

Thiết lập chất đối chiếu nhóm alkaloid từ lá đu đủ (*Carica papaya* L., Caricaceae)

Nguyễn Thị Minh Thuận^{1*}

Nguyễn Việt Đức², Võ Thị Bạch Huệ²

¹Khoa Dược, Đại học Y Dược TP. Hồ Chí Minh

²Khoa Dược, Trường Đại học Lạc Hồng

*E-mail: ntmthuan@ump.edu.vn

Summary

To establish reference substances for quality control of medicinal papaya leaves and related products, some alkaloids of the leaves of papaya (*Carica papaya* L.) were extracted, isolated and purified. The plant leaves collected in Dong Nai province were extracted with ethanol by liquid-liquid separation, vacuum column chromatography and other refining methods. Their structures were confirmed by HPLC, and spectrometrically by IR, MS, NMR. As a result, 1000 mg of carpaine were obtained from chloroform fractions. The purity of the obtained carpaine attained 98.36 %, and as thus, enough for establishment of its reference substance.

Keywords: Papaya leaves, carpaine, reference substance extraction.

Đặt vấn đề

Đu đủ (*Carica papaya* L., Caricaceae) là một loại cây ăn quả trồng khá phổ biến ở các nước nhiệt đới cũng như Việt Nam và từ lâu được coi như là một vị thuốc [1]. Thời gian gần đây xuất hiện nhiều bài thuốc chữa ung thư từ lá đu đủ. Một vài nghiên cứu đã chứng minh nước sắc lá đu đủ lạnh tính, không gây độc cho cơ thể mà chỉ giết tế bào ung thư. Lá đu đủ cũng chưa được đưa vào Dược điển và chưa được tiêu chuẩn hóa [2]. Mặc dù đã có rất nhiều đề tài nghiên cứu về thành phần, phân lập và định danh các chất có trong lá đu đủ, tuy nhiên, hiện nay chưa thấy nghiên cứu thiết lập chất đối chiếu từ lá đu đủ để phục vụ công tác kiểm nghiệm dược liệu lá đu đủ và các sản phẩm chứa lá đu đủ trên thị trường. Mục tiêu của đề tài là thiết lập một số chất đối chiếu từ lá đu đủ *Carica papaya* L., Caricaceae nhằm góp phần tạo ra nguồn chất đối chiếu từ lá đu đủ, phục vụ cho công tác kiểm tra chất lượng nguyên liệu và các chế phẩm có chứa lá đu đủ đang lưu hành trên thị trường.

Nguyên vật liệu và phương pháp

Nguyên vật liệu

Nguyên liệu: Lá cây đu đủ tươi (*Carica papaya* L., Caricaceae) đạt kích thước khoảng 30 cm từ cuống đến đỉnh lá, được thu hái tại xã Tân Triều, huyện Vĩnh Cửu, tỉnh Đồng Nai. Lá được rửa sạch, thái nhỏ khoảng 1 cm, sấy khô, sau đó xay thành bột thô.

Dung môi - Hóa chất - Thuốc thử: Ethanol, cloroform, n-hexan, ethyl acetat, methanol, amoniac

đậm đặc, acid clohydric đậm đặc, acid sulfuric đậm đặc, thuốc thử (TT) Dragendorff, FeCl₃ 5 %/ethanol, xanh bromocresol (Trung Quốc).

Phương pháp nghiên cứu

Chiết xuất alkaloid toàn phần trong lá đu đủ

Chiết ngấm kiệt 8 kg bột dược liệu lá đu đủ với ethanol 70 % với tỷ lệ 1:10 (kg/L) thu được cao toàn phần. Lắc cao toàn phần lần lượt với dung môi n-hexan để loại tạp kém phân cực. Sau đó kiểm hóa dịch chiết với NH₃ đến pH 10 và lắc với cloroform, thu hồi dung môi cloroform sẽ được cao phân đoạn chứa alkaloid ở môi trường kiềm.

