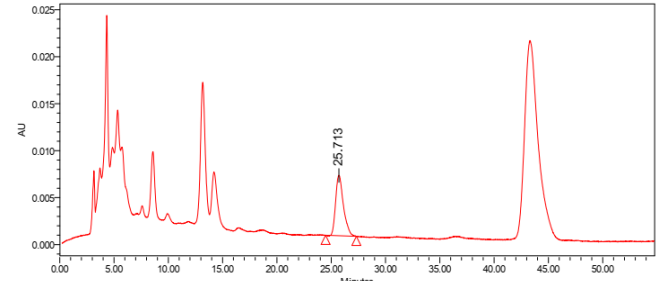
3.4.5 Khảo sát độ lặp lại

- Khảo sát tính đặc hiệu

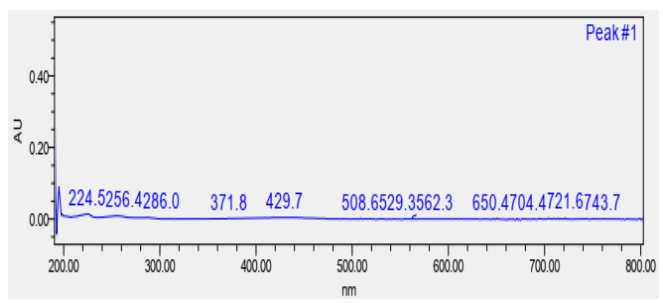
Tiến hành: mẫu trắng, mẫu chuẩn, mẫu thử và mẫu thử thêm chuẩn được chuẩn bị như ở mục 2.5.3. Triển khai HPLC theo điều kiện đã chọn ở mục 2.3.1. Kết quả được trình bày ở các Hình 21-26.



Hình 21 Sắc kí đồ mẫu chuẩn aloe-emodin



Hình 23 Sắc kí đồ mẫu thử thêm chuẩn aloe-emodin



Hình 25 Phổ UV của aloe-emodin trong mẫu thử

Tiến hành: chuẩn bị 6 mẫu thử riêng rẽ như ở mục 2.5.4. Triển khai HPLC theo điều kiện đã chọn ở mục 2.3.1. Kết quả được trình bày ở Bảng 5.

Bảng 6 Kết quả khảo sát độ lặp lại aloe-emodin trong mẫu thử

n	Khối lượng cân (g)	Diện tích peak (mAU.s)	Hàm lượng aloe-emodin (mg/g)
1	1,0003	385431	1,55
2	0,9999	380191	1,53
3	1,0002	386685	1,55
4	0,9998	389117	1,56
5	1,0001	386546	1,55
6	0,9999	381997	1,53
TB			1,55
SD			0,01
RSD (%)			0,854

Nhận xét: Độ lệch chuẩn tương đối của các thông số đều nhỏ hơn 2%.

Vậy qui trình đã xây dựng đạt độ lặp lại.

Tóm tắt kết quả xác định tính tương thích hệ thống và thẩm định qui trình theo bảng 6.

Bảng 7 Tóm tắt kết quả thẩm định qui trình định lượng

	Yêu cầu	Kết quả
Tính tương thích hệ thống	$RSD (t_r, S, N) \leq 2\%$ $0,8 \leq A_s \leq 1,5$	Đạt Đạt
Tính đặc hiệu	Mẫu trắng không có peak tại thời gian lưu của mẫu thử Độ tinh khiết peak $\geq 0,9999$	Đạt
Tuyến tính	$R \geq 0,995$	Đạt
Độ chính xác	$RSD \leq 2\%$	Đạt

3.4.6 Sơ bộ đánh giá hàm lượng aloe-emodin trong cây Phan tả diệp

Tiến hành định lượng aloe-emodin trong cây Phan tả diệp theo mục 2.4.2.

Kết quả được tính theo công thức ở mục 3.4.2.

$$X_{(mg/g)} = \frac{385431}{206797} \times 15 \times \frac{50 \times 100}{1.0003 \times (100 - 9.7)} \times \frac{1}{1000} = 1,55 \text{ mg/g}$$

Nhận xét: Kết quả sơ bộ cho thấy hàm lượng aloe-emodin trong Phan tả diệp khoảng 1,55 mg/g.

