

GÓP PHẦN XÂY DỰNG TIÊU CHUẨN CAO DƯỢC LIỆU TỪ LÁ BÌM BỊP *CLINACANTHUS NUTANS* (BURM.F.) LINDAU

Lê Nguyễn Tú Linh^{1,✉}, Vũ Quang Đạo¹, Bùi Đình Thạch¹, Trịnh Thị Bền¹, Trần Thị Linh Giang¹, Lê Kim Thạch²

¹Viện Sinh học nhiệt đới, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

²Đại học Nông Lâm Thành phố Hồ Chí Minh

✉ Người chịu trách nhiệm liên lạc. E-mail: tulinhshnd90@gmail.com

Ngày nhận bài: 30.7.2019

Ngày nhận đăng: 04.9.2019

TÓM TẮT

Ngày nay cùng với sự phát triển của khoa học kỹ thuật và công nghệ, các cây dược liệu được thu thập và ứng dụng rộng rãi. Cây Bìm bịp (*Clinacanthus nutans* (Burm.f.) Lindau) rất phổ biến ở châu Á, đặc biệt là ở các nước nhiệt đới. Cao chiết lá Bìm bịp được sử dụng rộng rãi trong điều trị các bệnh về da, kháng viêm, kháng virus, ung thư, kháng oxy hoá, hỗ trợ điều trị đái tháo đường, điều hoà miễn dịch, giảm đau, ... Mục đích của nghiên cứu này nhằm xác định được các thông số của cao chiết ethanol lá Bìm bịp bao gồm pH, mất khối lượng do làm khô, độ tro toàn phần, hàm lượng kim loại nặng, giới hạn nhiễm khuẩn, dư lượng thuốc bảo vệ thực vật, định tính và định lượng C-flavone, tạo cơ sở cho việc sử dụng nguồn dược liệu có hiệu quả, góp phần xây dựng tiêu chuẩn cao dược liệu từ lá Bìm bịp. Kết quả các thông số cao chiết ethanol lá Bìm bịp thu nhận được như sau: pH ($5,23 \pm 0,35$), mất khối lượng do làm khô ($15,62 \pm 0,25$ %), độ tro toàn phần ($13,85 \pm 0,98$ %), giới hạn nhiễm khuẩn nằm trong khoảng yêu cầu tiêu chuẩn cao dược liệu, hàm lượng kim loại nặng và dư lượng thuốc bảo vệ thực vật dưới ngưỡng phát hiện, hàm lượng các C-flavone trong cao chiết lần lượt là $0,69 \pm 0,04$ (mg/g) (shaftoside), $0,24 \pm 0,008$ (mg/g) (orientin), $0,015 \pm 0,003$ (mg/g) (isovitexin), không phát hiện sự hiện diện của vitexin trong cao chiết.

Từ khóa: Cao chiết, *Clinacanthus nutans*, C-flavone, HPLC, TLC

MỞ ĐẦU

Thực vật được xem là nguồn chứa hoạt chất tự nhiên vô cùng phong phú (Ramesh *et al.*, 2014). Nguồn tài nguyên này được phân bố khắp nơi trên thế giới, nhưng đa dạng hơn là ở các vùng nhiệt đới và cận nhiệt đới. Hầu hết các cây dược liệu được nghiên cứu các hoạt tính sinh học bao gồm kháng ung thư, kháng khuẩn, kháng viêm, để ứng dụng vào việc điều trị bệnh ở người như ung thư, bệnh tự miễn và nhiễm trùng mạn tính. Nghiên cứu ứng dụng các sản phẩm tự nhiên dựa trên nguồn thực vật là rất quan trọng bởi vì thực vật chứa nhiều hợp chất trị liệu tiềm năng mới.

