

XÂY DỰNG QUY TRÌNH ĐỊNH LƯỢNG MYRICITRIN TRONG CAO PHÂN ĐOẠN CỦA LÁ CÂY MÓNG BÒ LEO (*Bauhinia bracteata* (Benth.) Baker Fabaceae) TRỒNG TẠI ĐẮK LẮK

Nguyễn Thị Thu Hạnh*, Phan Hoàng Thu

Trường Đại học Y Dược Buôn Ma Thuột

*E-mail: ntthanh@bmtvietnam.com

Ngày nhận bài: 19/6/2024

Ngày phản biện: 24/7/2024

Ngày duyệt đăng: 10/8/2024

TÓM TẮT

Đặt vấn đề: Móng bò leo (*Bauhinia bracteata* (Benth.) Baker Fabaceae) là một loài có tiềm năng trong việc điều trị nhiều bệnh lý khác nhau. Tại Việt Nam năm 2020 đã có nghiên cứu phân lập thành công myricitrin - một flavonoid đã được chứng minh có rất nhiều hoạt tính sinh học quan trọng từ cao phân đoạn ethylacetat của lá cây Móng bò leo trồng tại Đắk Lắk, là myricitrin, tuy nhiên chưa xác định được hàm lượng của myricitrin trong cao này. **Mục tiêu nghiên cứu:** Xây dựng và thẩm định quy trình định lượng myricitrin trong cao phân đoạn của lá Móng bò leo bằng phương pháp HPLC. **Đối tượng và phương pháp nghiên cứu:** Đối tượng nghiên cứu là lá Móng bò leo thu hái tại Đắk Lắk vào tháng 3 năm 2023. Dựa trên cấu trúc và tính chất của myricitrin và các tài liệu tham khảo đưa ra quy trình chuẩn bị mẫu, lựa chọn các thông số sắc ký về cột, bước sóng phát hiện, thể tích tiêm mẫu, thành phần và tỉ lệ pha động, bước sóng phát hiện để xây dựng quy trình định lượng myricitrin trong cao phân đoạn lá Móng bò leo bằng phương pháp HPLC và thẩm định quy trình theo hướng dẫn của ICH và các quy định về giới hạn chấp nhận khi thẩm định được áp dụng theo AOAC. **Kết quả:** Nghiên cứu đã xây dựng được quy trình định lượng myricitrin bằng phương pháp HPLC với điều kiện sắc ký là: Cột sắc ký C₁₈ Inert Sustain (250 x 4,6 mm; 5 μm), đầu dò PDA bước sóng phát hiện 350 nm, thể tích tiêm mẫu 10 μL, pha động: ACN - acid formic 0,1% (20:80), tốc độ dòng 1,0 mL/phút. Quy trình được thẩm định theo ICH đạt độ đặc hiệu, tính tương thích hệ thống, độ lặp lại (RSD < 2,0%), độ đúng với tỉ lệ thu hồi nằm trong khoảng 98,30 – 100,25%, phương trình hồi quy có dạng $y = 15208x - 442916$ và khoảng tuyến tính của myricitrin từ 100 - 1500 μg/mL với hệ số tương quan $R^2 = 0,999$. **Kết luận:** Xây dựng được quy trình định lượng myricitrin trong cao của lá cây móng bò leo giúp cung cấp thông tin quan trọng về hàm lượng của nó trong cây và làm cơ sở giúp kiểm soát chất lượng, hàm lượng myricitrin của các sản phẩm có sử dụng lá cây Móng bò leo.

Từ khóa: *Bauhinia bracteata*, định lượng bằng HPLC, myricitrin.

