

XÂY DỰNG PHƯƠNG PHÁP PHÂN TÍCH 04 HỢP CHẤT SAPONIN TRONG LOÀI BẦY LÁ MỘT HOA BẰNG PHƯƠNG PHÁP HPLC-DAD VÀ ÁP DỤNG ĐỊNH LƯỢNG TRÊN MỘT SỐ LOÀI THUỘC CHI *PARIS* L. THU HÁI Ở LAI CHÂU

Lê Thị Loan, Vũ Thị Diệp, Nguyễn Quỳnh Nga, Đỗ Thị Hà*

Viện Dược liệu

*Email: hado.nimms@gmail.com

(Nhận bài ngày 22 tháng 9 năm 2022)

Tóm tắt

Hàm lượng các hợp chất paris saponin D, paris saponin H, gracillin và polyphyllin D trong các mẫu Bầy lá một hoa được xác định bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao kết hợp với detector DAD (HPLC-DAD), sử dụng cột sắc ký pha đảo Agilent XDB C₁₈, rửa giải bằng hệ gradient acetonitril (A) và 0,1% phosphoric acid trong nước (B), tốc độ dòng 1,0 mL/phút tại bước sóng 203 nm. Phương pháp định lượng được thẩm định tính đặc hiệu, khoảng tuyến tính, độ đúng, LOD, LOQ để định lượng các chất đánh dấu trong 15 mẫu thân rễ Bầy lá một hoa thuộc 2 loài *Paris polyphylla* var. *chinensis* và *Paris vietnamensis* thu tại Lai Châu. Kết quả cho thấy tổng hàm lượng 4 chất trong các mẫu dao động từ $0,93 \pm 0,01\%$ đến $11,19 \pm 0,09\%$ tính theo khối lượng dược liệu khô kiệt. Bên cạnh đó, kết quả cũng cho thấy có sự khác biệt về thành phần và hàm lượng các saponin giữa các loài.

Từ khoá: *Paris vietnamensis*, *Paris polyphylla* var. *chinensis*, Saponin, Bầy lá một hoa.

Summary

Development of an HPLC-DAD Method for Four Saponins in *Paris polyphylla* and Quantitation in Several Species of *Paris* L. Genus Collected in Lai Chau Province

The content of compounds paris saponin D, paris saponin H, gracillin and polyphyllin D in the rhizomes of *Paris* were determined using an HPLC-DAD method, using an Agilent XDB C₁₈ reversed-phase column, a gradient condition of acetonitrile (A) and 0.1% phosphoric acid in water (B), the flow rate was 1.0 mL/min and the detection wavelengths were set at 203 nm. The method was validated for specificity, linearity, accuracy, LOD, LOQ to determine the quantity of markers in 15 samples belonging to two species *Paris polyphylla* and *Paris vietnamensis* collected in Lai Chau. The results showed that the total content of 4 substances in the samples ranged from $0.93 \pm 0.01\%$ to $11.19 \pm 0.09\%$. In addition, the results also showed that there were differences in the composition and content of saponins between species.

Keywords: *Paris vietnamensis*, *Paris polyphylla* var. *chinensis*, Saponins.

1. Đặt vấn đề

Bầy lá một hoa là vị thuốc quý được sử dụng từ lâu đời trong y học cổ truyền sử dụng trị rắn độc cắn và sâu bọ đốt, viêm não, viêm mù da, lao màng não, hen suyễn, trị yết hầu, bạch hầu, trẻ em lên sởi có viêm phổi, quai bị, lòi dom [1]. Dược điển Trung Quốc 2015 quy định Bầy lá một hoa là thân rễ của hai loài *Paris polyphylla* var. *yunnanensis* và *Paris polyphylla* var. *chinensis* [2]. Mặc dù vậy, một số loài khác thuộc chi này cũng có tác dụng đáng chú ý và được thu hái, sử dụng. Ở Việt Nam, tất cả các loài thuộc chi *Paris* đều đang bị khai thác để làm thuốc và bán qua biên giới khiến nguồn dược liệu này trong tự nhiên ngày càng cạn kiệt.