Cây Bìm bịp (*Clinacanthus nutans*) là loại cây phổ biến ở châu Á (Burkill *et al.*, 1966), đặc biệt là các nước nhiệt đới. Nhiều thành phần hoạt chất trong cây đã được ghi nhận: triterpen, C-glycosyl flavone (shaftoside, vitexin, isovitexin, orientin, isorientin và isomollupentin-7-O- β -D-glucoside)

(Teshima *et al.*, 1997), một số glucoside chứa sulfur (clinacosid A, cinacosid B, clinacosid C, cycloclinacosid A1 và cycloclinacosid A2) (Tu *et al.*, 2014), flavonoid (catechin, kaempferol, luteolin và quercetin), phenolic (caffeic acid và gallic acid) (Huang *et al.*, 2015). Ở Thái Lan, lá cây Bìm bịp đã được sử dụng để điều trị phát ban da, bỏng, viêm niêm mạc và tổn thương do virus herpes simplex (HSV) và virus varicella-zoster (VZV) (Sakdarat *et al.*, 2009). Ở Indonesia, lá Bìm bịp được sử dụng để điều trị bệnh tiểu đường và kiết lỵ (Lusia *et al.*, 2015). Chiết xuất từ lá của cây Bìm bịp đã được sử dụng rộng rãi nhằm mục đích hỗ trợ các phác đồ điều trị cho bệnh nhân ung thư, ngoài ra chiết xuất từ lá Bìm bịp còn được sử dụng để điều trị đái tháo đường, sốt, tiêu chảy và khó tiêu (P'ng *et al.*, 2012). Mặc dù có nhiều báo cáo về tác dụng dược liệu của cao chiết Bìm bịp, nhưng các nghiên cứu để xây dựng tiêu chuẩn nguồn cao dược liệu này còn hạn chế.

Nghiên cứu này được thực hiện nhằm xác định các thông số pH, mất khối lượng do làm khô, độ tro toàn phần, hàm lượng kim loại nặng (Pb, Cd, As, Hg), giới hạn nhiễm khuẩn, dư lượng thuốc bảo vệ thực vật, hàm lượng C-flavone trong cao chiết ethanol lá Bìm bịp, tạo cơ sở cho việc sử dụng nguồn dược liệu có hiệu quả, góp phần xây dựng tiêu chuẩn và quản lý chất lượng nguồn cao chiết dược liệu.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Nguyên liệu

Lá cây Bìm bịp 1 năm tuổi được thu nhận vào tháng 10/2018 tại Vườn lưu trữ và trồng thực nghiệm cây dược liệu - Viện Sinh học nhiệt đới. Mẫu lá được rửa sạch bằng nước, để ráo nước, sấy khô 50°C đến khối lượng không đổi, sau đó được nghiền nhỏ.

Bột mẫu được trích trong dung môi ethanol bằng hệ thống bồn siêu âm, tại 50°C. Dung môi ethanol được thu hồi bằng hệ thống cô quay. Cao thô sau khi thu hồi được lưu trữ ở 4°C để sử dụng cho các thí nghiệm sau.

Hoá chất và chất chuẩn

Các chất chuẩn shaftoside, orientin, vitexin, isovitexin (Sigma, Hoa Kỳ) và hoá chất acetonitrile, ethanol, acetic acid, nước tinh khiết, ethyl acetate, formic acid (Merck, Đức) đạt chuẩn phân tích HPLC.

Xây dựng tiêu chuẩn cao chiết

Cao chiết ethanol lá Bìm bịp được xác định các thông số pH, mất khối lượng do làm khô, độ tro toàn phần, hàm lượng kim loại nặng (Pb, Cd, As, Hg), giới hạn nhiễm khuẩn, dư lượng thuốc bảo vệ thực vật tại Trung tâm Kỹ thuật tiêu chuẩn đo lường chất lượng theo tiêu chuẩn Dược điển Việt Nam V (Bộ Y tế, 2018).

Định tính và định lượng

Các C-flavone: shaftoside, orientin, vitexin và isovitexin được xác định là các hoạt chất marker của cây Bìm bịp (Chelyn *et al.*, 2014, Huang *et al.*, 2015). Do đó, trong báo cáo này chúng tôi tiến hành định tính và định lượng các C-flavone trên.

Dung dịch chuẩn shaftoside, orientin, vitexin và isovitexin (1mg/mL) được chuẩn bị trong methanol, pha loãng thành các nồng độ 5, 10, 20, 50, 100 µg/mL để chuẩn bị xây dựng đường chuẩn bằng HPLC.

Định tính bằng TLC

Sắc ký lớp mỏng được thực hiện trên sắc ký silica gel 60 F254 (Merck, Đức), 5 µL mẫu được chấm vào điểm sắc ký, dùng ethyl acetate : formic acid : acetic acid : water (100:11:11:27 v/v/v/v) làm pha động. Mẫu sau khi được chạy, làm khô và phát hiện màu bằng cách nhúng vào 2-aminoethyl diphenylborinate (1 g) trong methanol (200 mL) và PEG 400 (10 g) trong methanol (200 mL) (Chelyn *et al.*, 2014).

