

NGHIÊN CỨU HÀM LƯỢNG LYCORINE CỦA CÂY SÂM CAU *CURCULIGO ORCHIOIDES* GAERTN. BẰNG KỸ THUẬT HPLC-FD

Bùi Lê Thanh Nhân^{1,2*}, Nguyễn Bảo Hưng³, Nguyễn Thị Thu Hiền¹,
Hoàng Tấn Quảng³, Trương Thị Bích Phượng¹

¹ Trường Đại học Khoa học, Đại học Huế

² Trường Đại học Y Dược, Đại học Huế

³ Viện Công nghệ sinh học, Đại học Huế

TÓM TẮT

Lycorine là một hoạt chất có trong cây sâm cau (*Curculigo orchioides* Gaertn.) được nghiên cứu nhiều trong lĩnh vực dược liệu do cấu trúc hóa học và chức năng sinh học đa dạng, cũng như tác dụng dược lý trên các bệnh khác nhau. Để khảo sát lượng lycorin trong một số mẫu sâm cau tự nhiên trên địa bàn tỉnh Thừa Thiên Huế, chúng tôi đã tiến hành phân tích trên hệ thống HPLC-FD được trang bị đầu dò huỳnh quang có độ nhạy cao cùng với hệ cột tách: RP-18; 150 x 4.6 mm. Pha động gồm dung dịch đệm KH₂PO₄ (15 mM, pH 6.35) hòa trong methanol với tỉ lệ 50:50. Lọc chất đệm qua màng lọc Minissart 0,45 µm (Sartorius, Đức) và khử khí trong bể siêu âm trong 10 phút; tốc độ dòng: 0,8 mL/phút; bước sóng: 285 - 320 nm; nhiệt độ cột: 30°C. Với phương pháp sắc ký này, kết quả thu được các peak tách tốt, thời gian lưu ổn định. Phương pháp có sự phụ thuộc tuyến tính của đáp ứng với nồng độ chất phân tích với hệ số tương quan hồi quy ≥ 0.997 (hay $R^2 \approx 0.9982$) đạt yêu cầu định lượng.

Từ khóa: HPLC-FD, *Curculigo orchioides*, lycorine.

MỞ ĐẦU

Alkaloid là một nhóm các hợp chất thiên nhiên có chứa Nitơ (N) và được kết nối ít nhất với hai nguyên tử carbon (C), hầu hết có tính kiềm đôi khi có tính trung tính hoặc acid. Các nghiên cứu y khoa và thực tiễn đã chứng minh các alkaloid có tác dụng tăng cường hoạt động sinh lý mạnh mẽ, và chúng được sử dụng rộng rãi trong các lĩnh vực y tế như thuốc chữa bệnh. Tuy nhiên, một số alkaloid cũng có thể có tính độc mạnh, ngay cả với liều lượng rất nhỏ (Cao *et al.*, 2013).

Lycorine là thành phần hoạt tính chính của nhiều họ thực vật và là một trong những alkaloid điển hình với lõi nhân pyrrolophenanthridine. Lycorine là alkaloid được phân lập đầu tiên từ *Narcissus pseudonarcissus* vào năm 1877 (Qiuyue *et al.*, 2014). Nghiên cứu dược lý hiện đại cho thấy lycorine không chỉ có khả năng chống viêm, mà còn có khả năng ức chế acetylcholinesterase, sốt rét kháng kiềm, bảo vệ tim mạch và một loạt các tế bào apoptosis gây ra bởi kiềm (Delphine *et al.*, 2010; Cao *et al.*, 2013). Lycorine cũng có hoạt tính kháng virus rộng, điển hình như virus SARS, virus herpes simplex, virus vaccinia, virus Punta Toro và virus sốt Rift Valley (Delphine *et al.*, 2010; Qiuyue *et al.*, 2014; Brintha *et al.*, 2017). Mặt khác, nghiên cứu về lycorine và các dẫn xuất của nó cũng cho thấy sự thúc đẩy tiến độ trong quá trình điều trị các bệnh như ung thư, bệnh Alzheimer, nhiễm virus và các tác hại nghiêm trọng khác đối với sức khỏe con người. Đáng chú ý, lycorine thể hiện nhiều tác dụng dược lý trên nhiều bệnh khác nhau với độc tính rất thấp và tác dụng phụ nhẹ; Cấu trúc hóa học phong phú với nhiều dẫn xuất khác nhau, vì vậy lycorine được xem là một dược chất tiềm năng (Cao *et al.*, 2013; Jiangning *et al.*, 2011; Jia *et al.*, 2018; Peng *et al.*, 2014).