Thành phần hóa học chính của bầy lá một hoa là các saponin khung steroid, chủ yếu là các saponin với phần aglycon là diosgenin và pennogenin. Diosgenin saponin có các hợp chất đáng chú ý sau: diosgenin, chonglou saponin I (polyphyllin D, parissaponin I), chonglou saponin II (paris saponin II, paris II, polyphyllin II), dioscin (paris saponin III), paris IV, paris V, gracillin, polyphyllin C, E, F, trillin... Penogenin saponin gồm có các hợp chất đáng chú ý sau: chonglou saponin VI (paris saponin VI, paris VI), chonglou saponin VII (paris saponin VII, paris VII, Tg), paris saponin H (paris H) [3],[4].

Hiện nay, chưa có nhiều công bố về tiêu chuẩn đánh giá chất lượng dược liệu bầy lá một hoa. Dược điển Trung Quốc (2015) xây dựng tiêu chuẩn cho dược liệu bầy lá một hoa (2 loài *Paris polyphylla* var. *yunnanensis* và *Paris polyphylla* var. *chinensis*) với các chỉ tiêu: mô tả, soi bột, định tính bằng phương pháp sắc ký lớp mỏng (so sánh với dược liệu chuẩn), độ ẩm ($\leq 12,0\%$), độ tro toàn phần ($\leq 6,0\%$), tro không tan trong acid ($\leq 3,0\%$), định lượng các hợp chất polyphyllin D, paris saponin II, paris saponin VI, paris saponin VII (tổng hàm lượng $\geq 0,6\%$) [2]. Dược điển Việt Nam chưa xây dựng tiêu chuẩn cho dược liệu này. Nhóm nghiên cứu thuộc Viện nghiên cứu và phát triển vùng đã xây dựng tiêu chuẩn cho dược liệu bầy lá một hoa với các chỉ tiêu: mô tả, vi phẫu, soi bột, độ ẩm ($\leq 13,0\%$), độ tro toàn phần ($\leq 6,0\%$), tro không tan trong acid ($\leq 3,0\%$), định tính paris saponin D và gracillin bằng TLC, định lượng saponin toàn phần bằng phương pháp cân ($\geq 8,30\%$ tính theo dược liệu khô tuyệt đối) [5].

Kết quả khảo sát sơ bộ dấu vân tay hóa học của một số mẫu thân rễ bầy lá một hoa thu hái và trồng ở một số vùng ở Việt Nam của chúng tôi cho thấy các saponin được Dược điển Trung Quốc dùng làm chất đánh dấu (polyphyllin D, paris saponin II, paris saponin VI, paris saponin VII) có hàm lượng khá thấp và dao động nhiều (0 - 0,56%) [6], trong khi

đó các hợp chất paris saponin D, paris saponin H, gracillin có hàm lượng cao hơn, thể hiện là những saponin chính trong thân rễ bảy lá một hoa. Bên cạnh đó, đây còn là những hợp chất có hoạt tính, được sử dụng trong nhiều nghiên cứu để kiểm soát chất lượng dược liệu và cao chiết từ dược liệu này [7],[8],[9]. Do đó trong nghiên cứu này, chúng tôi xây dựng phương pháp định lượng 4 hợp chất paris saponin D, paris saponin H, gracillin và polyphyllin D trong dược liệu bảy lá một hoa thu ở một số huyện của tỉnh Lai Châu.

2. Đối tượng, nguyên vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Đối tượng

Đối tượng nghiên cứu là phần thân rễ của một số loài thuộc chi *Paris* được thu hái tự nhiên tại Lai Châu. Tên khoa học của các mẫu nghiên cứu được giám định bởi ThS. Nguyễn Quỳnh Nga, Trung tâm Tài nguyên Dược liệu, Viện Dược liệu.

Mẫu được rửa sạch, thái lát, sấy khô, xay nhỏ, bảo quản trong túi nilon kín, phục vụ quá trình nghiên cứu.

Bảng 1. Danh sách mẫu nghiên cứu

STT	Ký hiệu mẫu phân tích	Số mắt trên thân rễ	Địa điểm thu thập	Ngày thu thập
Bảy lá một hoa Trung Quốc: <i>Paris chinensis</i> Franch. (Syn: <i>Paris polyphylla</i> var. <i>chinensis</i> (Franch.) H.Hara)				
1	P01	7 mắt	Tân Uyên	12.09.2019
2	P02	7 mắt	Thân Uyên	13.09.2019
3	P03	9 mắt	Tân Uyên	12.09.2019
4	P04	7 mắt	Sìn Hồ	14.09.2019
5	P07	7 mắt	Mường Tè	15.09.2019
6	P08	7 mắt	Nậm Nhùn	16.09.2019
7	P09	7 mắt	Tam Đường	17.09.2019
8	P15	7 mắt	Phong Thổ	20.09.2019
Bảy lá một hoa việt nam: <i>Paris vietnamensis</i> (Takht.) H.Li				
9	P05	7 mắt	Tân Uyên	12.09.2019
10	P06	7 mắt	Thân Uyên	13.09.2019
11	P13	7 mắt	Sìn Hồ	14.09.2019
12	P10	7 mắt	Nậm Nhùn	16.09.2019
13	P11	7-8 mắt	Tam Đường	17.09.2019
14	P12	7 mắt	Phong Thổ	20.09.2019
15	P16	7 mắt	Mường Tè	13.09.2019

