

**PHÂN TÍCH HÀM LƯỢNG PHYLLANTHIN, HYPOPHYLLANTHIN
TRONG CÂY DIỆP HẠ CHÂU (*Phyllanthus urinaria* L.) BẰNG SẮC KÝ LỎNG
GHÉP NỐI KHỐI PHỔ (LC-MS/MS)**

Đoàn Mạnh Dũng¹, Nguyễn Hữu Tùng², Nguyễn Đình Luyện³

¹Khoa Hóa học, Trường Đại học Khoa học, Đại học Huế

²Khoa Y Dược, Đại học Quốc gia Hà Nội

³Khoa Hóa học, Trường Đại học Sư phạm, Đại học Huế

Email: doanmanhdung151090@gmail.com

Ngày nhận bài: 25/10/2018; ngày hoàn thành phần biện: 7/12/2018; ngày duyệt đăng: 10/12/2018

TÓM TẮT

Bằng các phương pháp sắc ký, chúng tôi phân lập được hợp chất phyllanthin và hypophyllanthin từ cây Diệp hạ châu (*Phyllanthus urinaria* L.). Cấu trúc của hợp chất này được xác định bằng các phương pháp phổ ¹H-NMR, ¹³C-NMR và ESI-MS). Hợp chất này được tinh sạch (độ tinh khiết > 99,8%) bằng hệ thống sắc ký lỏng điều chế, được sử dụng để làm chất chuẩn phân tích hàm lượng phyllanthin và hypophyllanthin trong cây Diệp hạ châu bằng sắc ký lỏng ghép nối khối phổ (LC-MS/MS). Chúng tôi xây dựng được chương trình sắc ký sử dụng hệ thống LC-MS/MS như sau: pha tĩnh cột sắc ký EC-C₁₈ (100 × 2,1 mm, 2,7 μm), pha động: MeOH (A) – hỗn hợp dung dịch chứa 10 mM ammonium acetate và 0,1% HCOOH (B) theo tỉ lệ 60:40 (v/v), tốc độ dòng: 0,3 ml/phút thể tích tiêm mẫu: 1 μl; nhiệt độ buồng cột: 35 °C; thời gian phân tích 10 phút, dung môi pha mẫu: MeOH-H₂O = 60:40 (v/v). Điều kiện khối phổ bao gồm nguồn ion hóa ESI, loại ion dương, nhiệt độ nguồn ion hóa là 300 °C, chế độ chạy MRM trong đó phyllanthin với ion sơ cấp m/z 436,0 và ion thứ cấp m/z 151,0, hypophyllanthin với ion sơ cấp m/z 261,0 và ion thứ cấp m/z 231,0. Phương pháp phân tích chúng tôi sử dụng tối ưu hóa cho quá trình phân tích 2 hợp chất hypophyllanthin và phyllanthin trong cây Diệp hạ châu với độ tuyến tính, độ đúng và độ chính xác cao.

Từ khóa: *Phyllanthus urinaria*, phyllanthin, hypophyllanthin, LC-MS/MS.

1. MỞ ĐẦU

Diệp hạ châu thuộc chi *Phyllanthus* rất phổ biến ở Việt Nam với số lượng phong phú. Cho đến nay người ta đã phát hiện chi *Phyllanthus* L. (Euphorbiaceae) có

700 loài, gồm từ những cây thân thảo đến cây thân bụi hay gỗ nhỏ, phân bố chủ yếu ở vùng nhiệt đới và cận nhiệt đới [1-3]. Thành phần hóa học và tác dụng của chi này rất phong phú và đa dạng, là nguồn dược liệu đầy tiềm năng. Các nghiên cứu cho thấy chất phyllanthin và hypophyllanthin là những thành phần chính của cây *Phyllanthus urinaria* L. [1], [4]. Các chất này có tác dụng làm gia tăng lượng glutathione có vai trò bảo vệ và phục hồi tế bào gan, làm giảm men gan do ức chế men ADN polymerase của virus viêm gan B [4]. Vì vậy, Diệp hạ châu có tác dụng rất tốt để hỗ trợ điều trị viêm gan, viêm gan B, gan nhiễm mỡ, xơ gan, giải độc men gan do uống rượu, bia ... Chính vì vậy nghiên cứu xác định hàm lượng của hypophyllanthin và phyllanthin trong cây Diệp hạ châu có ý nghĩa quan trọng trong việc xác định chất lượng dược liệu Diệp hạ châu và các chế phẩm thuốc từ Diệp hạ châu.

2. THỰC NGHIỆM

2.1. Thiết bị

Hệ thống sắc ký lỏng hiệu năng cao LC-MS/MS Agilent Technologies 6420 Triple Quad, hệ thống sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC-DAD) Agilent 1290, cột sắc ký EC-C18 (100 × 2,1 mm, 2,7 μm), hệ thống sắc ký lỏng điều chế (Agilent 218 Purification System), cột sắc ký ZORBAX SB-C₁₈ (100 × 21,2 mm, 5,0 μm), máy đo điểm nóng chảy Stuart SMP3 (Sanyo, Nhật Bản). Phổ cộng hưởng từ hạt nhân được đo trên máy JEOL ECX 400 (Jeol, Nhật Bản), cột sắc ký các loại, cân phân tích OHAUS PA214 độ chính xác 0,0001g, bể siêu âm, máy ly tâm Vortex, màng lọc 13 mm, 0,22 μm (PTFE).