Sâm cau (*Curculigo orchioides* Gaertn.) thuộc Chi Cỏ nóc (*Curculigo*), họ Tỏi voi lùn (Hypoxidaceae). *Curculigo orchioides* Gaertn. (*C. orchioides* Gaertn.) còn được gọi là *Kali musli*, là loài thảo dược đã được người dân ở nhiều nước trên thế giới (như Ấn Độ, Nepal, Philippin...) sử dụng từ lâu như là một thần dược của sự sống (Brintha *et al.*, 2017; Mohammad *et al.*, 2010). Các nghiên cứu, phân tích sàng lọc hóa sinh trên chiết xuất của *C. orchioides* Gaertn cho thấy sự hiện diện của nhiều loại dược chất khác nhau như glycoside, saponin, tannin, protein, acid amine và alkaloid... (Cao *et al.*, 2008; Cao *et al.*, 2016; Yan *et al.*, 2013). Alkaloid cũng được xác định có sự hiện diện trong sâm cau (Rao *et al.*, 1978). Phân tích mẫu rễ củ của cây sâm cau phân bố tại Ấn Độ, các nhà khoa học thấy có sự hiện diện của alkaloid và lycorine (Mohammad *et al.*, 2010). Sử dụng phần mềm ChemDraw để tiến hành phân tích, nhận dạng các thành phần dược chất có trong sâm cau từ nguồn dữ liệu thu thập ở Trung Quốc đã nhận diện được 77 loại dược chất, trong đó có lycorine (Brintha *et al.*, 2017).

Tiềm năng của lycorine đối với cuộc sống con người là rất lớn. Mặc dù vậy, dữ liệu nghiên cứu về dược chất này tại Việt Nam vẫn chưa toàn diện. Do đó, để đóng góp thêm những thông tin, tư liệu khoa học về cây sâm cau như xác định chất lycorine từ cây sâm cau, chúng tôi đã tiến hành nghiên cứu về hàm lượng lycorine ở cây sâm cau trên địa bàn Thừa Thiên Huế.

NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

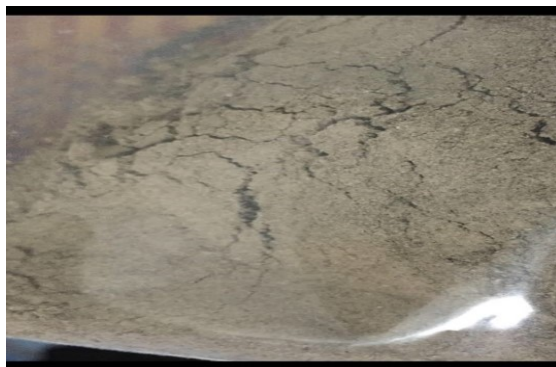
Hóa chất và mẫu vật

Chất chuẩn lycorine (Sigma, L5139 - 20MG) được hòa tan trong methanol với nồng độ 1 mg/mL (1.000 ppm) dưới dạng dung dịch gốc và sau đó được pha loãng với nước khử ion trước khi sử dụng theo các khoảng nồng độ từ 0,1 - 10 ppm để dựng đường chuẩn tương quan giữa lycorine và tính hiệu huỳnh quang của máy HPLC.

Cây sâm cau được thu hái tự nhiên tại vùng núi Ngự Bình, Tỉnh Thừa Thiên Huế, Việt Nam. Toàn bộ cây sâm cau mới thu hái được rửa sạch dưới vòi nước, sau đó tách riêng các bộ phận lá và rễ củ của cây sâm cau thành các phần riêng biệt; thái nhỏ và sấy khô ở 65°C đến trọng lượng không đổi. Các bộ phận của cây được nghiền riêng biệt thành bột mịn để tiến hành thí nghiệm.