Tách các phân đoạn alkaloid bằng sắc ký cột, tinh chế và kiểm tra độ tinh khiết

Nạp mẫu cao cloroform vào cột thủy tinh (4,5 x 50 cm) chứa silica gel (40 - 63 μm) theo phương pháp nhồi cột khô. Rửa giải lần lượt với các dung môi n-hexan, cloroform, ethyl acetat rồi đến methanol. Kiểm tra phân đoạn bằng sắc ký lớp mỏng (SKLM) với hệ dung môi CHCl₃ - MeOH - NH₃ (9 : 1 : 0,3). Sử dụng các kỹ thuật kết tinh, lọc và rửa tinh thể để thu được các chất kết tinh sạch. Kiểm tra độ tinh khiết trên SKLM (phân tích sắc kí đồ dưới UV 254 nm, 365 nm, thuốc thử (TT) Dragendorff và TT vanilin-sulfuric (VS)) và với hệ thống HPLC-ELSD.

Xác định cấu trúc của các chất phân lập được

Phương pháp đo phổ IR: Thực hiện trên máy TENSOR 27 - BRUKER (Viện Công nghệ Hóa học TP. Hồ Chí Minh) giúp sơ bộ nhận định các đỉnh hấp thụ của nhóm chức.

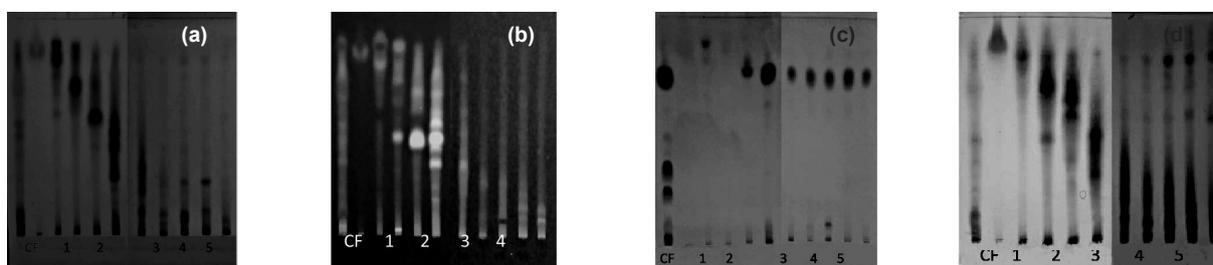
Phương pháp đo phổ MS: Phân tích trên máy HRMS-X500R QTOF tại Viện Công nghệ Hóa học TP. Hồ Chí Minh.

Phương pháp đo phổ NMR: Đo với các kỹ thuật 1D hay 2D (^1H , ^{13}C , **DEPT**, **HSQC**, **HMBC**). Độ dời hóa học tính theo thang δ (ppm) với $\delta_{\text{TMS}} = 0,00$ ppm và tín hiệu đo dung môi CDCl_3 [$\delta_{\text{H}} = 7,27$ ppm (t); $\delta_{\text{C}} = 77,0$ ppm (t)], thực hiện trên máy AVANCE 500-Bruker (Viện Hóa học, Viện Hàn lâm Khoa học và công nghệ Việt Nam).

Thiết lập chất đối chiếu từ lá đu đủ

Lựa chọn những alkaloid đã xác định cấu trúc có khối lượng trên 100 mg, độ tinh khiết trên 95 % (**HPLC**), quy trình phân lập ổn định để thiết lập ĐCĐ.

Xác định độ tinh khiết bằng **HPLC**, sau đó



Hình 1. SKLM các cao phân đoạn CF dưới UV 254 (a), UV 365 (b), TT Dragendorff (c) và TT VS (d)

Tinh chế và kiểm tra độ tinh khiết alkaloid

Tinh chế phân đoạn CF5: Hòa tan CF5 vào cloroform, thêm n-hexan. Sau khi hút lấy 3/4 dịch và để bay hơi tự nhiên ở nhiệt độ phòng, thu được chất kết tinh. Lặp lại tương tự đến khi thu được tinh thể tinh khiết chỉ có 1 vết alkaloid, gọi là **CP1** (1000 mg) và được đem đi xác định cấu trúc hóa học.

đóng ống có khối lượng 5 mg và đánh giá độ đồng nhất lô. Phân tích bằng phép kiểm ANOVA một yếu tố để đánh giá tính đồng nhất lô và đồng nhất liên phòng [3].