2.2. Hóa chất

Các dung môi dùng trong chiết xuất, phân lập như methanol (MeOH), chloroform (CHCl₃), ethyl acetate (EtOAc), butanol (BuOH) đều đạt tiêu chuẩn công nghiệp và được chưng cất lại trước khi dùng. Dung môi dùng cho phân tích methanol (Merck, Đức), acetonitrile (Merck, Đức), nước cất, acid formic (Merck). Sắc ký cột (CC) sử dụng silica gel (Kieselgel 60, 70-230 mesh và 20-400 mesh, Merck), Sắc ký lớp mỏng (TLC) sử dụng bản mỏng nhôm tráng sẵn silica gel 60 F₂₅₄ (1,05554; Merck). Phát hiện chất bằng đèn tử ngoại ở hai bước sóng 254 nm và 365 nm hoặc dùng thuốc thử hơi I₂.

2.3. Nguyên liệu thực vật

Diệp hạ châu (*Phyllanthus urinaria* L.) được thu hái ở Nghệ An, Việt Nam vào tháng 10 năm 2017. Các mẫu này được TS. Đỗ Ngọc Đài – Trường Đại học Kinh tế kỹ thuật Nghệ An định danh tên khoa học và tiêu bản được lưu trữ tại Viện Hóa học Các hợp chất thiên nhiên, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

2.4. Chiết xuất và phân lập

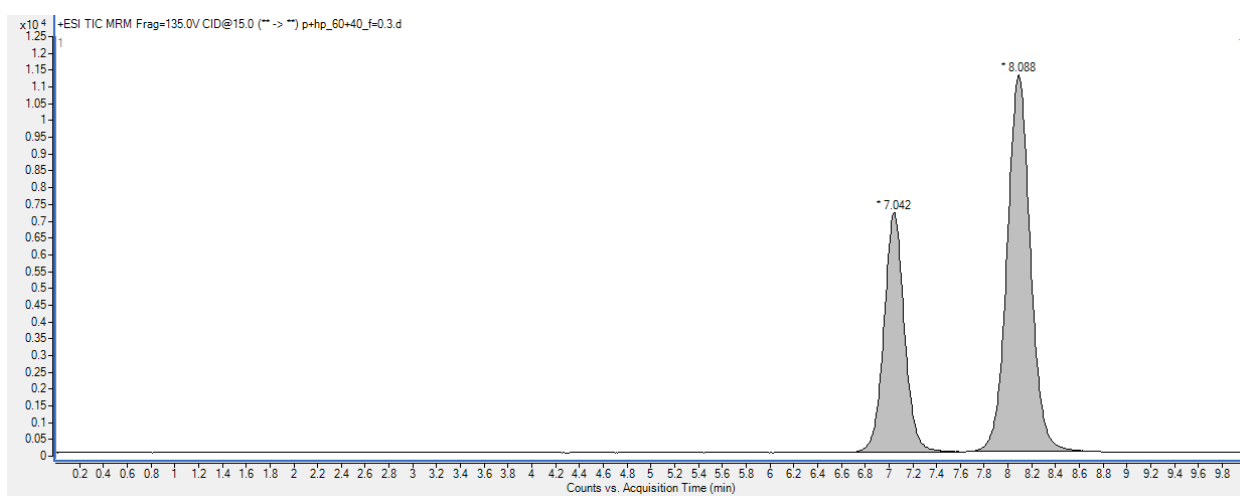
Phần trên mặt đất cây Diệp hạ châu (2,0 kg), được phơi khô, xay nhỏ và ngâm chiết siêu âm với methanol ở 50°C trong 3 giờ (lặp lại 3 lần). Dịch chiết được cất thu hồi dung môi thu được cao methanol (502 gam). Phân bố cao methanol trong nước, sau đó chiết lỏng/lỏng lần lượt với cloroform và n-butanol. Cất thu hồi dung môi thu được các cặn dịch chiết lần lượt là 255g và 95g. Cao chloroform được phân tách bằng sắc ký cột nhồi silicagel, dung môi rửa giải là chloroform/methanol (99/1; 40/1; 30/1; 20/1) thu được 10 phân đoạn chính. Phân đoạn 4 (12 g) tiến hành sắc ký cột nhồi silicagel, chloroform:methanol (10:1) thu được chất hypophyllanthin 450 mg. Phân đoạn 5 (22,3 g) tiến hành sắc ký cột nhồi silicagel, chloroform:methanol (8:1) thu được phyllanthin 302 mg. Hai hợp chất này được tinh sạch (độ tinh khiết > 99,8%) bằng hệ thống sắc ký lỏng điều chế (Agilent 218 Purification System) pha tĩnh cột sắc ký ZORBAX SB-C₁₈ (100 x 21,2 mm, 5,0 μm), pha động: MeOH-H₂O trong thời gian 5 phút với tỉ lệ 70:30 (v/v), tốc độ dòng 15,0 mL/phút, thể tích tiêm mẫu 100,0 μL; dung môi pha mẫu: MeOH-H₂O (70:30, v/v).