Hình 1. Cây sâm cau *Curculigo orchoides* Gaernt



Hình 2. Mẫu sâm cau được nghiền thành bột

Tách chiết với dung môi nước khử ion

Cân 0,2 - 1 g mẫu bột dược liệu trộn với 40 mL nước khử ion dùng làm dung môi chiết với chất chuẩn lycorine nồng độ 1 mg/mL ở các ngưỡng nhiệt độ khác nhau: 4°C, 25°C, 37°C, 65°C trong các thời gian 10 phút, 30 phút, 2 giờ, 5 giờ. Dịch chiết Lycorin được lọc qua màng lọc Minissart 0,45 µm (Sartorius, Đức) để loại bỏ tạp bản có thể gây hư hỏng hay tắc cột HPLC. Sau đó, dịch lọc được pha loãng 20 lần với nước khử ion trước khi tiến hành thí nghiệm HPLC.

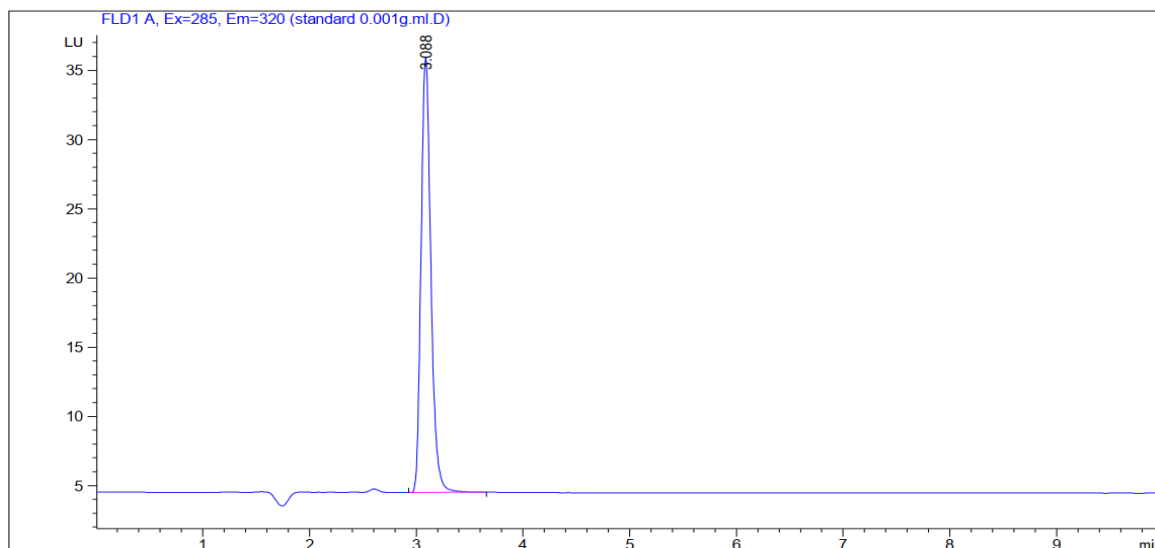
Phân tích HPLC

Mẫu sau khi được phân tích trên hệ thống HPLC của Thermo Electron (Mỹ) với phần mềm ChromQuest. Điều kiện chạy HPLC là: thể tích vào mẫu: 20 µL, pha động: CH₃OH: KH₂PO₄ (15 mM, pH 6.35) (50:50, v/v), tốc độ dòng: 0,8 ml/phút, bước sóng: 285 - 320 nm, thời gian phản ứng: 10 phút, nhiệt độ cột: 30°C.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Phương trình đường chuẩn

Tiến hành phân tích mẫu chuẩn lycorine của cây sâm cau ở nồng độ khác nhau (mẫu chuẩn được pha trong dung dịch methanol). Kết quả S_{peak} thu được sau khi chạy HPLC với thang nồng độ lycorine từ 0,1 - 10 ppm lần lượt là: 28,13409; 61,58854; 201,26494; 1443,55212, cụ thể được trình bày ở bảng 1.