Kết quả

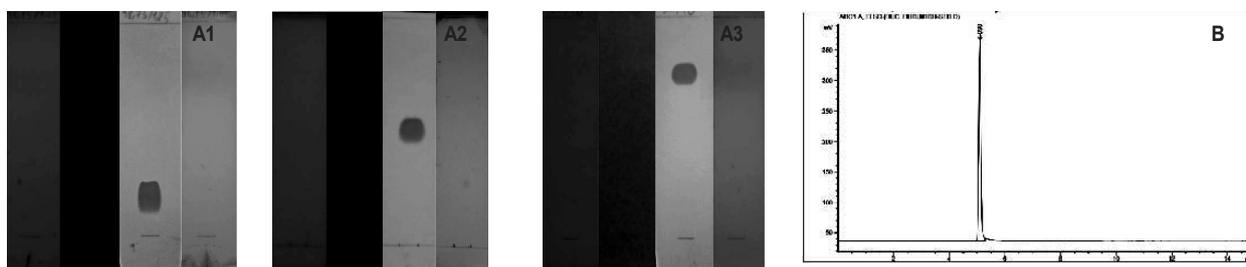
Tách các phân đoạn alkaloid bằng sắc ký cột chân không

Từ 35 g cao phân đoạn cloroform, sau khi tiến hành sắc ký cột chân không và kiểm tra bằng **SKLM** thu được 10 phân đoạn ký hiệu từ CF1 đến CF10. Kiểm tra bằng **SKLM** với hệ dung môi $\text{CHCl}_3 - \text{MeOH} - \text{NH}_3$ (9:1:0,3) thấy phân đoạn CF5 vết màu đỏ cam rất đậm (hình 1-c) và xuất hiện tinh thể trắng lẫn tạp xanh ở đáy lọ. Vì vậy, phân đoạn CF5 được sử dụng để tinh chế alkaloid.

Kiểm tra độ tinh khiết hợp chất CP1

- Với 3 hệ dung môi khác nhau, **SKLM** hợp chất **CP1** chỉ cho 1 vết duy nhất khi nhúng TT Dragendorff và không xuất hiện vết nào khi soi UV 254 nm, UV 365 nm, TT vanilin-sulfuric. Vậy nên hợp chất **CP1** tinh khiết trên **SKLM** (hình 2-A).

- Phương pháp **HPLC-ELSD** (Agilent 1050): Hợp chất **CP1** cho 1 pic chính trên sắc ký đồ, đạt độ tinh khiết 98,36 %, tổng tạp liên quan 1,64 % (hình 2-B).



Hình 2. Sắc ký đồ kiểm tra độ tinh khiết của **CP1** bằng **SKLM** hợp chất trên 3 hệ dung môi khác nhau (A1) $\text{CHCl}_3 - \text{NH}_3$ (95:5); (A2) $\text{CHCl}_3 - \text{MeOH} - \text{NH}_3$ (95:5:0,1); (A3) $\text{EtAc} - \text{MeOH}$ (90:10:0,1) và bằng phương pháp **HPLC** (B)

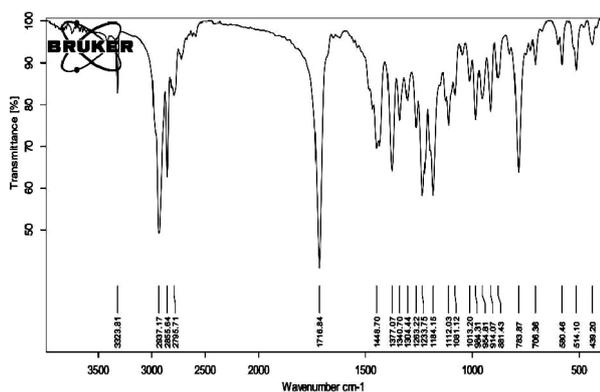
Xác định cấu trúc hợp chất CP1

Phổ hồng ngoại IR: Hợp chất **CP1** cho các đỉnh hấp thụ ở số sóng ν (cm^{-1}) 3323,81 (N-H); 2937,17 (CH_3); 1716,84 (C=O), 1184,15 (C-N) 793,87 ($-\text{CH}_2-$) (hình 3).