ABSTRACT

DEVELOPMENT OF A QUANTIFICATION PROCESS FOR MYRICITRIN IN THE LEAF EXTRACT OF CAMEL'S FOOT TREE (*Bauhinia bracteata* (Benth.) Baker Fabaceae) CULTIVATED IN DAKLAK

Nguyen Thi Thu Hanh*, Phan Hoang Thu

Buon Ma Thuot Medicine University

Background: *Bauhinia bracteata* (Benth.) Baker Fabaceae) is a species with potential in the treatment of many different diseases. In Vietnam, in 2020, there was a research successfully isolated myricitrin - a flavonoid that has been proven to have many important biological activities from the ethyl acetate fraction of the leaves of the Chibi climbing plant grown in Dak Lak. Myricitrin is, however, However, the content of myricitrin in this extract has not been determined. **Objectives:**

To develop and validating a procedure for quantifying myricitrin in the extract of the leaves of *B.bracteata* using the HPLC method. **Materials and methods:** leaves collected in Dak Lak in March 2023. Based on the structure and properties of myricitrin and reference documents, the sample preparation process and selection of chromatographic parameters of column and wavelength are provided, detection, sample injection volume, composition and ratio of mobile phase, detection wavelength to develop a procedure for quantifying myricitrin in the extract of Cinnamon leaves by HPLC method and validating the procedure according to ICH guidelines and appraisal acceptance limits regulations apply under the AOAC. **Results:** Quantifying myricitrin using the HPLC method with chromatography conditions including: C_{18} Inert Sustain chromatography column (250 x 4.6 mm; 5 μ m), detection wavelength of 350 nm, injection volume sample 10 μ L, mobile phase: ACN - formic acid 0.1% (20:80), flow rate 1.0 mL/min. The procedure was validated according to ICH to achieve specificity, system compatibility, repeatability (RSD < 2.0%), accuracy with recovery rate in the range of 98,30 – 100,25%, method The regression has the form $y = 15208x - 442916$ and the linear range of myricitrin is from 100-500 μ g/mL with correlation coefficient $R^2 = 0.999$. **Conclusion:** Conducting a procedure for quantifying myricitrin in leaf extract has provided important information about its content in the plant and served as a basis to help control the quality and myricitrin content of products using the leaves of the plant.

Keywords: *Bauhinia bracteata*, myricitrin, quantification by HPLC.

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Móng bò leo (*Bauhinia bracteata* (Benth.) Baker Fabaceae) là một cây thuốc có tiềm năng trong việc điều trị nhiều bệnh lý khác nhau, trong dân gian thường sử dụng lá cây tươi hãm lấy nước uống để chữa các bệnh liên quan đến sỏi mật, sỏi thận. Trên thế giới đã có nhiều nghiên cứu về thành phần hóa học và ứng dụng y học của cây Móng bò leo. Ở Việt Nam năm 2020 đã có đề tài phân lập bốn hoạt chất tinh khiết từ cao phân đoạn lá cây Móng bò leo trồng tại Đắk Lắk, trong đó có hoạt chất myricitrin [1], tuy nhiên chưa xác định được hàm lượng myricitrin có trong cao. Điều này tạo ra hạn chế trong việc sử dụng hiệu quả cây dược liệu này cũng như hoạt chất myricitrin có trong cây. Myricitrin là một flavonoid có nhiều hoạt tính sinh học như khả năng kháng viêm, giảm rối loạn lipid máu, chống oxy hóa, bảo vệ gan ruột, tái tạo xương, ngăn ngừa xơ vữa động mạch, hạ đường huyết, chống loãng xương, chống dị ứng và giảm viêm khớp [2-7]. Nghiên cứu được thực hiện với mục tiêu: xây dựng và thẩm định quy trình định lượng myricitrin trong cao phân đoạn của lá Móng bò leo bằng phương pháp HPLC.

II. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu

Nguyên liệu: Lá Móng bò leo (*Bauhinia bracteata* (Benth.) Baker Fabaceae) thu hái tại Phường Tân An, Thành phố Buôn Ma Thuột, tỉnh Đắk Lắk vào tháng 03 năm 2023.