Định lượng bằng phân tích HPLC

Phân tích HPLC được thực hiện trên hệ thống 2995 (Water, Hoa Kỳ), được nối với đầu dò DAD 2996. Phân tích sắc ký sử dụng cột C18 (250 × 4.6 mm, 5 µm), dung môi pha động gồm hỗn hợp 0,8% (v/v) acetic acid (kênh A) và acetonitrile (kênh B), điều kiện 85:15 (v/v) (A:B). Tốc độ dòng 1 mL/phút, thể tích tiêm mẫu 10 µL. Kết quả ghi nhận ở bước sóng 340 nm (Chelyn *et al.*, 2014).

KẾT QUẢ

Xây dựng tiêu chuẩn cao chiết

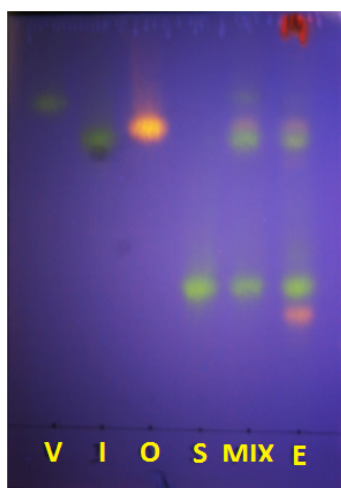
Kết quả trên Bảng 1 cho thấy cao chiết ethanol lá Bìm bịp với các thông số về pH, mất khối lượng do làm khô, độ tro toàn phần, hàm lượng kim loại nặng, giới hạn nhiễm khuẩn, dư lượng thuốc bảo vệ thực vật nằm trong khoảng yêu cầu tiêu chuẩn cao dược liệu theo Dược điển Việt Nam V. Do đó, kết quả này góp phần cung cấp dẫn liệu nhằm xây dựng tiêu chuẩn cao chiết từ lá Bìm bịp.

Định tính các thành phần trong cao chiết lá Bìm bịp bằng TLC

Các điều kiện sắc ký TLC được tối ưu hóa để có thể tách các C-flavone tốt nhất. Pha động có chứa hỗn hợp ethylacetate : formic acid : acetic acid : water (100:11:11:27 v/v/v/v) đã phân tách tốt các hợp chất flavone. Nhằm tăng mức độ hiện diện của các dải sắc ký trong sắc ký đồ, phương pháp đã kết hợp 2 loại thuốc thử là 2-aminoethyl diphenylborinate và PEG 400. Các hợp chất flavone sau khi được nhúng qua thuốc thử được quan sát dưới tia UV 366 nm cho các dải huỳnh quang trên tấm TLC. Hình 1 cho kết quả các hợp chất C-flavone cho các vạch sắc ký màu xanh và vàng với giá trị R_f 0,33 (shaftoside), 0,64 (orientin), 0,68 (isovitexin), không phát hiện sự hiện diện của vitexin trong cao chiết ethanol lá Bìm bịp.

Bảng 1. Các thông số cao chiết Bim bịp.