Hypophyllanthin: Tinh thể hình kim, màu trắng, nhiệt độ nóng chảy 128-130°C; ESI-MS m/z: 431 [M+H]⁺ (tương ứng với công thức phân tử C₂₄H₃₀O₇); ¹H-NMR (500 MHz, CD₃OD): δ 6,45 (1H, s, H-2), 2,78 (2H, dd, 16,0, 4,5Hz, H-7), 2,61 (1H, dd, J = 15,5, 11,0, H-7), 1,85 (1H, m, H-8), 3,18 (1H, dd, J = 9,5, 6,2, H-9), 3,27 (1H, dd, J = 9,5, 4,2, H-9), 6,63 (1H, d, J = 2,0, H-2'), 6,80 (1H, d, J = 8,0, H-5'), 6,65 (1H, dd, J = 8,5, 2,0, H-6'), 3,95 (1H, d, J = 7,5, H-7'), 1,77 (1H, m, H-8'), 3,16 (1H, dd, J = 9,5, 3,5, H-9'), 3,29 (1H, dd, J = 9,5, 1,0, H-9'), 3,78 (3H, s, 3-OCH₃), 3,25 (3H, s, 9-OCH₃), 3,67 (3H, s, 3'-OCH₃), 3,70 (3H, s, 4'-OCH₃), 3,21 (3H, s, 9'-OCH₃), 5,69 (1H, d, J = 1,4, O-CH₂-O), 5,71 (1H, d, J = 1,4, O-CH₂-O); ¹³C-NMR (100 Hz, CD₃O D): δ 131,7 (C-1), 106,7 (C-2), 141,7 (C-3), 132,8 (C-4), 146,5 (C-5), 114,5 (C-6), 32,7 (C-7), 36,6 (C-8), 74,7 (C-9), 137,9 (C-1'), 112,1 (C-2'), 148,3 (C-3'), 147,0 (C-4'), 111,6 (C-5'), 119,9 (C-6'), 41,1 (C-7'), 44,7 (C-8'), 71,6 (C-9'), 56,1 (3-OCH₃), 58,3 (9-OCH₃), 55,4 (3'-OCH₃), 55,5 (4'-OCH₃), 58,4 (9'-OCH₃), 100,6 (O-CH₂-O).

Phyllanthin: tinh thể hình kim màu trắng; nhiệt độ nóng chảy 94-96°C; ESI-MS m/z 421 [M+H]⁺ (tương ứng với công thức phân tử C₂₄H₃₆O₆). ¹H-NMR (500 MHz, CD₃OD): δ 6,63 (1H, br s, H-2), 6,76 (1H, d, J = 8,0, H-5), 6,65 (1H, br d, J = 8,0, H-6), 2,64 (1H, m, H-7), 2,05 (1H, m, H-8), 3,31 (1H, m, H-9), 6,63 (1H, br s, H-2'), 6,76 (1H, d, J = 8,0, H-5'), 6,65 (1H, br d, J = 8,0, H-6'), 2,64 (1H, m, H-7'), 2,05 (1H, m, H-8'), 3,31 (1H, m, H-9'), 3,82 (3H, s, 3-OCH₃), 3,87 (3H, s, 4-OCH₃), 3,31 (3H, s, 9-OCH₃), 3,82 (3H, s, 3'-OCH₃), 3,87 (3H, s, 4'-OCH₃), 3,31 (3H, s, 9'-OCH₃). ¹³C-NMR (100 Hz, CD₃OD): δ 133,7 (C-1), 112,3 (C-2), 148,8 (C-3), 147,3 (C-4), 111,2 (C-5), 121,3 (C-6), 34,7 (C-7), 40,9 (C-8), 72,7 (C-9), 133,7 (C-1'), 112,3 (C-2'), 148,8 (C-3'), 147,3 (C-4'), 111,2 (C-5'), 121,3 (C-6'), 34,7 (C-7'), 40,9 (C-8'), 72,7 (C-9'), 55,8 (3-OCH₃), 55,7 (C-4'), 58,9 (9-OCH₃), 55,8 (3'-OCH₃), 55,7 (4'-OCH₃), 58,9 (9'-OCH₃).

2.5. Điều kiện, các thông số tối ưu cho phân tích

Trên cơ sở phân tích tài liệu tham khảo [5], [7] và khảo sát về thành phần pha động, tỷ lệ dung môi, tốc độ dòng, chúng tôi xây dựng được chương trình sắc ký sử dụng hệ thống UPLC Agilent 1290 Infinity như sau: pha tĩnh cột sắc ký EC-C₁₈ (100 x 2,1 mm, 2,7 μm), pha động: MeOH (A) – dung dịch chứa 10 mM ammonium acetate và 0,1% HCOOH (B) theo tỉ lệ 60:40 (v/v), tốc độ dòng: 0,3 ml/phút thể tích tiêm mẫu: 1 μl; nhiệt độ buồng cột: 35 °C; thời gian phân tích 10 phút, dung môi pha mẫu: MeOH-H₂O = 60:40 (v/v). Điều kiện khối phổ bao gồm nguồn ion hóa ESI, loại ion dương, nhiệt độ nguồn ion hóa là 300 °C, chế độ chạy MRM, phyllanthin với ion sơ cấp m/z 436,0 và ion thứ cấp m/z 151,0, hypophyllanthin với ion sơ cấp m/z 261,0 và ion thứ cấp m/z 231,0.



Hình 1. Sắc ký đồ của chuẩn hypophyllanthin và phyllanthin

2.6. Chuẩn bị mẫu phân tích

Cân chính xác một lượng cây Diệp hạ châu sau khi đã được nghiền nhỏ (từ 0,03-0,04 g), thêm 20 ml dung dịch MeOH-H₂O = 70:30 (v/v) rồi tiến hành chiết siêu âm ở 40°C trong 2 giờ, thu được dịch chiết (lặp lại 3 lần). Cô quay thu hồi dung môi dưới áp suất thấp thu được cao chiết sau đó được định mức bằng dung môi MeOH-H₂O - 60:40 (v/v) trong bình định mức 100 ml. Sau đó, lọc qua màng 0,22 μm, cuối cùng bơm vào hệ thống LC-MS/MS [6], [7].

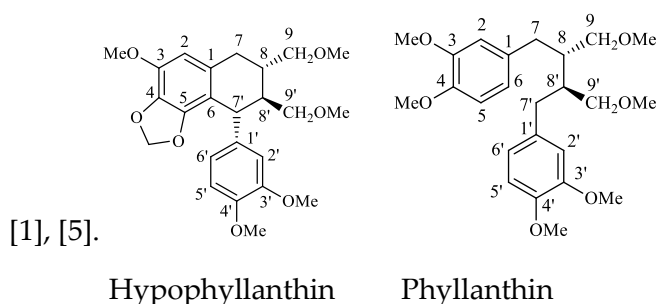
3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Xác định cấu trúc

Hypophyllanthin: Tinh thể hình kim, màu trắng, nhiệt độ nóng chảy 128-130°C. Phổ khối lượng ESI của hợp chất 1 cho peak ion m/z 431 [M+H]⁺ tương ứng với công thức phân tử C₂₄H₃₀O₇. Dữ liệu phổ ¹H-NMR cho thấy hợp chất có một nhóm metylen gắn với hai oxygen (-OCH₂O-), ba nhóm metylen, 2 nhóm metin và năm nhóm metoxyl.