2.2. Nguyên vật liệu

Chất chuẩn, chất đối chiếu: chất chuẩn polyphyllin D đặt mua của công ty Chengdu Biopurify Phytochemicals Ltd, số lô: PRF8051026, hàm lượng: 99,92% (khan), độ ẩm: 1,38%. Các chất đối chiếu: paris saponin D (hàm lượng 98,72%), gracillin (hàm lượng 99,44%), paris saponin H (hàm lượng 98,74%) được phân lập từ loài *P. polyphylla* var. *chinensis*, [10],[11].

Dung môi, hóa chất: Dung môi, hoá chất dùng cho chiết xuất dược liệu (methanol) đạt yêu cầu hóa chất tinh khiết phân tích (P.A.). Các dung môi dùng cho phân tích sắc ký HPLC (methanol, acetonitril, acid phosphoric) đều của hãng Merck, nước cất hai lần đã deion dùng làm pha động trong phân tích HPLC.

2.3. Thiết bị, dụng cụ

Hệ thống máy sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) (Shimadzu, Nhật Bản), bao gồm bơm LC-20AD, detector SPD-M20A DAD, bộ phận tiêm mẫu tự động SIL-20A, lò ổn nhiệt CTO-20A (Shimadzu, Japan), cột Zorbax XDB C₁₈ (4,6 x 250 mm, 5 µm, Agilent Corp). Cân phân tích Precisa 262SMA-FR,... và các thiết bị dụng cụ khác.

2.4. Phương pháp nghiên cứu

Tiến hành khảo sát các điều kiện sắc ký: pha tĩnh, pha động (dung môi, điều kiện rửa giải, tốc

độ dòng), nhiệt độ lò cột, thể tích tiêm mẫu và nghiên cứu tối ưu hóa quy trình chuẩn bị mẫu, phương pháp định lượng các saponin trong thân rễ bảy lá một hoa được xây dựng như sau:

Chuẩn bị mẫu

Dung dịch chuẩn và dung dịch chất đối chiếu: Cân chính xác khoảng 5 mg mỗi chất chuẩn/chất đối chiếu (bằng cân phân tích 5 chữ số), pha trong methanol để thu được dung dịch chuẩn gốc có nồng độ khoảng 1,00 mg/ml. Pha loãng các dung dịch chuẩn gốc với methanol để thu được các dung dịch chuẩn làm việc có nồng độ thích hợp: paris saponin D: 20 - 480 µg/ml, paris saponin H: 10,4 - 208,0 µg/ml, gracillin: 50 - 350 µg/ml, polyphyllin D: 2 - 256 µg/ml.

Dung dịch thử: Dược liệu thân rễ bảy lá một hoa được xay thành bột thô, rây qua rây 0,25 mm, trộn đều. Cân chính xác khoảng 0,20 g bột dược liệu (bằng cân phân tích 4 chữ số), thêm chính xác 25 ml ethanol 70%, cân khối lượng bình, chiết hồi lưu 60 phút. Để nguội về nhiệt độ phòng, cân lại, bổ sung khối lượng bị mất bằng ethanol 70% lắc đều. Ly tâm lấy dịch. Các dung dịch được lọc qua màng lọc kích thước 0,45 µm trước khi triển khai sắc ký.

Điều kiện sắc ký

Hệ thống sắc ký HPLC-DAD Shimadzu. Cột

Agilent Zorbax XDB C₁₈ (5µm, 4,5 x 250mm). Nhiệt độ lò cột: 40°C. Tốc độ dòng: 1,0 mL/phút. Pha động: Acetonitril (A)- acid phosphoric 0,1% trong nước (B), rửa giải theo chương trình sau: 0 phút 38% A, 10 phút: 38% A, 30 phút: 45% A, 32 phút: 95% A, 40 phút: 95% A. Thể tích tiêm 20 µl. Bước sóng phát hiện 203 nm.