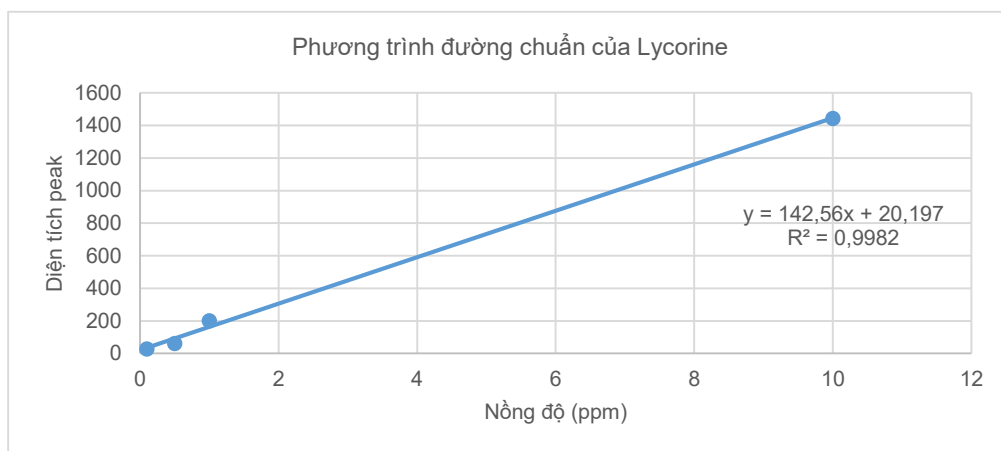


Hình 3. Phổ sắc ký của lycorine chuẩn (0,001 mg/mL)

Bảng 1. Diện tích peak ứng với từng nồng độ lycorine trong chất chuẩn

Nồng độ (ppm)	Diện tích peak (mAu*s)
0,1	28,13409
0,5	61,58854
1,0	201,26494
10	1443,55212

Căn cứ vào kết quả phân tích HPLC của lycorine chuẩn và các nồng độ tương ứng ở trên, chúng tôi xây dựng phương trình hồi quy tuyến tính thể hiện mối quan hệ giữa S_{peak} và nồng độ của lycorine thể hiện trong hình 4.



Hình 4. Đồ thị biểu diễn sự phụ thuộc diện tích peak vào nồng độ của lycorine trong mẫu chuẩn

Hệ số tương quan $R = 0,9982$ cho thấy mối tương quan thuận rất chặt chẽ giữa hàm lượng lycorine và diện tích peak với độ tin cậy cao. Phương trình đường chuẩn mô tả mối quan hệ giữa hàm lượng lycorine và diện tích peak là:

$$y = 142,56x + 20,197$$

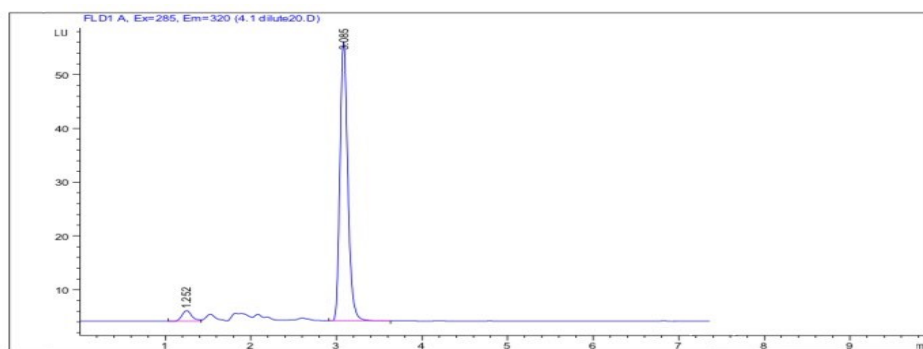
Trong đó: x: hàm lượng lycorine có trong mẫu.

y: diện tích peak.

Dựa vào kết quả phân tích HPLC của mẫu chuẩn lycorine được pha loãng ở các nồng độ khác nhau, ta thấy nồng độ ảnh hưởng tới diện tích peak và thời gian lưu của mẫu phân tích trên các cột sắc kí. Nồng độ càng cao thì hàm lượng lycorine càng lớn, nồng độ nhỏ sẽ kéo dài thời gian lưu.