Phổ ^{13}C -NMR, DEPT cho các tín hiệu tương ứng với 24 carbon bao gồm 5 nhóm $-\text{OCH}_3$, 4 nhóm $-\text{CH}_2$, 7 nhóm $-\text{CH}$, 8 nhóm carbon bậc bốn. Từ các số liệu kết hợp so sánh với tài liệu tham khảo cho ta hợp chất đó là hypophyllanthin. Hợp chất này đã được phân lập từ cây *Phyllanthus niruri* và *Phyllanthus urinaria* [5], có hoạt tính kháng virus viêm gan B mạnh [1], [5].

Phyllanthin: tinh thể hình kim màu trắng, nhiệt độ nóng chảy $94\text{--}96^\circ\text{C}$. Phổ ^1H -NMR cho tín hiệu 17 proton của một nhóm metin, hai nhóm metylen và 3 nhóm metoxy. Phổ ^{13}C -NMR, DEPT cho các tín hiệu tương ứng với 12 carbon bao gồm 3 nhóm $-\text{OCH}_3$, 2 nhóm $-\text{CH}_2$, 4 nhóm $-\text{CH}$, còn lại là carbon bậc bốn. Nó là một ligand gồm 2 mảnh giống nhau ghép lại và công thức phân tử là $\text{C}_{24}\text{H}_{34}\text{O}_6$. So sánh với tài liệu tham khảo ta khẳng định hợp chất này là phyllanthin. Hợp chất này đã được phân lập từ cây *Phyllanthus niruri* và *Phyllanthus urinaria* [5], có hoạt tính kháng virus viêm gan B mạnh



Hình 2. Cấu trúc hóa học của 2 hợp chất chính trong cây Diệp hạ châu.

3.2. Đánh giá phương pháp phân tích

a. Kiểm tra độ tinh khiết

Sử dụng phương pháp tổng diện tích peak tính toán độ tinh khiết của mẫu phân tích. Tiến hành sắc ký theo chương trình trên, phân tích các peak phụ (tạp chất) trên sắc ký đồ và tính độ tinh khiết bằng hệ thống sắc ký lỏng hiệu năng cao (UPLC-DAD) Agilent 1290, pha tĩnh: cột sắc ký EC-C18 (100 x 2,1 mm, 2,7 μm), pha động: MeOH (A) – dung dịch chứa 10 nM ammonium acetate và 0,1% HCOOH (B) theo tỉ lệ 60:40 (v/v), tốc độ dòng: 0,3 ml/min; thể tích tiêm mẫu: 10 μl ; nhiệt độ buồng cột: 30°C ; bước sóng phát hiện: 230 nm; thời gian phân tích 10 phút; dung môi pha mẫu: MeOH:H₂O - 60:40 (v/v). Kết quả cho thấy phyllanthin và hypophyllanthin tinh chế được có độ tinh khiết cao (>99,8%) phù hợp làm chất chuẩn phân tích, chất chuẩn đối chiếu. Các peak phụ (tạp chất) đều tách rõ ràng khỏi peak chất phân tích.

b. Tính đặc hiệu

Tiến hành sắc ký các loại mẫu trắng và mẫu phân tích hypophyllanthin và phyllanthin theo chương trình khảo sát trên, ghi lại sắc ký đồ, xác định thời gian lưu và phổ UV của peak hypophyllanthin và phyllanthin trong sắc ký đồ. Kết quả cho thấy trên sắc ký đồ của dung môi pha mẫu không xuất hiện peak ở trong khoảng thời gian

lưu tương ứng với thời gian lưu của hypophyllanthin ($t_R = 7,042$ phút) và phyllanthin ($t_R = 8,088$ phút (Hình 1)). Vậy phương pháp phân tích hypophyllanthin và phyllanthin xây dựng được có độ đặc hiệu cao.

c. Tính thích hợp của hệ thống

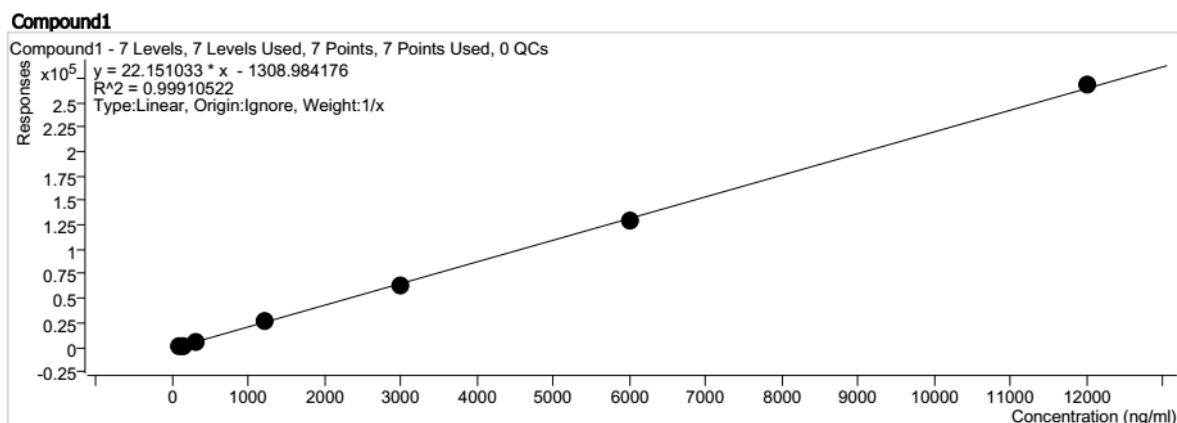
Tiến hành bom 6 lần dung dịch chuẩn phyllanthin (nồng độ 10 ppm) và hypophyllanthin (nồng độ 15 ppm) ghi lại các sắc ký đồ và xác định giá trị thời gian lưu, diện tích peak. Kết quả cho thấy độ lệch chuẩn tương đối của các thông số đều thấp hơn 2 %. Điều đó cho thấy các điều kiện sắc ký đã lựa chọn và hệ thống sắc ký LC-MS/MS sử dụng là ổn định, phù hợp cho phép phân tích định tính, định lượng phyllanthin, hypophyllanthin trong mẫu cây Diệp hạ châu.