Thẩm định phương pháp định lượng: Thẩm định các chỉ tiêu: tính đặc hiệu, tính thích hợp của hệ thống, khoảng tuyến tính, độ đúng, độ lặp lại, giới hạn phát hiện (LOD), giới hạn định lượng (LOQ) [12],[13]. Mẫu thử dùng để thẩm định phương pháp là mẫu P01.

Tính đặc hiệu: tiến hành sắc ký các loại mẫu sau: mẫu trắng, mẫu dung dịch đối chiếu, mẫu dung dịch thử: mỗi mẫu tiêm 01 lần. Yêu cầu: Sắc ký đồ của dung dịch thử cho 1 pic có thời gian lưu tương ứng đối với pic của chất chuẩn trên sắc ký đồ các mẫu chuẩn. Trên sắc ký đồ dung dịch thử, nếu xuất hiện thêm các pic khác không phải pic của chất chuẩn thì phải tách hoàn toàn khỏi pic và đáp ứng các yêu cầu chung của phương pháp sắc ký lỏng được quy định trong Dược điển.

Tính thích hợp của hệ thống: tiêm lặp lại 06 lần 01 dung dịch thử, tiến hành sắc ký. Yêu cầu: Giá trị RSD của thời gian lưu ≤ 1,0%, của diện tích pic ≤ 2,0%. Hệ số đối xứng của pic chuẩn: T < 2,0.

Độ đúng: được xác định thông qua độ thu hồi, bằng phương pháp thêm chuẩn. Chuẩn bị các mẫu thêm chuẩn bằng cách cân chính xác khoảng 0,20 g bột được liệu, thêm một lượng chính xác chất cần phân tích, tiến hành chiết như mô tả ở chuẩn bị mẫu. Lượng chất chuẩn thêm vào tương ứng ở 3 mức nồng độ: paris saponin D (1,50; 3,00; 7,50 µg/ml), paris saponin H (2,50; 5,00; 12,50 µg/ml), gracillin (10,50; 21,00; 52,50 µg/ml), polyphyllin D (2,10; 4,20; 10,50 µg/ml), mỗi nồng độ lặp lại 3 lần.

Độ lặp lại: tiến hành lặp lại 06 lần trên cùng 1 mẫu thử P01. Độ lặp lại của phương pháp được xác định bằng giá trị RSD (%) kết quả định lượng hàm lượng chất cần phân tích trong mẫu.

Giới hạn phát hiện (LOD): Tiến hành pha loãng dung dịch hỗn hợp chuẩn và phân tích HPLC đến khi tín hiệu của chất định phân tích trên sắc ký đồ thu được có tỷ lệ S/N (tín hiệu/nhiều) = 2H/h đạt khoảng từ 2 - 3, trong đó H là chiều cao pic định phân tích, h là chiều cao tín hiệu nhiễu nền lớn nhất. Nồng độ xác định được là giới hạn phát hiện (LOD) của phương pháp ứng với từng chất định phân tích.

Giới hạn định lượng (LOQ) của phương pháp được xác định bằng cách pha loãng dần dung dịch hỗn hợp chuẩn và phân tích HPLC đến khi tín hiệu của chất cần phân tích trên sắc ký đồ thu được có tỷ lệ S/N (tín hiệu/nhiều) nằm trong khoảng 9-10.

Định lượng mẫu thử: Hàm lượng chất đối chiếu trong mẫu bầy lá một hoa được xác định bằng quy trình đã được xây dựng. Nồng độ của chất cần phân tích trong dung dịch thử được xác định dựa trên công thức:

$$C (\mu\text{g/ml}) = \frac{S-b}{a} \times \frac{H}{100}$$

Với S là diện tích pic chất cần phân tích, a, b là các hệ số của phương trình đường chuẩn, H là độ tinh khiết của chất đối chiếu (%).

Hàm lượng chất phân tích trong dược liệu được xác định dựa trên công thức:

$$X (\%) = \frac{C \times V \times 100 \times k}{m \times 1000000} \times \frac{100}{100-x}$$

Trong đó:

X: hàm lượng chất cần phân tích trong dược liệu (%);

C: nồng độ chất cần phân tích trong dung dịch thử (µg/ml);

V: thể tích dung dịch thử (ml);

m: khối lượng dược liệu (g);

x: độ ẩm dược liệu (%);

k: hệ số pha loãng của dung dịch mẫu thử.