Thông số	Phương pháp	Kết quả	Giới hạn theo ĐĐVN V
pH	Theo ĐĐVN V, Phụ lục 6.2	5,23 ± 0,35	5,0 - 7,0
Mất khối lượng do làm khô (%)	Theo ĐĐVN V, Phụ lục 9.6	15,62 ± 0,25	Không quá 20%
Độ tro toàn phần (%)	Theo ĐĐVN V, Phụ lục 9.8	13,85 ± 0,98	Không quá 15%
Hàm lượng kim loại nặng (Pb, Cd, As, Hg)	Theo ĐĐVN V, Phụ lục 9.4.8	Dưới ngưỡng phát hiện	Không quá 20 phần triệu
Tổng vi sinh vật hiếu khí (CFU/g)	ISO 4833-1:2013	5.2 x 10 ³	10 ⁴
Tổng số nấm men (CFU/g)	ISO 21527-1:2008	Không có khuẩn lạc mọc trên đĩa	10 ²
Tổng số nấm mốc (CFU/g)	ISO 21527-1:2008	Không có khuẩn lạc mọc trên đĩa	10 ²
Coliform (CFU/g)	ISO 4832:2006	Không có khuẩn lạc mọc trên đĩa	Không có trong 1 gram
E. Coli (CFU/g)	ISO 16649-2:2001	Không có khuẩn lạc mọc trên đĩa	Không có trong 1g
Staphylococcus aureus (CFU/g)	AOAC 2016 (975.55)	Không có khuẩn lạc mọc trên đĩa	Không quá 10 ²
Clostridium perfringens (CFU/g)	ISO 7937:2004	Không có khuẩn lạc mọc trên đĩa	Không quá 10 ²
Bacillus cereus giả định (CFU/g)	ISO 7937:2004	Không có khuẩn lạc mọc trên đĩa	Không quá 10 ²
Salmonella spp/25 mL	ISO 6579-1:2017	Âm tính	Không có trong 10g
Hàm lượng thuốc BVTV clo hữu cơ, cúc tổng hợp, lân hữu cơ, carbamate, triazole (mg/kg)	EN 15662:2018	Dưới ngưỡng phát hiện	Theo ĐĐVN V, phụ lục 12.17
Hàm lượng thuốc BVTV nhóm dithiocarbamat quy về CS ₂ (mg/kg)	QTTN/KT3 059:2018	Dưới ngưỡng phát hiện	Theo ĐĐVN V, phụ lục 12.17
Hàm lượng thuốc trừ cỏ (mg/kg)	QTTN/KT3 079:2018	Dưới ngưỡng phát hiện	Theo ĐĐVN V, phụ lục 12.17
Hàm lượng thuốc BVTV (mg/kg)	EN 5662:2018 (GC/MSMS)	Dưới ngưỡng phát hiện	Theo ĐĐVN V, phụ lục 12.17
Hàm lượng thuốc BVTV (mg/kg)	EN 15662:2018 (LC/MSMS)	Dưới ngưỡng phát hiện	Theo ĐĐVN V, phụ lục 12.17

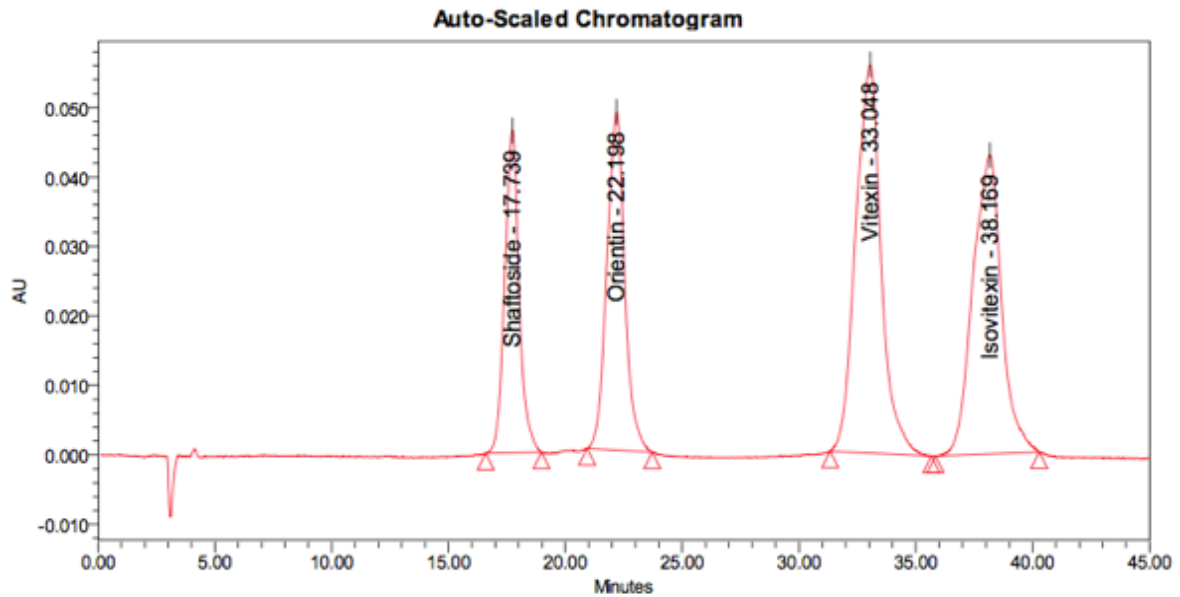


Hình 1. Kết quả TLC cao chiết ethanol lá Bim bịp. V: chuẩn vitexin, I: chuẩn isovitexin, O: chuẩn orientin, S: chuẩn shaftoside, Mix: hỗn hợp chuẩn của shaftoside ($R_f = 0,33$), orientin ($R_f = 0,64$), vitexin ($R_f = 0,66$), isovitexin ($R_f = 0,68$),. E: cao chiết ethanol lá Bim bịp