Dung môi, hóa chất: Methanol (MeOH), acetonitril (ACN), nước cất đạt tiêu chuẩn dùng cho sắc ký lỏng. Acid acetic, ethyl acetat đạt chuẩn phân tích.

Thiết bị: Bể siêu âm Elma, máy sắc ký lỏng hiệu năng cao Waters Alliance e2695-2998, cân phân tích OHAUS, bộ lọc chân không Duran, một số dụng cụ thủy tinh thường dùng trong phòng thí nghiệm.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Xây dựng quy trình định lượng

Dựa vào đặc tính của các chất phân lập để lựa chọn kỹ thuật sắc ký, kết hợp với việc tham khảo các tài liệu [7-9] tiến hành khảo sát một số pha động với thành phần và tỉ lệ như sau: MeOH - acid formic 0,1% (60:40), (50:50), (80:20); ACN - acid formic 0,1% (70:30), (60:40), (10:90). Tiến hành sắc ký khảo sát với một số điều kiện ban đầu cố định như sau: Cột sắc ký C₁₈ (250 x 4,6 mm; 5 µm), đầu dò PDA, bước sóng phát hiện 350 nm, thể tích tiêm mẫu 10 µL. Tốc độ dòng khảo sát ở 3 mức: 0,8 mL/phút; 1,0 mL/phút; 1,2 mL/phút.

- Dung môi pha mẫu: MeOH.

- Mẫu chuẩn: myricitrin chuẩn pha trong MeOH để được dung dịch gốc có nồng độ 1000 µg/mL. Từ dung dịch chuẩn gốc, pha loãng với MeOH để thu được dung dịch chuẩn có nồng độ thích hợp tùy vào mục đích phân tích.

- Mẫu thử: Cân chính xác khoảng 2,5 g cao khô ethyl acetat cho vào bình định mức 50 mL, thêm khoảng 30 ml MeOH, lắc cho tan hoàn toàn, thêm tiếp MeOH đến vạch, lắc đều, thu được dung dịch gốc có nồng độ 50000 µg/mL. Pha loãng dung dịch gốc với MeOH để được các dung dịch thử có nồng độ thích hợp tùy vào mục đích phân tích.

2.2.2. Thẩm định quy trình định lượng

Quy trình định lượng myricitrin trong cao phân đoạn lá Móng bò leo bằng phương pháp HPLC được thẩm định theo hướng dẫn của ICH và AOAC [10,11].

- **Tính phù hợp hệ thống:** Tiến hành trên mẫu chuẩn với ít nhất 6 lần tiêm mẫu liên tiếp theo điều kiện sắc ký đã chọn. Yêu cầu các giá trị thời gian lưu (tR), diện tích peak (S) có RSD ≤ 2,0%, hệ số bất đối (As) của mỗi peak đều trong khoảng 0,8 - 1,5.

- **Tính đặc hiệu:** Tiến hành sắc ký các mẫu chuẩn, dung môi pha mẫu, pha động, mẫu thử và mẫu thử thêm chuẩn. Sắc ký đồ dung môi pha mẫu và pha động không xuất hiện peak trong khoảng thời gian lưu tương ứng với thời gian lưu của peak myricitrin trong mẫu chuẩn, sắc ký đồ mẫu thử xuất hiện peak có thời gian lưu tương đương với thời gian lưu của myricitrin trong sắc ký đồ mẫu chuẩn, trên sắc ký đồ mẫu thử nếu xuất hiện các peak khác (peak tạp) thì peak myricitrin phải tách hoàn toàn, mẫu thử thêm chuẩn thì diện tích và chiều cao peak myricitrin tăng, peak myricitrin trong các sắc ký đồ phải tinh khiết (phổ UV - Vis).