Thực hiện xác định hàm lượng của mỗi mẫu 3 lần, kết quả là trung bình ± SD của các giá trị thực nghiệm.

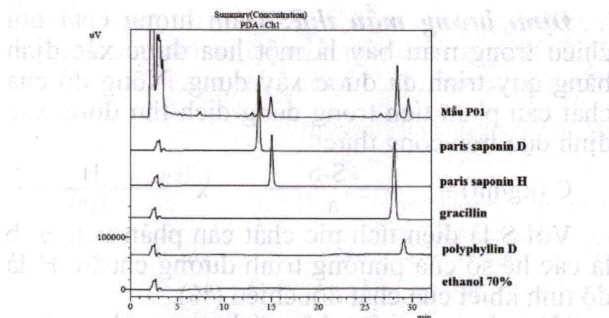
3. Kết quả

3.1. Xây dựng phương pháp định lượng

Khảo sát các điều kiện sắc ký: pha tĩnh, pha động (dung môi, điều kiện rửa giải, tốc độ dòng), nhiệt độ lò cột, thể tích tiêm mẫu để lựa chọn điều kiện sắc ký cho các pic tách nhau rõ ràng, các pic cân xứng,... đạt điều kiện phân tích. Kết quả đã lựa chọn được điều kiện như sau: Hệ thống sắc ký HPLC-DAD Shimadzu. Pha tĩnh: Cột Agilent Zorbax XDB C₁₈ (5µm, 4,5 x 250mm). Nhiệt độ lò cột: 40°C. Tốc độ dòng: 1,0 mL/phút. Pha động: Acetonitril (A)- acid phosphoric 0,1% trong nước (B), rửa giải theo chương trình sau: 0 phút 38% A, 10 phút: 38% A, 30 phút: 45% A, 32 phút: 95% A, 40 phút: 95% A. Thể tích tiêm 20 µl. Bước sóng phát hiện 203 nm.

Khảo sát các điều kiện về dung môi chiết (ethanol, ethanol 70%, ethanol 50%, methanol, methanol 70%, methanol 50%), tỷ lệ dung môi/dược liệu (50/1, 125/1, 250/1), phương pháp chiết (siêu âm, hồi lưu), số lần chiết (1 lần, 2 lần), thời gian chiết (30, 60, 90 phút) để lựa chọn điều kiện chiết xuất thu được hiệu suất chiết suất cao và ít tạp. Kết quả đã lựa chọn được điều kiện chuẩn bị mẫu như sau: dung môi ethanol 70%, chiết hồi lưu, tỷ lệ dung môi/dược liệu: 125/1, số lần chiết: 1 lần, thời gian chiết: 60 phút.

Tiến hành sắc ký các loại mẫu trắng, mẫu thử và mẫu chuẩn, mỗi mẫu phân tích 01 lần theo quy trình phân tích. Ghi lại sắc ký đồ, xác định thời gian lưu của pic chất chuẩn trong sắc ký đồ mẫu thử và mẫu chuẩn. Kết quả thu được được trình bày ở Hình 1.



Hình 1. Sắc ký đồ HPLC của mẫu thử và các dung dịch chuẩn

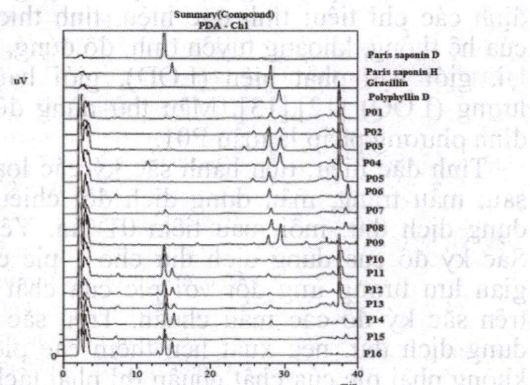
3.2. Thẩm định quy trình định lượng

Sắc ký đồ HPLC của các mẫu thử được trình bày ở Hình 2.