Định lượng các thành phần trong cao chiết lá Bìm bịp bằng phương pháp HPLC

Bảng 2 cho thấy đường chuẩn shaftoside, orientin, vitexin và isovitexin đã được thiết lập với các điểm chuẩn và các nồng độ nằm trong khoảng từ

5 - 150 ppm, đồ thị cho thấy có sự tương quan tuyến tính giữa nồng độ và độ hấp thụ quang. Các đường chuẩn thu được có hệ số tương quan $R^2 = 0,999$, cho thấy các số liệu thu được để thiết lập đường chuẩn có độ tuyến tính cao.



Hình 2. Kết quả HPLC chuẩn shaftoside, orientin, vitexin và isovitexin.

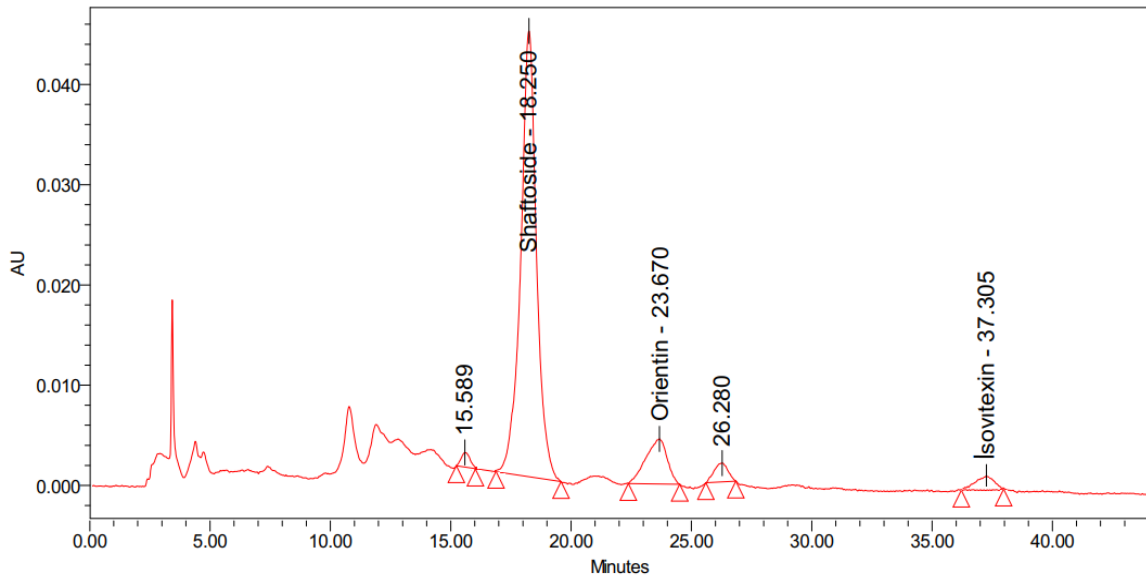
Bảng 2. Phạm vi tuyến tính và phương trình hồi quy thu được qua phân tích định lượng HPLC các chất chuẩn.

	Thời gian lưu (T _R)	Phạm vi tuyến tính (ppm)	Phương trình hồi quy.	R ²
Shaftoside	17,739	5-150	y = 19383,87x + 40365,25	0,999
Orientin	22,198	5-150	y = 20831,31x + 46625,97	0,999
Vitexin	33,048	5-150	y = 40719,21x - 19942,91	0,999
Isovitexin	38,169	5-150	y = 123848,3x - 269795,7	0,999

Bảng 3. Hàm lượng shaftoside, orientin, vitexin và isovitexin trong cao chiết ethanol lá Bìm bịp.