Phổ khối MS: ESI-MS: m/z 479,3839 $[\text{M}+\text{H}]^+$; 240,1946 $[\text{M}/2+\text{H}]^+$ cho phép dự đoán khối lượng phân tử của CP1 là 478 (hình 4).

Phổ cộng hưởng từ hạt nhân NMR

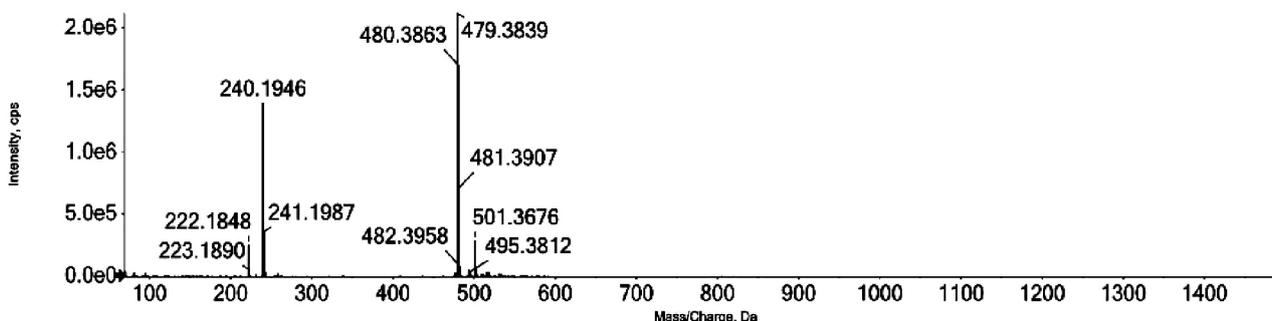
Phổ ^{13}C -NMR (hình 6A) của **CP1** có 14 tín hiệu,



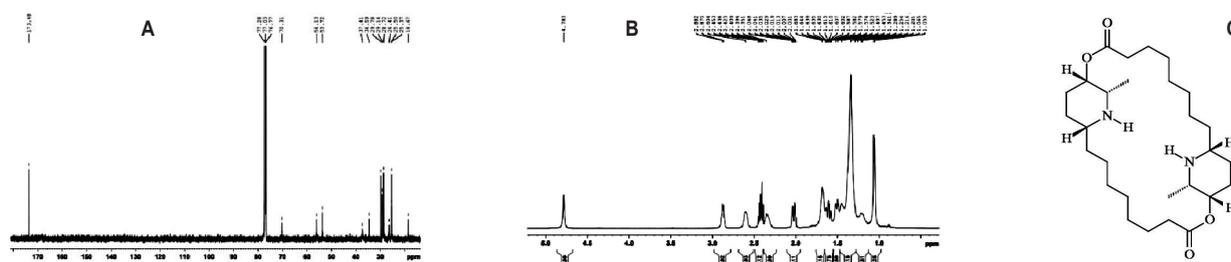
Hình 3. Phổ IR của hợp chất CP1

kết hợp với kết quả dự đoán công thức phân tử từ phổ MS, suy ra CP1 có 28 carbon và cấu trúc đối xứng toàn phân tử. Một tín hiệu carbonyl C=O ở 173,48; được dự đoán là tín hiệu carbonyl của nhóm chức ester. Phổ $^1\text{H-NMR}$ (hình 5B) của CP1 cho thấy 1 đỉnh *singlet* có độ dịch chuyển δ_{H} 4,78 của H-3, gần với carbon trực tiếp gắn oxy nên bị downfield. Các tín hiệu ở δ_{H} 2,88 và 2,60 lần lượt là của H-2 và H-6 (C-H nối với N). Các tín hiệu trong vùng δ_{H} 1,76-1,13 là sự chồng lấp tín hiệu của H-7 đến H-12 trong mạch $-\text{CH}_2-$. Tín hiệu δ_{H} 1,06 tương ứng với H-15 (trong nhóm $-\text{CH}_3$). So sánh với tài liệu tham khảo [4], kết luận hợp chất CP1 có công thức phân tử là $\text{C}_{28}\text{H}_{50}\text{N}_2\text{O}_4$, là carpain (hình 5C).