- **Tính tuyến tính và miền giá trị:** Tiến hành sắc ký 1 lần các dung dịch chuẩn nồng độ 100; 300; 500; 700; 1000 và 1500 µg/ml. Thiết lập phương trình hồi quy giữa nồng độ và diện tích peak, tính hệ số tương quan. Miền giá trị: khoảng nồng độ tương ứng từ 80 - 120% nồng độ định lượng. Yêu cầu: hệ số tương quan $R \geq 0,999$.

- **Giới hạn phát hiện (LOD) và giới hạn định lượng (LOQ):** LOD được chấp nhận tại nồng độ phân tích mà tại đó chất cần phân tích có tín hiệu peak lớn bằng 3 lần nhiễu đường nền. LOQ được chấp nhận tại nồng độ phân tích mà tại đó chất cần phân tích có tín hiệu peak lớn bằng 10 lần nhiễu đường nền.

- **Độ lặp lại:** Chuẩn bị các mẫu ở 3 mức 80%, 100%, 120% so với nồng độ myricitrin có trong mẫu thử, mỗi mức nồng độ chuẩn bị 3 mẫu riêng biệt. Tiến hành sắc ký 1 lần các mẫu thử. Giá trị RSD của hàm lượng chất trong mẫu thử phải ≤ 2,0%.

- **Độ chính xác trung gian:** tiến hành như độ lặp lại trong một ngày khác và bởi người phân tích khác. Giá trị RSD của hàm lượng chất trong mẫu thử phải ≤ 2,0%.

- **Độ đúng:** Thêm chất chuẩn vào các mẫu thử ở 3 mức 80%, 100% và 120% so với hàm lượng myricitrin có trong mẫu thử. Mỗi mức 3 mẫu riêng biệt. Tiến hành sắc ký các mẫu thử trên, tính tỉ lệ thu hồi dựa trên lượng chất chuẩn thêm vào và lượng tìm được, tỷ lệ thu hồi từ 98 - 102%, giá trị RSD của tỉ lệ thu hồi không quá 2,0%.

III. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1 Xây dựng quy trình định lượng myricitrin

Khảo sát hệ pha động

Bảng 1. Kết quả khảo sát thành phần pha động và tỉ lệ dung môi sắc ký trên mẫu thử

Pha động	Tỉ lệ dung môi	Tốc độ dòng (mL/phút)	R _s	A _s	Độ tinh khiết peak
MeOH - acid formic 0,1%	20:80; 50:50; 60:40	1,0	-	-	Không đạt
ACN - acid formic 0,1%	70:30 – 30:70; 10:90	1,0	-	-	Không đạt
	20:80	1,0	5,05	1,09	Đạt

Nhận xét: Tỉ lệ dung môi ACN - acid formic 0,1% (20:80) xuất hiện peak myricitrin tách hoàn toàn với các peak khác trong mẫu, đạt yêu cầu. Pha động này có pH khoảng 3,5 phù hợp với hiệu năng cột sắc ký và bảo vệ tốt cột.

Khảo sát tốc độ dòng

Bảng 2. Kết quả khảo sát tốc độ dòng

Tốc độ dòng (mL/phút)	Thời gian lưu (phút)	R _s	A _s	Độ tinh khiết peak
1,2	13,163	4,73	1,10	Đạt
0,8	17,927	5,30	1,10	Đạt
1,0	14,967	5,05	1,09	Đạt

Nhận xét: Như vậy, điều kiện sắc ký thích hợp để định lượng myricitrin trong lá Móng bò leo bằng phương pháp HPLC với đầu dò PDA được đề xuất như sau: Cột sắc ký C18 InertSustain (250 x 4,6 mm; 5 µm), đầu dò PDA, bước sóng phát hiện: 350 nm, pha động: ACN - acid formic 0,1% (20:80), tốc độ dòng: 1,0 ml/phút.