Ảnh hưởng của nhiệt độ đến hàm lượng lycorine

Các dịch chiết lycorine từ mẫu sâm cau thu ngoài tự nhiên được sử dụng với hàm lượng 0,2 g/40 mL (mẫu/nước khử ion). Kết quả thu được, trình bày ở hình 5.



Hình 5. Phổ sắc ký của lycorine của củ sâm cau ở 4°C/30 phút với 0.2 mg/40 mL (mẫu thử/ nước), pha loãng 20 lần

Từ phương trình đường chuẩn của mẫu chuẩn ở bảng 1 chúng tôi tiến hành khảo sát hàm lượng lycorine của mẫu chiết ở các nhiệt độ khác nhau, kết quả được trình bày ở bảng 2.

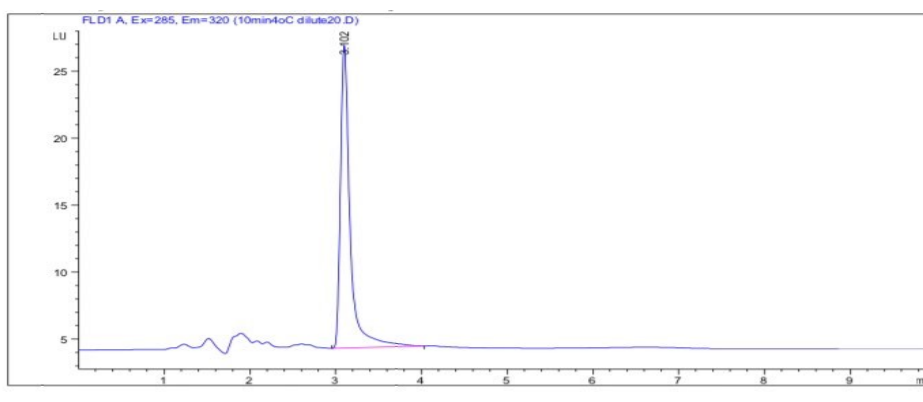
Bảng 2. Kết quả khảo sát sự ảnh hưởng của nhiệt độ lên hàm lượng lycorine có trong mẫu rễ củ

Nhiệt độ khảo sát (°C)	Diện tích peak (mAu*s)	Nồng độ (ppm) tính từ phương trình hồi quy
4°C	331,791	2,19
25°C	194,240	1,22
37°C	134,54	0,8
65°C	90,35	0,5

Qua các kết quả phân tích và số liệu thống kê ở bảng 2 cho thấy, ở nhiệt độ 4°C/30 phút hàm lượng lycorine cao nhất đạt 2,19 (ppm). Vậy nhiệt độ chiết tốt nhất là 4°C. Nhiệt độ chiết mẫu càng cao thì hàm lượng lycorine chiết được càng thấp.

Ảnh hưởng của thời gian đến hàm lượng lycorine (ở 4°C)

Từ kết quả khảo sát về nhiệt độ tối ưu để thu được dịch chiết lycorine, chúng tôi tiếp tục tiến hành đánh giá ảnh hưởng của yếu tố thời gian đối với hàm lượng lycorine từ mẫu sâm cau thu hái tự nhiên. Sử dụng dịch chiết với hàm lượng 1 g/40 mL (mẫu/nước khử ion) và phân tích HPLC, kết quả thu được cho thấy ứng với các mốc thời gian 10 phút, 30 phút, 120 phút, 300 phút thì diện tích peak của lycorine lần lượt là: 176,838; 49,917; 5,10841; 4,47382. Kết quả được trình bày cụ thể ở bảng 3.