	Hàm lượng (mg/g)
Shaftoside	0,69 ± 0,04
Orientin	0,24 ± 0,008
Vitexin	Dưới ngưỡng phát hiện
Isovitexin	0,015 ± 0,003

Mỗi giá trị trong bảng là trung bình của 3 lần lặp lại ± độ lệch chuẩn (Mean ± SD), n=3.



Hình 3. Kết quả HPLC mẫu cao chiết ethanol lá Bim bip.

Hàm lượng shaftoside, orientin, isovitexin trong cao chiết lá Bim bip được trình bày trong Bảng 3. Kết quả cho thấy shaftoside là hợp chất flavone chiếm phần lớn trong mẫu với hàm lượng $0,69 \pm 0,04$ (mg/g). Các flavone khác có hàm lượng thấp hơn, cao hơn là orientin ($0,24 \pm 0,008$ mg/g), tiếp theo là isovitexin ($0,015 \pm 0,003$ mg/g). Sự hiện diện của vitexin không được phát hiện trong mẫu cao chiết ethanol lá Bim bip.

Trong một nghiên cứu khác của Chelyn (2014), định lượng shaftoside, orientin, vitexin và isovitexin từ lá cây Bim bip được thu thập từ các vùng khác nhau tại Malaysia. Kết quả cho thấy shaftoside được tìm thấy ở tất cả các mẫu từ các vùng khác nhau, giá trị dao động từ 2,55 mmol/g đến 17,43 mmol/g. Các hợp chất khác có hàm lượng thấp hơn hoặc không phát hiện được bao gồm orientin, vitexin, isovitexin. Nguyên nhân có thể do sự khác biệt về khí hậu, vùng đất, khác biệt về thời gian thu hoạch, sấy khô và bảo quản.

Thực vật cùng loài có thể khác nhau đáng kể về hàm lượng các hợp chất thứ cấp trong các điều kiện môi trường khác nhau. Điều này là do chất lượng và số lượng các hợp chất thứ cấp trong cây dược liệu phần lớn bị ảnh hưởng bởi các điều kiện môi trường. Trong một số trường hợp, sự tích lũy chất chuyển hóa thứ cấp bị ảnh hưởng bởi địa lý và điều kiện sinh thái địa phương như lượng mưa, độ ẩm, nhiệt độ, sự thay đổi của nước, sự tiếp xúc với vi sinh vật đất, sự thay đổi độ pH và chất dinh dưỡng của đất. Hơn nữa, các yếu tố môi trường cũng tương tác với yếu tố di truyền của thực vật dẫn đến sự thay đổi hàm lượng

các hợp chất thứ cấp và do đó ảnh hưởng đến chất lượng của cây dược liệu (Sampaio *et al.*, 2016).

KẾT LUẬN

Nghiên cứu đã xác định được các thông số pH, mất khối lượng do làm khô, độ tro toàn phần, giới hạn nhiễm khuẩn, hàm lượng kim loại nặng, dư lượng thuốc bảo vệ thực vật, hàm lượng các C-flavone trong cao chiết ethanol lá Bim bip. Kết quả cho thấy các thông số xác định nằm trong khoảng yêu cầu tiêu chuẩn cao dược liệu theo Dược điển Việt Nam V, điều này sẽ góp phần cung cấp dẫn liệu cho các nghiên cứu khác nhằm mục đích chuẩn hoá nguồn cao dược liệu này.

Lời cảm ơn: Xin chân thành cảm ơn Viện Sinh học nhiệt đới và Sở Khoa học và Công nghệ thành phố Hồ Chí Minh đã tạo điều kiện cho chúng tôi thực hiện nghiên cứu này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Bộ Y tế (2018) *Dược điển Việt Nam (lần xuất bản thứ năm)*. Nhà xuất bản Y học.
- Burkill IH (1966). *A dictionary of the economic products of the Malay Peninsula*. Kuala Lumpur: Governments of Malaysia and Singapore by the Ministry of Agriculture and Cooperatives.
- Chelyn JL, Omar MH, Mohd Yousof NSA, Ranggasamy R, Wasiman M I, Ismail Z (2014) Analysis of flavone c-