Spectrum from CP1_(+)ESI.wiff2 (sample 1) - CP1_(+)ESI, +TOF MS (70 - 1500) from 0.204 min, noise filtered (noise multiplier = 1.5), Gaussian smoothed (0.5 points)



Hình 4. Phổ HR-MS hợp chất CP1



Hình 5. Phổ $^{13}\text{C-NMR}$ (A), phổ $^1\text{H-NMR}$ (B) và công thức cấu tạo (C) hợp chất CP1

Thiết lập chất đối chiếu từ hợp chất CP1

Hợp chất CP1 (carpain) là alcaloid được phân lập từ lá đu đủ, có độ tinh khiết cao và khối lượng lớn (1000 mg), quy trình phân lập ổn định nên được chọn để thiết lập chất đối chiếu.

Xác định độ tinh khiết carpain bằng HPLC-ELSD

Quy trình xác định độ tinh khiết carpain bằng HPLC-ELSD (Agilent) đã được đánh giá đạt các tiêu chí về tính tương thích hệ thống và đạt các yêu cầu thẩm định. Điều kiện sắc ký được xác định như sau: Cột C18 (150 x 4,6 mm; 3,5 μm); Nhiệt độ đầu vào T_1 : 40 $^\circ\text{C}$, nhiệt độ bay hơi T_2 : 70 $^\circ\text{C}$, áp suất khí P: 1,5 psi, gain: 700); Pha động: gradient với 2 kênh C

(acid formic 0,1 %) và D (ACN); 0 – 6 phút: 20 % D; 7 – 15 phút: 100 % D; Tốc độ dòng: 1 ml/ phút; Thể tích tiêm mẫu: 10 μl ; Nhiệt độ cột: nhiệt độ phòng. Độ tinh khiết của carpain phân lập từ lá đu đủ được xác định bằng phương pháp HPLC-ELSD đạt 98,36 %.

Đóng lọ - Đánh giá độ đồng nhất lọ

Đóng lọ: Đóng carpain phân lập được vào 100 lọ (5 mg/lọ).

Đánh giá độ đồng nhất lọ: Số lọ cần lấy để đánh giá đồng nhất lọ: $g = \sqrt{N} + 1 = 11$ lọ. Lấy ngẫu nhiên các lọ, mỗi lọ kiểm tra 2 lần. Kết quả phân tích thống kê cho thấy quá trình đóng gói không làm ảnh hưởng đến độ tinh khiết carpain (bảng 1).

(Xem tiếp trang 86)

Tài liệu tham khảo

1. Barbosa J. S., Neto D. M. A., et al. (2018), "Ultrafast sonochemistry-based approach to coat TiO₂ commercial particles for sunscreen formulation", *Ultrasonics Sonochemistry*, 48, pp. 340-348.
2. Bens Guido (2014), "Sunscreens", *Sunlight, Vitamin D and Skin Cancer*, Springer, pp. 429-463.
3. COLIPA, SA CTFA (2006), "International sun protection factor (SPF) test method", *Brussels*, pp. 6-19.
4. Lionetti N. (2017), "The New sunscreens among formulation strategy, stability issues, changing norms, safety

and efficacy evaluations", *Cosmetics*, 4 (2), pp. 15.

5. Serpone N. (2002), "An in vitro systematic spectroscopic examination of the photostabilities of a random set of commercial sunscreen lotions and their chemical UVB/UVA active agents", *Photochem. & Photobiolog. Sciences*, 1 (12), pp. 970-981.

6. Tan C. H. (2018), "The performance and stability of titanium dioxide and ethylhexyl methoxycinnamate as sunscreen filter: A comparison study, Biophotonics: Photonic solutions for better health care VI", *Inter. Society for Optics and Photonics*, pp. 148-156.