3.2. Thẩm định quy trình phân tích

Tính phù hợp hệ thống

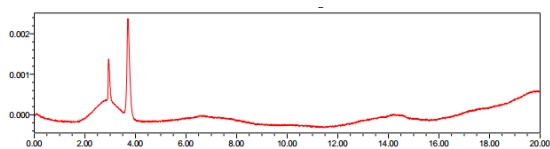
Bảng 3. Kết quả thống kê khảo sát tính phù hợp hệ thống trên mẫu chuẩn

Lần tiêm mẫu	tR (phút)	S (µAU x giây)	As
1	14,719	14619227	1,25
2	14,839	14604646	1,24
3	14,860	14588528	1,25
4	14,900	14533108	1,24
5	14,882	14590797	1,25
6	14,893	14575913	1,25
Giá trị thống kê	TB	14,849	14585370
	SD	0,067	29590,665
	RSD (%)	0,454	0,202

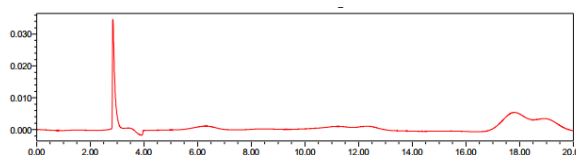
Nhận xét: RSD của thời gian lưu và diện tích peak của chất phân tích trong mẫu chuẩn đều nhỏ hơn 2,0%, hệ số bất đối đều nằm trong khoảng 0,8 - 1,5. Vậy quy trình định lượng myricitrin lựa chọn đạt tính phù hợp hệ thống.

Tính đặc hiệu

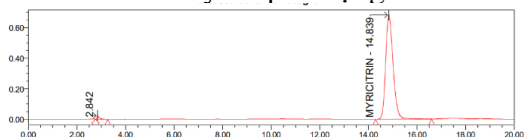
Hình 1 đến hình 5 minh họa kết quả khảo sát tính đặc hiệu.



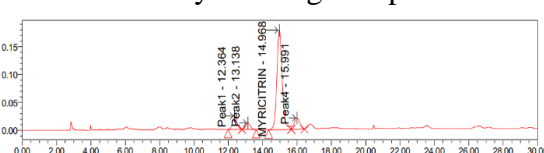
Hình 1. Sắc ký đồ pha động



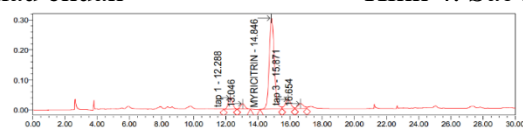
Hình 2. Sắc ký đồ dung môi pha mẫu



Hình 3. Sắc ký đồ mẫu chuẩn



Hình 4. Sắc ký đồ mẫu thử



Hình 5. Sắc ký đồ mẫu thử thêm chuẩn

Nhận xét: Sắc ký đồ pha động và dung môi chiết không xuất hiện peak trong khoảng thời gian lưu tương ứng với thời gian lưu myricitrin trong mẫu đối chiếu. Sắc ký đồ mẫu thử xuất hiện peak có thời gian lưu tương đương với thời gian lưu của myricitrin trong sắc ký đồ mẫu đối chiếu, peak myricitrin tách hoàn toàn. Khi thêm chất phân tích vào mẫu thử, diện tích peak và chiều cao peak của myricitrin tăng lên, đồng thời các peak đều tách hoàn toàn. Phổ UV-Vis tại thời gian lưu của myricitrin trong sắc ký đồ mẫu thử giống với phổ UV-Vis tại thời gian lưu của peak tương ứng trong sắc ký đồ mẫu đối chiếu. Peak myricitrin trong sắc ký đồ mẫu đối chiếu và mẫu thử đều đạt độ tinh khiết. Vậy quy trình phân tích có tính chọn lọc.