Bảng 1. Kết quả khảo sát tính thích hợp của hệ thống sắc ký

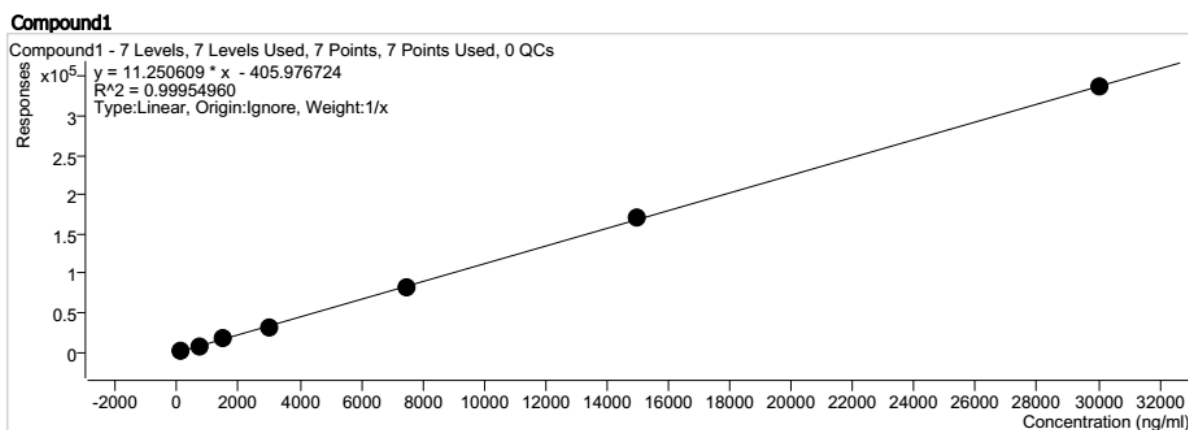
Thí nghiệm	Hypophyllanthin			Phyllanthin		
	Thời gian lưu	Diện tích peak	Hệ số đối xứng	Thời gian lưu	Diện tích peak	Hệ số đối xứng
1	7,042	262,6327	0,98	8,088	300,7612	1,01
2	6,889	263,1130	1,01	7,997	301,1024	0,99
3	6,903	262,3435	1,02	7,976	300,5615	0,99
4	6,887	261,9856	1,01	8,003	301,2019	1,02
5	6,901	260,9899	0,98	7,999	302,0199	0,98
6	6,890	264,1241	0,99	7,989	299,9845	1,03
TB	6,918	262,5315	0,99	8,008	300,9386	1,00
RSD (%)	0,8	0,3	1,8	0,5	0,19	1,64

d. Độ tuyến tính

Chuẩn bị các dung dịch chuẩn có nồng độ 0,05-30 $\mu\text{g/ml}$ (ppm) bằng cách pha loãng từ dung dịch chuẩn gốc ban đầu với các hệ số pha loãng khác nhau. Tiến hành sắc ký các dung dịch chuẩn (mỗi dung dịch tiêm 3 lần), ghi lại sắc ký đồ và xác định diện tích peak tương ứng. Xác định phương trình hồi quy tuyến tính, hệ số tương quan tuyến tính giữa nồng độ chất phân tích và diện tích peak tương ứng trên sắc ký đồ bằng phương pháp bình phương tối thiểu. Kết quả phương trình hồi quy tuyến tính thu được với hypophyllanthin và phyllanthin có hệ số xác định và hệ số tương quan rất cao, độ tuyến tính chặt, khoảng tuyến tính rộng.



Hình 3. Đồ thị biểu diễn đường chuẩn của Phyllanthin



Hình 4. Đồ thị biểu diễn đường chuẩn của Hypophyllanthin

e. Giới hạn phát hiện (LOD) và giới hạn định lượng (LOQ)

Giới hạn phát hiện: tiến hành pha loãng mẫu phân tích phyllanthin và hypophyllanthin đến khi tín hiệu của chất phân tích trên sắc ký đồ thu được có tỷ lệ S/N (chiều cao tín hiệu/nhiều) đạt khoảng 2-3. Nồng độ xác định được là giới hạn phát hiện (LOD) của phương pháp ứng với từng chất. Giới hạn định lượng (LOQ) của phương pháp được xác định dựa trên giới hạn phát hiện: $LOQ = 3,3 \times LOD$. Kết quả phân tích cho thấy phương pháp có giới hạn phát hiện với phyllanthin và hypophyllanthin lần lượt là 0,10 ppb và 0,15 ppb, tương ứng có giới hạn định lượng lần lượt là 0,33 ppb và 0,50 ppb.

g. Độ đúng

Độ đúng của phương pháp phân tích phyllanthin, hypophyllanthin được xác định thông qua độ thu hồi (Recovery) theo công thức: $Re v(\%) = \frac{C_2 - C_1}{C_0} \times 100$. Trong đó, C_0 là nồng độ chất phân tích được thêm vào trong mẫu thật; C_1 là nồng độ chất phân tích trong mẫu thật; C_2 là nồng độ chất phân tích trong mẫu thật đã được thêm chuẩn. Độ

thu hồi của phương pháp cũng được xác định bằng cách tiến hành xử lý lần lượt các mẫu phân tích (lặp lại 3 lần) theo quy trình ở mục 2.6 rồi thêm một lượng xác định chất chuẩn sau đó tiến hành phân tích ba lần lặp lại, tính kết quả trung bình. Kết quả độ thu hồi của phương pháp được nêu ra ở Bảng 1, 2.