- glycosides in the leaves of *Clinacanthus nutans* (Burm. f.) Lindau by HPTLC and HPLC-UV/DAD. *Scientific World J* 2014: 1-6.
- Huang D, Guo W, Gao J, Chen J, Olatunji J (2015) *Clinacanthus nutans* (Burm. f.) Lindau ethanol extract inhibits hepatoma in mice through upregulation of the immune response. *Molecules* 20: 17405-17428.
- Lusia BM, Hasmadi M, Zaleha AZ, Mohd FAB (2015) Effect of different drying methods on phytochemicals and antioxidant properties of unfermented and fermented teas from Sabah snake grass (*Clinacanthus nutans* Lind.) leaves. *Int Food Res J* 22: 661-670.
- P'ng XW, Akowuah GA (2012) Acute oral toxicity study of *Clinacanthus nutans* in mice. *Int J Pharma Sci Res* 3(11): 4202-4205.
- Ramesh A, Sharma SK, Sharma MP, Yadav N, Joshi OP (2014) Inoculation of zinc solubilizing *Bacillus aryabhatai* strains for improved growth, mobilization and biofortification of zinc in soybean and wheat cultivated in Vertisols of central India. *Appl Soil Ecol* 73: 87-96.
- Sakdarat S, Shuyprom A, Pientong C, Ekalaksananan T, Thongchai S (2009) Bioactive constituents from the leaves of *Clinacanthus nutans* Lindau. *Bioorg Med Chem* 17: 1857-1860.
- Sampaio BL, Edradabel R, Batista DCF (2016) Effect of the environment on the secondary metabolic profile of *Tithonia diversifolia*: a model for environmental metabolomics of plants *Scientific Reports* 6: 29265.
- Teshima KI, Kaneko T, Ohtani K, Kasai R, Lhieochaiphant S, Picheansoonthon C, Yamasaki K (1997) C-glycosyl flavones from *Clinacanthus nutans*. *Nat Med* 51(6): 557-560.
- Tu SF, Liu R, Cheng YB, Hsu YM, Du YC, El-Shazly M, Wu YC, Chang FR (2014) Chemical constituents and bioactivities of *Clinacanthus nutans* aerial parts. *Molecules* 19: 20382-20390.

A CONTRIBUTION TO THE ESTABLISHMENT OF EXTRACT STANDARDS FROM THE LEAVES OF *CLINACANTHUS NUTANS* (BURM.F.) LINDAU

Le Nguyen Tu Linh¹, Vu Quang Dao¹, Bui Dinh Thach¹, Trinh Thi Ben¹, Tran Thi Linh Giang¹, Le Kim Thach²

¹Institute of Tropical Biology, Vietnam Academy of Science and Technology

²Nong Lam University of Ho Chi Minh city

SUMMARY

Nowadays, herbs have become a popular form of healthcare. *Clinacanthus nutans* (Burm.f.) Lindau (family Acanthaceae) is popular in Asia, especially in the tropical countries. Extracts of *C. nutans* leaves are widely used to treat diseases of skin, anti-inflammatory, anti-virus, anticancer, antioxidant, antidiabetic, immunomodulatory, wound healing and analgesic activities, etc. This study determined the parameters of ethanol extract of *C. nutans* leaves including pH, total weight loss due to water, total ash content, heavy metal content, microbiological limits, pesticide residual content, presence and contents of C-flavones. The C-flavones such as shaftoside, orientin, isovitexin and vitexin have been found to be major flavonoids in the leaves of this plant. Therefore, we had used a two-step method using thin layer chromatography (TLC) and high pressure liquid chromatography (HPLC) for the rapid identification and quantification of the flavones C-glycosides in ethanol extract *C. nutans* leaves. These results provided useful information for the evaluation of quality of *C. nutans* raw materials and its commercial products. Moreover, that contributed to the establishment of extract standard from the leaves of *C. nutans*. The parameters of the ethanol extract of *C. nutans* leaves were obtained as follows: pH ($5,23 \pm 0,35$), total weight loss due to water ($15,62 \pm 0,25\%$), total ash ($13,85 \pm 0,98\%$), microbiological limits are achieved the requirement of medicinal standards, content heavy metal and residue of pesticide are not detected. Contents of C-flavones: shaftoside ($0,69 \pm 0,04$ mg/g), orientin ($0,24 \pm 0,008$ mg/g), isovitexin ($0,015 \pm 0,003$ mg/g), vitexin were very low or undetectable.

Keywords: C-flavones, *Clinacanthus nutans*, extract, HPLC, TLC.