Tính tuyến tính, miền giá trị, LOD và LOQ

Bảng 4. Kết quả khảo sát khoảng tuyến tính, LOD và LOQ

Phương trình hồi quy	$y = 15208x - 442916$
Khoảng tuyến tính ($\mu\text{g/ml}$)	100 - 1500
Hệ số tương quan (R)	0,999
Giới hạn phát hiện ($\mu\text{g/ml}$)	4
Giới hạn định lượng ($\mu\text{g/ml}$)	13,3

Độ lặp lại và độ chính xác trung gian

Bảng 5. Kết quả thẩm định độ lặp lại và độ chính xác trung gian trên mẫu thử

Tỉ lệ	Mẫu	Người phân tích 1 Ngày phân tích: 17/04/2023 Hệ thống HPLC: Waters 2695		Người phân tích 2: Ngày phân tích: 26/04/2023 Hệ thống HPLC: Waters 2695	
		Nồng độ dung dịch thử ($\mu\text{g/ml}$)	Hàm lượng myricitrin ($\mu\text{g/ml}$)	Nồng độ dung dịch thử ($\mu\text{g/ml}$)	Hàm lượng myricitrin ($\mu\text{g/ml}$)
80%	1	4000	197,857	4000	200,495
	2	4000	194,763	4000	203,545
	3	4000	196,084	4000	205,064
RSD			0,791		1,146
100%	1	5000	240,863	5000	242,009

TẠP CHÍ Y DƯỢC HỌC CẦN THƠ – SỐ 78/2024

Ti lệ	Mẫu	Người phân tích 1 Ngày phân tích: 17/04/2023 Hệ thống HPLC: Waters 2695		Người phân tích 2: Ngày phân tích: 26/04/2023 Hệ thống HPLC: Waters 2695	
		Nồng độ dung dịch thử (µg/ml)	Hàm lượng myricitrin (µg/ml)	Nồng độ dung dịch thử (µg/ml)	Hàm lượng myricitrin (µg/ml)
	2	5000	242,641	5000	242,659
	3	5000	242,524	5000	242,74
RSD			0,411		0,165
120%	1	6000	287,038	6000	288,465
	2	6000	287,296	6000	288,207
	3	6000	289,629	6000	290,593
RSD			0,495		0,453

Nhận xét: Giá trị RSD của hàm lượng myricitrin của mỗi người phân tích và của cả hai người phân tích nhỏ hơn 2,0%; Như vậy, quy trình định lượng myricitrin đạt độ chính xác.

Độ đúng

Bảng 6. Kết quả thẩm định độ đúng

Nồng độ	Mẫu	Hàm lượng myricitrin ban đầu (µg)	Lượng chất chuẩn thêm vào (µg)	Diện tích peak (µAU x giây)	Ti lệ thu hồi (%)	
80%	1	242	200	6232576	98,47	TB: 98,30% RSD: 0,82%
	2	242	200	6200438	97,42	
	3	242	200	6248775	99,01	
100%	1	242	250	6986372	98,60	TB: 98,84% RSD: 0,26%
	2	242	250	7005960	99,12	
	3	242	250	6994170	98,81	
120%	1	242	300	7869731	101,53	TB: 100,25% RSD: 1,22%
	2	242	300	7805178	100,12	
	3	242	300	7758921	99,10	

Nhận xét: Tại mỗi mức nồng độ, tỷ lệ thu hồi đều nằm trong khoảng 98 - 102% và có giá trị RSD đều nhỏ hơn 2,0%. Như vậy, quy trình định lượng myricitrin đạt yêu cầu độ đúng.

IV. BÀN LUẬN

Quy trình định lượng với các thông số kỹ thuật đạt tiêu chuẩn chất lượng được thẩm định theo hướng dẫn của ICH và AOAC trên nền mẫu dược liệu, hệ pha động ACN- acid fomic 0,1% tỉ lệ (20:80), giống với kết quả của nghiên cứu trên thế giới đề tài tham khảo về định lượng myricitrin trong dịch chiết khô của vỏ cây *Juglans nigra* công bố vào năm 2022 và hàm lượng myricitrin khảo sát được khoảng 120 mg trong 2,5 g cao khô ethyl acetat của lá cây móng bò leo thấp hơn so với hàm lượng myricitrin trong vỏ cây *Juglans nigra* là 16,9 mg trong 0,2 g dịch chiết khô [7].