Bảng 2. Kết quả đánh giá độ đúng của phương pháp xác định phyllanthin trong mẫu nghiên cứu

Mẫu	Nồng độ phyllanthin trong mẫu (mg)	Nồng độ phyllanthin thêm vào mẫu (mg)	Nồng độ phyllanthin sau khi thêm vào mẫu (mg)	Độ thu hồi, % (Rev, %)
Lá	0,0439	0,01	0,0537	98,0
Thân	0,0050	0,005	0,0102	104,0
Rễ	0,0039	0,005	0,0087	96,0

Bảng 3. Kết quả đánh giá độ đúng của phương pháp xác định hypophyllanthin trong mẫu nghiên cứu

Mẫu	Nồng độ hypophyllanthin trong mẫu (mg)	Nồng độ hypophyllanthin thêm vào mẫu (mg)	Nồng độ hypophyllanthin sau khi thêm vào mẫu (mg)	Độ thu hồi, % (Rev, %)
Lá	0,2748	0,01	0,2847	99,0
Thân	0,0166	0,01	0,0268	102,0
Rễ	0,0029	0,005	0,0077	96,0

Từ kết quả tính toán ở bảng 1, 2 cho thấy, phương pháp xác định hàm lượng phyllanthin và hypophyllanthin có độ thu hồi đạt từ 96,0 đến 104,0%, phù hợp yêu cầu của AOAC. Vậy, phương pháp LC-MS/MS đạt được độ đúng tốt, nên có thể áp dụng để phân tích phyllanthin và hypophyllanthin trong mẫu cây Diệp hạ châu.

3.3. Phân tích phyllanthin, hypophyllanthin trong mẫu cây Diệp hạ châu

Hàm lượng phyllanthin, hypophyllanthin trong các mẫu cây Diệp hạ châu được xác định với các điều kiện tối ưu và theo phương pháp đường chuẩn đã xây dựng ở mục 2.5 và 2.6. Áp dụng đường chuẩn hồi quy tuyến tính xây dựng được và phương pháp nội suy để phân tích hàm lượng phyllanthin, hypophyllanthin trong các mẫu dược liệu, kết quả nghiên cứu được trình bày ở bảng 3, 4. Từ các kết quả ở bảng 3, 4 cho thấy, phương pháp LC-MS/MS khi phân tích các mẫu cây Diệp hạ châu đạt độ lặp lại tương đối tốt. Như vậy, phương pháp phân tích có độ lặp lại cao, phù hợp để xác định phyllanthin, hypophyllanthin trong mẫu cây Diệp hạ châu.

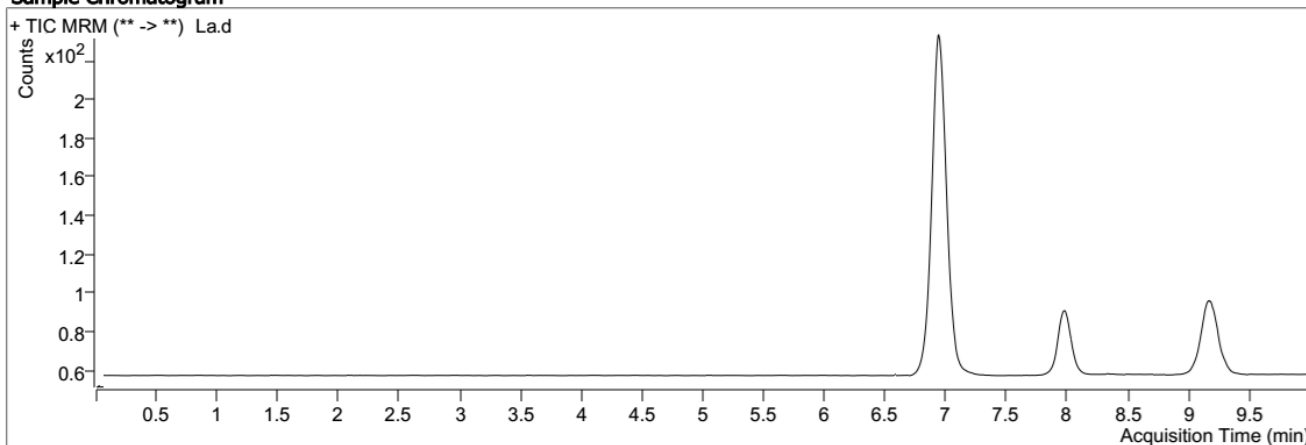
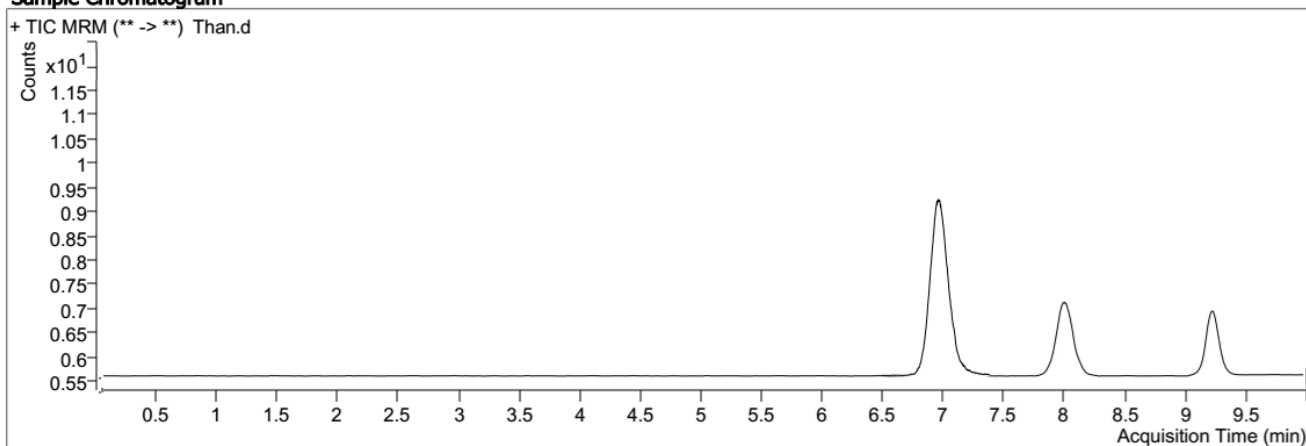
Bảng 4. Kết quả phân tích hàm lượng phyllanthin