Hình 6. Phổ sắc ký của Lycorine của củ sâm cau ở 4°C/10 phút với 1 g/40 mL (mẫu thử/ nước), pha loãng 20 lần

Bảng 3. Kết quả khảo sát sự ảnh hưởng của thời gian lên hàm lượng lycorine có trong mẫu rễ củ sâm cau

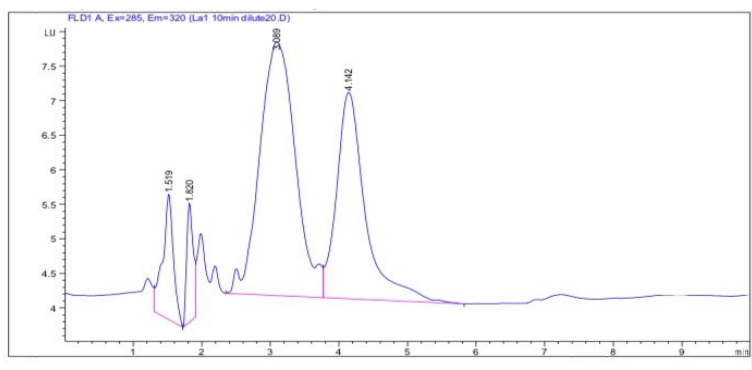
Thời gian (4°C)	Diện tích peak	Nồng độ (ppm) tính từ phương trình hồi quy
10 phút	176,838	1,09
30 phút	49,917	0,21
2 giờ	5,10841	0
5 giờ	4,47382	0

Qua các kết quả phân tích và số liệu thống kê ta thấy, hàm lượng lycorine cao nhất đạt 1,09 (ppm) khi thực hiện trong thời gian 10 phút ở 4°C. Vậy thời gian chiết tối ưu nhất là 10 phút ở nhiệt độ 4°C.

Khảo sát hàm lượng lycorine ở các bộ phận khác nhau sâm cau

Các dịch chiết lycorine từ lá của mẫu sâm cau thu ngoài tự nhiên được sử dụng với hàm lượng 1g/40mL (mẫu/nước khử ion) ở nhiệt độ 4°C trong 10 phút. Kết quả thu được, trình bày ở hình 7.

Qua kết quả phân tích HPLC về hàm lượng lycorine ở lá cây sâm cau ở điều kiện 4°C/ 10 phút thì có diện tích peak bằng 133,294 (mAu*s), tương ứng với nồng độ lycorine bằng 0,79 (ppm). Vậy hàm lượng lycorine ở lá cây sâm cau là tương đối thấp. Kết hợp với kết quả phân tích hàm lượng lycorine ở củ cây sâm cau (bảng 3) thì ta thấy hàm lượng lycorine ở lá cây sâm cau thấp hơn hàm lượng lycorine ở củ cây sâm cau (lycorine ở lá: 0,79ppm, lycorine ở củ: 1,09 ppm).



Hình 7. Phổ sắc ký của lycorine của lá sâm cau ở 10 phút/4°C với 1 g/40 mL (mẫu thử/ nước), pha loãng 20 lần

Bảng 4. Khảo sát hàm lượng lycorine ở lá của cây sâm cau

Thời gian / Nhiệt độ	Diện tích peak	Nồng độ (ppm) tính từ phương trình hồi quy
10 phút / 4°C	133,294	0,79

Kết luận

Như vậy, phương pháp HPLC dùng đầu dò huỳnh quang kết hợp với cột C18 cho độ nhạy phát hiện mẫu cao, độ lặp lại tốt, thích hợp cho việc định lượng hàm lượng lycorine. Bên cạnh đó, với kết quả thu được cũng chứng minh trong dịch chiết nước của sâm cau thì hàm lượng lycorine ở củ lớn hơn hàm lượng lycorine ở lá sâm cau.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Brintha S, Rajesh S, Renuka R, Santhanakrishnan VP and Gnanam R (2017). Phytochemical analysis and bioactivity prediction of compounds in methanolic extracts of *C. orchioides* Gaertn. *J Pharma Orch Phytochem* 6(4): 192-197.

Cao DP, Zheng YN, Qin LP, Han T, Zhang H, Rahman K, Zhang QY (2008). *C. orchioides*, a traditional Chinese medicinal plant, prevents bone loss in ovariectomized rats". *Maturitas* 59(4):373-380.