V. KẾT LUẬN

Nghiên cứu này là công bố đầu tiên về xây dựng được quy trình định lượng myricitrin trong cao phân đoạn của lá cây Móng bò leo trồng tại Đắk Lắk bằng phương pháp HPLC đã được thẩm định theo ICH và AOAC.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Nguyễn Thị Thu Hạnh, Nguyễn Đức Tuấn. Phân lập và xây dựng quy trình định lượng một số hợp chất hướng tác dụng chống oxy hóa của cây Móng bò leo (*Bauhinia bracteata* Benth. Fabaceae). *Tạp chí Y Dược học*. 2021. 15, 26-34.
 2. Dua T. K., Joardar S., Chakraborty P., Bhowmick S., Saha A., De Feo V., et al. Myricitrin, a glycosyloxyflavone in *Myrica esculenta* bark ameliorates diabetic nephropathy via improving glycemic status, reducing oxidative stress, and suppressing inflammation. *Molecules*. 2021. 26(2), 1-34. doi: 10.3390/molecules26020258.
 3. Li E., Wang T., Zhou R., Zhou Z., Zhang C., Wu W., et al. Myricetin and myricitrin alleviate liver and colon damage in a chronic colitis mice model: Effects on tight junction and intestinal microbiota. *Journal of Functional Foods*. 2021. 87, doi: <https://doi.org/10.1016/j.jff.2021.104790>.
 4. Shen Y., Shen X., Cheng Y., Liu Y. Myricitrin pretreatment ameliorates mouse liver ischemia reperfusion injury. *International Immunopharmacology*. 2020. 89(A), doi: <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2020.107005>.
 5. Yan Z., Lin Z., Wu Y., Zhan J., Qi W., Lin J., et al. The protective effect of myricitrin in osteoarthritis: An in vitro and in vivo study. *International Immunopharmacology*. 2020. 84,106511, doi: 10.1016/j.intimp.2020.106511.
 6. Yang Y. L., Liu M., Cheng X., Li W. H., Zhang S. S., Wang Y. H., et al. Myricitrin blocks activation of NF-kappaB and MAPK signaling pathways to protect nigrostriatum neuron in LPS-stimulated mice. *J Neuroimmunol*. 2019. 337,577049, doi: 10.1016/j.jneuroim.2019.577049.
 7. Kurkin V. A., Zimenkina N. I. Features of Quantitative Estimation of Flavonoid Content in *Juglans Nigra* L. Barks Preparations. *Pharmacy & Pharmacology*. 2022;10(1),31-43, doi: <https://doi.org/10.19163/2307-9266-2022-10-1-31-43>.
 8. Nugroho A., Heryani H., Istikowati W. T. Quantitative determination of quercitrin and myricitrin in three different parts of *Euphorbia hirta* as bioflavonoid source for functional food. *Earth and Environmental Science*. 2020. 443(1),012042, doi: 10.1088/1755-1315/443/1/012042.
 9. Shervington L. A., Li B. S., Shervington A. A., Alpan N., Patel R., et al. A Comparative HPLC Analysis of Myricetin, Quercetin and Kaempferol Flavonoids Isolated From Gambian and Indian *Moringa oleifera* Leaves. *International Journal of Chemistry*. 2018. 10(4),28, doi: 10.5539/ijc.v10n4p28.
 10. Guideline I. H. T. Validation of analytical procedures: text and methodology. Q2 (R1). 2005. 1(20). 05.
 11. AOAC. Appendix K: Guidelines for Dietary Supplements and Botanicals. (Section 3.4.1- 3.4.2). 2013. 8-9.
-