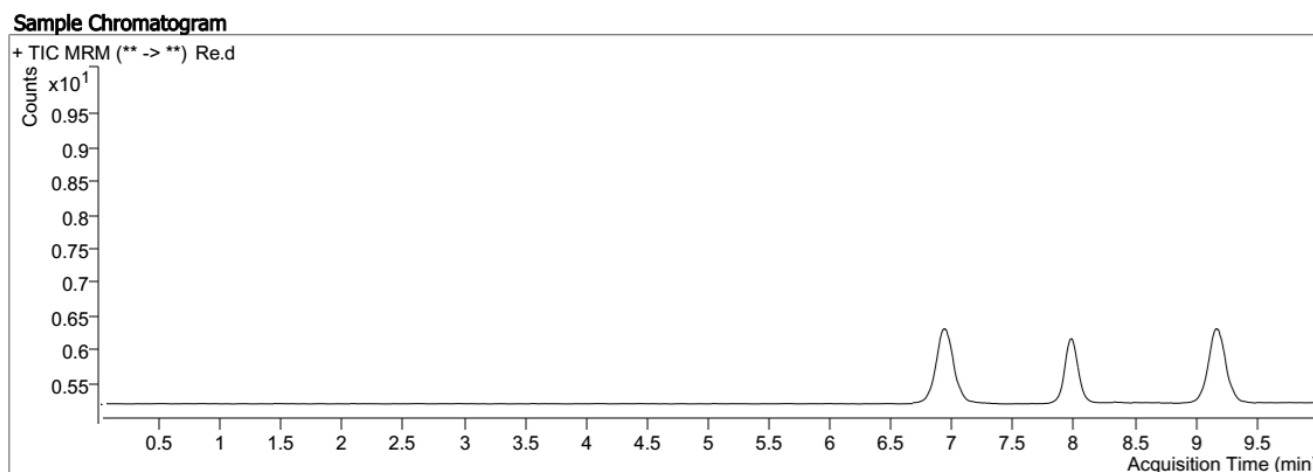
Mẫu	Hàm lượng phyllanthin đo được, mg/g					1/2.RSDH (%)
	Lần 1	Lần 2	Lần 3	Trung bình ± SD	RSD (%)	
Lá	0,0439	0,0436	0,0443	0,0439±0,0004	0,8	4,5

Thân	0,0050	0,0048	0,0054	0,0051±0,0003	6,0	6,3
Rễ	0,0039	0,0037	0,0041	0,0039±0,0002	5,1	6,5

Bảng 5. Kết quả phân tích hàm lượng hypophyllanthin

Mẫu	Hàm lượng hypophyllanthin đo được, mg/g					1/2.RSDH (%)
	Lần 1	Lần 2	Lần 3	Trung bình ± SD	RSD (%)	
Lá	0,2748	0,2744	0,2751	0,2748±0,0004	0,1	3,4
Thân	0,0166	0,0163	0,0171	0,0167±0,0004	2,4	5,2
Rễ	0,0029	0,0030	0,0027	0,0029±0,0002	5,3	6,8

Sample Chromatogram*a. Sắc ký đồ của mẫu lá Diệp hạ châu***Sample Chromatogram***b. Sắc ký đồ của mẫu thân Diệp hạ châu*