Cao S, Tian S, Bai M, Liu S, Jia J and Miao M (2016). Effects of *C. orchioides* total glucosides in mouse perimenopause model of related organization and organs morphology. *Bangladesh J Pharmacol Soc* 11: 72-81.

Cao Z, Yang P, Zhou Q (2013). Multiple biological functions and pharmacological effects of lycorine. *Sci Chin Chem* 56(10): 1382-1391.

Delphine L, Decaestecker C, Véronique M, Jacques D, Alexander K, Robert K, Antonio E, Pottier L. (2010). Lycorine and its Derivatives for Anticancer Drug Design. *Mini-Rev Med Chem* 10: 41-50.

- Jia S, Tao Z, Zheng C, Ni Z, Hua W, Li L, Zexia W, Haotian Y, Meichun H (2018). Lycorine inhibits glioblastoma multiforme growth through EGFR suppression. *J Exp Clin Cancer Res* 37(1): 157-175.
- Jiangning L, Yajun Y, Yanfeng X, Chunmei M, Chuan Q, Lianfeng Z (2011). Lycorine reduces mortality of human enterovirus 71-infected mice by inhibiting virus replication. *Virology* 438: 483-491.
- Mohammad A, Ankush K, Atul K, Mujahidul I (2010). *In-vivo* antinociceptive activity of different fractions of *C. orchioides* Gaertn. Rhizome. *Pharmacol* 2: 238-245.
- Peng W, Lin-Feng L, Qing-Yin W, Lu-Qing S, Pei-Yong S, Zheng Y (2014). Anti-Dengue-Virus Activity and Structure-Activity Relationship Studies of Lycorine Derivatives. *Chem Med Chem* 9: 1522-1533.
- Qiuyue X, Ying C, Zilin C (2014). Sensitive and simultaneous determination of active components in *Lycoris radiata* and rat plasma by HPLC with fluorescence detection. *Anal Meth* 6: 8979-8985.
- Rao R, Ali N, Reddy MN (1978). Occurrence of both sapogenins and alkaloid lycorine in *Curculigo orchioides*. *Ind J Pharma Sci* 40(3): 104-105.
- Yan N, Xin D, Yongjing H, Tingting Y, Ting H, Khalid R, Luping Q, Qiaoyan Z (2013). Medicinal plants of genus *Curculigo*: traditional uses and a phytochemical and ethnopharmacological review. *J Ethnopharmacol* 147(3): 547-563.

ASSESSING THE LYCORINE CONTENT OF *CURCULIGO ORCHIOIDES* GAERTN. BY HPLC-FD

Bui Le Thanh Nhan^{1,2*}, Nguyen Bao Hung³, Nguyen Thi Thu Hien¹,
Hoang Tan Quang³, Truong Thi Bich Phuong¹

¹ University of Sciences, Hue University

² University of Medicine and Pharmacy, Hue University

³ Laboratory of Cells - Institute of Biotechnology, Hue University

SUMMARY

Lycorine, an active ingredient in *Curculigo orchioides* Gaertn., has been studied in the field of medicinal herbs due to its diverse chemical structure and biological functions, as well as the pharmacological effects on various diseases. To investigate the lycorine content of naturally samples *Curculigo orchioides* Gaertn. at Thua Thien Hue province, we performed an analysis on an HPLC system equipped with a fluorescence probe, and the stationary phase use column of RP - 18; 150 x 4.6 mm. The mobile phase was mixture of KH₂PO₄ buffer (15 mM, pH 6.35) with methanol (ratio 50:50, v/v). Filter buffer through a Minissart 0.45 μm filter membrane (Sartorius, Germany) and degass in an ultrasonic bath for 10 minutes; Flow rate: 0.8 ml/min; Wavelength: 285-320 nm; Column temperature: 30°C.

With this procedure, the results obtained the good separation peak, stable retention time. Our method has linear dependence of response to analyte concentration with regression correlation coefficient ≥ 0.997 (or $R^2 \approx 0.9982$) meeting quantitative requirements.

Keywords: HPLC-FD, *Curculigo orchioides*, lycorine.

* Author for correspondence: Tel: + 84-982061324; Email: bltnhan@huemed-univ.edu.vn