Kết quả cho thấy sắc ký đồ của dung dịch thử cho 1 pic có thời gian lưu tương ứng với pic của chất cần phân tích trong sắc ký đồ mẫu chuẩn. Trên sắc ký đồ các dung dịch mẫu thử, nếu có xuất hiện pic khác không phải là pic chất cần phân tích thì đều tách hoàn toàn khỏi pic của chất cần phân tích và đáp ứng các yêu cầu chung của phương pháp sắc ký lỏng theo quy định của Dược điển Việt Nam V. Pic của chất cần phân tích trong sắc ký đồ dung dịch chuẩn và thử tinh khiết. Hệ số tinh khiết pic chất cần phân tích

trong sắc ký đồ dung dịch chuẩn và dung dịch thử xấp xỉ 1,0. Như vậy, điều kiện sắc ký đã khảo sát phù hợp để phân tích các chất paris saponin D, paris saponin H, gracillin và polyphyllin D trong dược liệu bầy lá một hoa.

Kết quả thẩm định phương pháp định lượng được trình bày tóm tắt ở Bảng 2.



Hình 2. Sắc ký đồ HPLC của các mẫu thử và các dung dịch chuẩn
P01,02,03,04,07,08,09,15: các mẫu *Paris polyphylla* var. *chinensis*
P05,06,10,11,12,13,16: các mẫu *Paris vietnamensis*

Bảng 2. Tóm tắt kết quả thẩm định phương pháp định lượng

Chỉ tiêu	Paris saponin D	Paris saponin H	Gracillin	Polyphyllin D
Thời gian lưu (phút)	13,679 ± 0,015	14,825 ± 0,064	28,021 ± 0,0178	29,360 ± 0,083
Độ đặc hiệu	RSD thời gian lưu = 0,11% RSD diện tích pic = 0,71%	RSD thời gian lưu = 0,43% RSD diện tích pic = 1,26%	RSD thời gian lưu = 0,06% RSD diện tích pic = 0,32%	RSD thời gian lưu = 0,28% RSD diện tích pic = 1,64%
Khoảng tuyến tính (µg/ml)	20 - 480	10,4 - 208	50 - 350	2,0 - 256
Phương trình hồi quy	y = 4982,2x - 12824	y = 5541,9x - 5377,5	y = 3971,8x + 138275	y = 6556,7x + 45,545
Hệ số tương quan (r ²)	0,9999	0,9999	0,9999	0,9999
Độ lặp lại	RSD = 1,61%	RSD = 0,99%	RSD = 1,89%	RSD = 1,72%
Độ thu hồi	98,51% - 98,63%	98,12% - 99,07%	98,56% - 98,82%	98,81% - 99,21%
LOD (µg/ml)	0,62	0,52	1,00	0,50
LOQ (µg/ml)	2,05	1,72	3,30	1,65

3.2. Định lượng saponin trong các mẫu dược liệu bầy lá một hoa

Tiến hành định lượng theo mô tả ở mục 2.2., kết quả định lượng được trình bày ở Bảng 3.

Bảng 3. Hàm lượng các chất đánh dấu trong các mẫu bầy lá một hoa

STT	Ký hiệu mẫu phân tích	Số mắt trên thân rễ	Địa điểm thu thập	Hàm lượng (%)				
				Paris saponin H	Paris saponin D	Gracillin	Polyphyllin D	Tổng (%)
	P. polyphylla var. chinensis							
1	P01	7 mắt	Tân Uyên	0,24 ± 0,004	0,36 ± 0,002	1,66 ± 0,005	0,61 ± 0,004	2,87 ± 0,01
2	P02	7 mắt	Than Uyên	0,09 ± 0,001	0,16 ± 0,002	1,56 ± 0,006	1,35 ± 0,010	3,16 ± 0,02
3	P03	9 mắt	Tân Uyên	0,13 ± 0,001	0,11 ± 0,003	8,06 ± 0,018	2,88 ± 0,012	11,18 ± 0,03
4	P04	7 mắt	Sìn Hồ	0,12 ± 0,001	0,26 ± 0,003	2,80 ± 0,019	3,12 ± 0,009	6,30 ± 0,01
5	P07	7 mắt	Mường Tè	0,59 ± 0,006	-	0,39 ± 0,006	0,02 ± 0,000	1,00 ± 0,01
6	P08	7 mắt	Nậm Nhùn	0,88 ± 0,005	-	1,79 ± 0,009	0,03 ± 0,000	2,70 ± 0,01
7	P09	7 mắt	Tam Đường	0,08 ± 0,001	0,17 ± 0,001	1,19 ± 0,008	2,84 ± 0,009	4,28 ± 0,02
8	P15	7 mắt	Phong Thổ	0,67 ± 0,001	0,20 ± 0,001	-	0,05 ± 0,000	0,93 ± 0,01
	P. vietnamensis							
9	P05	7 mắt	Tân Uyên	0,13 ± 0,001	0,10 ± 0,001	3,12 ± 0,011	-	3,35 ± 0,01
10	P06	7 mắt	Than Uyên	0,29 ± 0,001	0,06 ± 0,001	1,07 ± 0,001	-	1,42 ± 0,01