c. Sắc ký đồ của mẫu rễ Diệp hạ châu

Hình 5. Sắc ký đồ của các mẫu phân tích

4. KẾT LUẬN

Bằng các phương pháp sắc ký, chúng tôi phân lập được hợp chất phyllanthin, hypophyllanthin từ cây Diệp hạ châu (*Phyllanthus urinaria* L.). Cấu trúc của hợp chất này được xác định dựa trên cơ sở các số liệu phổ công hưởng từ hạt nhân ¹H-NMR, ¹³C-NMR và phổ khối lượng ESI-MS). Hợp chất này được tinh sạch (độ tinh khiết > 99,8%) bằng hệ thống sắc ký lỏng điều chế (Agilent 218 Purification System), được sử dụng để làm chất chuẩn phân tích hàm lượng phyllanthin, hypophyllanthin trong các mẫu cây Diệp hạ châu bằng phương pháp sắc ký lỏng ghép nối khối phổ (LC-MS/MS). Kết quả cho ta thấy hàm lượng phyllanthin, hypophyllanthin tập trung chủ yếu ở lá, trong đó hàm lượng hypophyllanthin cao hơn phyllanthin. Cần tiếp tục nghiên cứu phân lập và xác định hàm lượng các hợp chất có hoạt tính sinh học khác từ cây Diệp hạ châu để đánh giá đầy đủ nhất cho cây Diệp hạ châu và các chế phẩm thuốc có nguồn gốc từ cây Diệp hạ châu.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1]. Đỗ Huy Bích (2004), *Cây thuốc và động vật làm thuốc ở Việt Nam*, Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật, Hà Nội.
- [2]. Võ Văn Chi (2012), *Từ điển cây thuốc Việt Nam (Bộ mới)*, Nhà xuất bản Y học, Hà Nội.
- [3]. Phạm Hoàng Hộ (1992), *Cây cỏ Việt Nam*, Nhà xuất bản Trẻ, Hà Nội.
- [4]. Calixto J. B., Santos A. R., Cechinel F. V., Yunes R. A. (1998), A review of the plants of the genus *Phyllanthus*: their chemistry, pharmacology, and therapeutic potential, *Med. Res. Rev.*, 18(4), 225-58.

- [5]. Vandana S., Manju S., Richa M., Karuna S., Ram K. V., Madan M. G., Anil K. G., Suman P. S. K. (2008), Separation and quantification of lignans in *Phyllanthus* species by a simple chiral densitometric method, *J. Sep. Sci.*, 31, 47-55.
- [6]. Tripathi A. K., Verma R. K., Gupta A. K., Gupta M. M., Khanuja S. P., (2006), Quantitative determination of phyllanthin and hypophyllanthin in *phyllanthus* species by high-performance thin layer chromatography, *Phytochem. Anal.* 17(6): 394–397
- [7]. Fan H., Zhang W., Wang J., Lv M., Zhang P., Zhang Z., Xu F. (2015), HPLC–MS/MS method for the determination of four lignans from *Phyllanthus urinaria* L. in rat plasma and its application, *Bioanalysis*, 7(6), 701–712.

ISOLATION AND QUANTITY DETERMINATION OF PHYLLANTHIN, HYPOPHYLLANTHIN FROM *Phyllanthus urinaria* L. BY LIQUID CHROMATOGRAPHY- MASS SPECTROMETRY (LC-MS/MS)

Doan Manh Dung¹, Nguyen Huu Tung², Nguyen Dinh Luyen³

¹Faculty of Chemistry, University of Sciences, Hue University

²School of Medicine and Pharmacy, Vietnam National University, Hanoi

³Faculty of Chemistry, University of Education, Hue University

*Email: doanmanhdung151090@gmail.com

ABSTRACT

By using chromatography methods, we isolated principal compound of phyllanthin and hypophyllanthin from *Phyllanthusurinaria* L.. Its structure was determined on the basis of spectroscopic data (¹H-NMR, ¹³C-NMR and ESI-MS mass spectra). This compound is purified (purity > 99,8%) by Agilent 218 purification system, which was used as standard for analyzing phyllanthin, hypophyllanthin in samples. The liquid chromatography (LC-MS/MS) with chromatography column: EC-C₁₈ (100 × 2.1 mm, 2.7 μm), mobile phase: MeOH (A) –Slution (10mM ammonium acetate and 0,1% formic acid) (B) (v/v = 60/40), flow: 0,3 ml/min, injection volume: 1μL, Quantification was performed using multiple reaction monitoring (MRM) at transitions of m/z 261→231 for hypophyllanthin and m/z 436→151 for phyllanthin. We used the optimized analytical method for determining rapidly two active compounds hypophyllanthin and phyllanthin in *Phyllanthusurinaria* L. with good linearity, precision and accuracy using LC-MS/MS technique.

Keywords: *Phyllanthusurinaria*, phyllanthin, hypophyllanthin, LC-MS/MS.



Đoàn Mạnh Dũng sinh ngày 15/10/1990 tại Hà Tĩnh. Năm 2008, ông tốt nghiệp cử nhân ngành Sư phạm Hóa học tại trường Đại học Vinh. Năm 2014, ông tốt nghiệp thạc sĩ chuyên ngành Hóa Hữu cơ tại Trường Đại học Vinh. Từ năm 2015 đến nay, ông là nghiên cứu sinh tiến sĩ chuyên ngành Hóa phân tích tại trường Đại học khoa học, Đại học Huế.

Lĩnh vực nghiên cứu: hóa phân tích, hóa hữu cơ, hóa học các hợp chất thiên nhiên.



Nguyễn Hữu Tùng sinh năm 1982 tại Bắc Ninh. Ông tốt nghiệp Đại học Bách khoa Hà Nội năm 2005 và đạt học vị Tiến sĩ Dược học năm 2010 tại Đại học Quốc gia Chungnam, Hàn Quốc. Từ 2010 đến 2015, ông làm nghiên cứu sau tiến sĩ tại Đại học Quốc tế Nagasaki, Nhật Bản. Ông là giảng viên thuộc Bộ môn Hóa dược & Kiểm nghiệm thuốc, Khoa Y Dược - Đại học Quốc gia Hà Nội từ 2015.

Lĩnh vực nghiên cứu: phát triển dược liệu cây thuốc, xác định các hoạt chất từ đa dạng nguồn dược liệu.



Nguyễn Đình Luyện sinh ngày 22/01/1965 tại Quảng Bình. Năm 1986, ông tốt nghiệp cử nhân sư phạm Hóa học tại trường Đại học Sư phạm Huế và được Trường giữ lại làm CBGD từ đó đến nay. Ông bảo vệ luận án Tiến sĩ năm 1999 và được nhà nước công nhận Phó giáo sư năm 2009. Hiện tại là Phó Hiệu trưởng Trường Đại học Sư phạm, Đại học Huế.

Lĩnh vực nghiên cứu: hóa phân tích.