(Ngày nhận bài: 19/7/2020 - Ngày phản biện: 20/8/2020 - Ngày duyệt đăng: 18/9/2020)

Thiết lập chất đối chiếu... (Tiếp theo trang 69)

Bảng 1. Kết quả đánh giá đồng nhất lọ

STT	Độ tinh khiết (%)	
	Lần 1	Lần 2
1	97,66	98,49
2	97,74	98,01
3	97,55	97,53
4	98,21	98,94
5	97,76	98,07
6	97,94	97,83
7	99,13	99,40
8	98,34	99,12
9	98,41	98,96
10	99,23	98,52
11	98,43	98,06
TB	98,22	98,49
RSD%	0,58	0,61

Bàn luận

Phương pháp sắc ký cột là phương pháp thường quy để phân lập alkaloid và flavonoid từ các cao phân đoạn. Trong lá cây đu đủ có chứa carpain, pseudocarpain, dehydrocarpaine I và II, benzyl isothiocyanat, cholin,... được xem là những alkaloid chính trong cây, chiếm nhiều hơn hết là carpain [5]. Nhiều nghiên cứu cũng chọn phương pháp này để phân lập alkaloid và flavonoid từ lá đu đủ [6,8]. Đề tài này đã phân lập các cao chloroform và cao EtAc (cao ethyl acetat) bằng phương pháp sắc ký cột. Từ cao chloroform, phân lập được 1000 mg carpain với độ tinh khiết 98,36 %. Carpain là một alkaloid chính trong lá đu đủ, tương tự các nghiên cứu trước đó [9-10].

Hiện nay, chưa có cơ quan nào phân phối chất đối chiếu được phân lập từ lá đu đủ trên thị trường cả trong nước và trên thế giới. Vì vậy, việc xây dựng và thiết lập chất đối chiếu từ lá đu đủ là cần thiết. Carpain là alkaloid phân lập được có khối lượng lớn, độ tinh khiết cao, quy trình phân lập ổn định nên được lựa chọn để thiết lập chất đối chiếu.

(Ngày nhận bài: 01/7/2020 - Ngày phản biện: 10/7/2020 - Ngày duyệt đăng: 18/9/2020)

Kết luận

Đề tài đã phân lập được alkaloid là carpain làm chất đối chiếu từ lá đu đủ (*Carica papaya* L., Caricaceae), góp phần phục vụ cho công tác kiểm tra chất lượng nguyên liệu và các chế phẩm có chứa lá đu đủ đang lưu hành trên thị trường.

Tài liệu tham khảo

1. Đỗ Tất Lợi (2004), Những cây thuốc và vị thuốc Việt Nam, NXB. Y học, tr. 306 – 362
2. Võ Văn Chi (1996), Từ điển Cây thuốc Việt Nam, NXB. Y học, tr. 192 – 193.
3. ISO-13528 (2020), *Statistical methods for use in proficiency testing by interlaboratory comparison*, <https://www.iso.org/standard/56125.html>, ngày đăng nhập 01/06/2020
4. Xiuyi W., Hu C. (2015), "Isolation and identification Carpaine in *Carica papaya* L. leaf by **HPLC-UV** method", *Inter. J. of Food Properties*, 18 (7), pp. 1505-1512
5. Roshan A., Verma N. K. & Gupta A. (2014), "A brief study on *Carica papaya*-A review.", *Inter. J. of Current Trends in Pharm. Res.*, 2 (4), pp. 541-550
6. Julianti T., Oufir M. & Hamburger M. (2014), "Quantification of the antiplasmodial alkaloid carpaine in papaya (*Carica papaya*) leaves", *Planta. Med.*, 80 (13), pp. 1138-1142
7. Agung N., Heryani H. (2017), "Identification and quantification of flavonoids in *Carica papaya* leaf and peroxynitrite-scavenging activity", *Asian Pacific J. of Tropical Biomedicine*, 7 (3), pp. 208-213
8. Dyah S., Sri A., Uun Y. (2016), "Characterization of fraction of *Carica papaya* L. leaves ethyl acetate extract to african catfish *clarias gariepinus* leucocytes using **UV-Vis**, FTIR and GC-MS Methods", *Inter. J. of Chem. Tech. Res.*, 9(9): 247-253.
9. Barger G., Robinson R., Work T. S. (1933), "Constitution of carpaine", *J. Chem. Soc.*, 3, pp. 711-713.
10. Tang C. S. (1979), "New macrocyclic, Δ 1-piperidine alkaloids from papaya leaves: Dehydrocarpaine I and II", *Phytochemistry*, 18 (4), pp. 651-652.