STT	Ký hiệu mẫu phân tích	Số mắt trên thân rễ	Địa điểm thu thập	Hàm lượng (%)				
				Paris saponin H	Paris saponin D	Gracillin	Polyphyllin D	Tổng (%)
11	P13	7 mắt	Sin Hồ	4,86 ± 0,042	1,08 ± 0,002	0,68 ± 0,005	-	6,61 ± 0,05
12	P16	7 mắt	Mường Tè	3,55 ± 0,038	1,47 ± 0,005	0,02 ± 0,001	-	5,05 ± 0,04
13	P10	7 mắt	Nậm Nhùn	4,29 ± 0,018	0,57 ± 0,001	-	-	4,86 ± 0,03
14	P11	7,8 mắt	Tam Đường	5,63 ± 0,032	1,90 ± 0,009	0,55 ± 0,001	-	8,08 ± 0,04
15	P12	7 mắt	Phong Thổ	3,69 ± 0,011	1,72 ± 0,008	0,35 ± 0,005	-	5,75 ± 0,02

* Ghi chú: “-”: không phát hiện được.

Kết quả định lượng cho thấy hàm lượng saponin trong các mẫu bầy lá một hoa dao động khá nhiều, hàm lượng paris saponin D dao động từ 0,09 - 5,60%, paris saponin H từ 0 - 1,90%, gracillin từ 0 - 8,11% và polyphyllin D từ 0 - 3,11% tính theo khối lượng dược liệu khô kiệt. Tổng hàm lượng 4 hợp chất này trong các mẫu nghiên cứu có sự khác biệt rất lớn, trong đó thấp nhất là mẫu P15 với hàm lượng $0,93 \pm 0,01\%$ và cao nhất là mẫu P03, có hàm lượng $11,19 \pm 0,03\%$ tính theo khối lượng dược liệu khô kiệt.

4. Bàn luận

Kết quả định lượng cho thấy tổng hàm lượng 4 saponin trong các mẫu nghiên cứu có sự khác biệt rất lớn, trong đó thấp nhất là mẫu P15 với hàm lượng $0,93 \pm 0,01\%$ và cao nhất là mẫu P03, có hàm lượng $11,19 \pm 0,09\%$ tính theo khối lượng dược liệu khô kiệt. Hàm lượng saponin trong mẫu P03 cao nhất có thể liên quan tới số mắt/đốt trên thân rễ do mẫu P03 có 9 mắt/đốt trên thân rễ trong khi các mẫu còn lại chỉ có 7 mắt/đốt.

Các loài thuộc chi bầy lá một hoa (*Paris* L.) có thân rễ chính nằm ngang và các rễ phụ mọc ra từ thân rễ chính. Vào khoảng cuối mùa đông đầu mùa xuân hàng năm từ đầu thân rễ chính này chồi mầm mới, chồi mầm phát triển thành 1 - 2(3) thân trên mặt đất. Khi thân trên mặt đất, tàn lụi vào mùa đông sẽ để lại các sẹo (mắt) trên thân rễ. Căn cứ vào số sẹo (mắt) trên thân rễ có thể xác định được số năm tuổi của cây thu thập trong tự nhiên với độ chính xác tương đối.

Đáng chú ý là các mẫu bầy lá một hoa phân tích không chỉ có sự khác biệt về hàm lượng các chất phân tích mà thành phần hóa học cũng có sự khác biệt đáng kể. Kết quả định lượng cho thấy hàm lượng saponin trong các mẫu bầy lá một hoa có sự khác biệt về thành phần hóa học giữa 2 loài. Các mẫu thuộc loài *P. polyphylla* var. *chinensis* (PP1-5) đều có cả 4 loại saponin paris saponin H, paris saponin D, gracillin và polyphyllin D với tổng hàm lượng 4 loại saponin này đều cao hơn 2% và cao nhất là 6,3% (đối với cây có 7 mắt trên thân rễ). Polyphyllin D và gracillin tuy có sự dao động giữa các mẫu nhưng được xem là saponin chính trong các mẫu của loài *P. polyphylla* var. *chinensis* với hàm lượng lần lượt là 0,61 - 3,12% và 1,56 - 2,8%. Trong khi đó, các

mẫu thân rễ thuộc loài *P. vietnamensis* chỉ phát hiện 3 trong số 4 loại saponin khảo sát là: paris saponin H, paris saponin D và gracillin. Tuy thiếu polyphyllin D nhưng tổng hàm lượng của 3 saponin này trong các mẫu *P. vietnamensis* đều cao hơn 3%, cao nhất là 8,08%. Đặc biệt hàm lượng paris saponin H cao hơn hẳn 2 saponin còn lại ở hầu hết các mẫu từ 3,02% đến 5,63%.