4 Kết luận

Nghiên cứu đã đạt được một số kết quả sau:

- Từ 0,5 kg bột lá Phan tả diệp đã chiết được 3,5 g cao ethyl acetat bằng phương pháp ngâm kiệt. Sau khi tinh chế loại bớt chlorophyll thu được 1 g cao ethyl acetat.
- Bằng phương pháp VLC và tinh chế đã tách được A1.
- Xác định được cấu trúc hóa học của hợp chất A1 là aloe-emodin có công thức C₁₅H₁₀O₅ bằng các dữ liệu phổ học như: phổ UV, IR, MS, nMR.
- Xây dựng được qui trình định lượng aloe-emodin trong cây Phan tả diệp bằng HPLC với các điều kiện như sau: HPLC Waters Alliance 2695, đầu dò PDA 2996, cột sắc kí: Inert Sustain C18 (5 μm, 250 mm x 4,6 mm), pha động: MeOH: nước acid phosphoric 0,1% (60:40), thể tích tiêm mẫu 20 μl, tốc độ dòng: 1 ml/phút. Qui trình đã được thẩm định và đạt các yêu cầu về tính tương thích hệ thống (RSD ≤ 2% và 0,8 ≤ A_s 1,5), tính đặc hiệu, tính tuyến tính (phương trình hồi qui y = 14009x và R ≥ 0,995) và độ lặp lại (RSD ≤ 2%).
- Sơ bộ nhận định hàm lượng aloe-emodin trong cây Phan tả diệp khoảng 0,155%.

Lời cảm ơn

Nghiên cứu được tài trợ bởi Quỹ Phát triển Khoa học và Công nghệ - Đại học Nguyễn Tất Thành, mã số đề tài 2019.01.61/HĐ-KHCN

Tài liệu tham khảo

1. A. Takhtajan, (2009), Flowering Plants, pp. 33-37.
2. Đỗ Huy Bích, Đặng Quang Chung, Bùi Xuân Chương, Nguyễn Thượng Đông, Đỗ Trung Đàm, Phạm Văn Hiến, Vũ Ngọc Lộ, Phạm Duy Mai, Phạm Kim Mãn, Đoàn Thị Nhu, Nguyễn Tập, Trần Toàn (2004), “Cây thuốc và động vật làm thuốc ở Việt Nam”, tập II, Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật Hà Nội, tr. 516-518.
3. Tào Duy Cần, Trần Sĩ Viên (2007), “Cây thuốc vị thuốc và bài thuốc Việt Nam”, NXB Hà Nội, tr.170.
4. Đỗ Tất Lợi (1995), “Những cây thuốc và vị thuốc Việt nam”, Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật, Hà Nội, tr.590-592.
5. B Lavanya, A Maheswaran, N Vimal, K Vignesh, KY Uvarani, R Varsha (2018), An overall view of cassia species phytochemical constituents and its pharmacological uses, International Journal of Pharmaceutical Science and Research, Volume 3, Issue , pp. 47-50.
6. <http://www.vn.nfextract.com/info/what-is-the-alo-e-emodin-20072686.html> Ngày truy cập: 21 giờ ngày 02/10/2018.
7. ICH Harmonised Tripartite Guideline (2005), Validation of analytical procedures: text and methodology, Q2 (R1), pp. 1- 13.
8. Ngô Văn Thu, Trần Hùng (2011), “*Dược liệu học*”, tập 1, NXB Y học, tr.323-327.
9. Jian-Wei Dong, Le Cai, Yun-Shan Fang, Wei-He Duan, Zhen-Jie Li, Zhong-Tao Ding (2016), “Simultaneous, Simple and Rapid Determination of Five Bioactive Free Anthraquinones in Radix et Rhizoma Rhei by Quantitative ¹H NMR”, *Journal of the Brazilian Chemical Society*, Print version ISSN 0103-5053 Online version ISSN 1678-4790, vol.27 no.11

Isolation and alo e emodin survey in *Cassia angustifolia* valh, Fabaceace

Le Thi Minh Thu

Faculty of Pharmacy, Nguyen Tat Thanh University

ltmthu@ntt.edu.vn

Abstract *Research context and aims:* *Cassia angustifolia* is a valuable medicinal plant that has been studied by scientists around the world for a long time. For our country, it seems that this plant is still very new, but now it has been planted in Tuy Hoa, Phu Yen and initial researches in the country about this plant have been made. This plant is used to treat stools, constipation, indigestion, lobed lateral abdominal and so on Many studies have demonstrated the laxative of anthraglycoside compounds derived from this plant as aglycol anthranoids (rhein, alo e-emodin, and chrysophanol) and anthraglycosides (rhein monoglycoside, alo e-emodin mono glycoside, sennosid A, B, C, D, G, and alo e-emodin dianthron glycoside). In this scientific article, the pure anthraglycoside compound alo e-emodin was isolated from 2.5 grams of total leaves of *Cassia angustifolia* Vahl. Their chemical structures are elucidated by analytical methods (IR, UV, MS, ¹H-NMR) to determine the alo e-emodin.

Results: Develop a process to extract alo e-emodin from senna; Isolate and determine the structure of alo e-emodin from senna; Develop a process of preliminary quantification of alo e-emodin tracers in senna.

Keywords alo e-emodin, *Cassia angustifolia*, isolate anthraglycoside, chemical structure.