So sánh các mẫu thuộc cùng loài thu thập tại các địa điểm khác nhau cho thấy đối với loài bầy lá một hoa - *P. polyphylla* var. *chinensis* thu mẫu thu thập tại Tân Uyên, Sin Hồ và Tam Đường có hàm lượng saponin tổng số cũng như hàm lượng polyphyllin D và gracillin cao so với các mẫu còn lại. Riêng mẫu P03 thu thập tại Tân Uyên có hàm lượng các chất trên cao nhất có thể cũng do tuổi của mẫu là cao nhất. Đối với loài bầy lá một hoa việt nam - *P. vietnamensis* các mẫu thu thập tại Tam Đường, Phong Thổ và Sin Hồ có hàm lượng saponin tổng số và paris saponin H cao hơn các mẫu còn lại, cao nhất là mẫu thu thập tại Tam Đường (lần lượt là 8,08%, 5,63; 1,9; 0,55%).

Tuy nhiên để có những kết luận chính xác hơn về hàm lượng hoạt chất hay chất lượng dược liệu, cần nghiên cứu trên số lượng mẫu lớn hơn để đảm bảo tính thống kê, đánh giá các yếu tố khác như tuổi mẫu, vùng thu mẫu, thời gian thu hái mẫu. Bên cạnh đó, đối với loài *Paris vietnamensis* (Takht.) H.Li. cần có những nghiên cứu thêm về thành phần hóa học để lựa chọn được các chất đánh dấu phù hợp.

Theo tham khảo của nhóm nghiên cứu, cho đến nay, có rất ít công bố về định lượng saponin trong thân rễ bầy lá một hoa thu hái tại Việt Nam. Các nghiên cứu về định lượng thân rễ các loài thuộc chi *Paris* trên thế giới còn chưa nhiều, chủ yếu tập trung trên loài *Paris polyphylla*, hầu hết được tiến hành trên các mẫu dược liệu trồng và thu hái tại Trung Quốc. Các kết quả nghiên cứu đã được công bố cho thấy hàm lượng saponin trong các mẫu *Paris* có sự khác biệt giữa các loài, vùng trồng và thu hái với tổng hàm lượng các saponin chính dao động từ khoảng 1 - 10%. Cụ thể như sau:

Nghiên cứu của Liang Yuyong và cs. năm 2012 định lượng 9 hợp chất paris VII, (25R)-5-en-spirost-3 β ,17 α -diol-3-O- α -L-rhamnopyranosyl-

(1→2)[α -L-rhamnopyranosyl(1→4)] - β -D-glycopyranosid (PGRR), paris-H, paris VI, paris II, paris II, gracillin, paris I và paris V trong 8 mẫu *P. polyphylla* trồng ở các tỉnh khác nhau của Trung Quốc, kết quả cho thấy tổng hàm lượng các saponin này trong các mẫu dao động từ 0,99 - 9,62% [14].

Nghiên cứu năm 2006 của Huang Yun và cs. định lượng 11 hợp chất saponin steroid trong thân rễ của các loài thuộc chi *Paris* cho thấy tổng hàm lượng các chất này trong các mẫu *P. polyphylla* var. *chinensis* dao động từ 2,55 - 6,14% [15].

Theo kết quả nghiên cứu của Yuanguai Yang và cs. năm 2016 nghiên cứu về định lượng và xây dựng dấu vân tay cho 6 loài *Paris* cho thấy thấy hàm lượng Polyphyllin I và II ở một mẫu *Paris polyphylla* Smith var. *chinensis* lần lượt là 4,69 và 1,84 mg/g, trong khi đó mẫu khác cùng loài không phát hiện được 2 chất này [16]. Nghiên cứu này cũng đánh giá hàm lượng của 11 mẫu thuộc loài *Paris polyphylla* Smith var. *yunnanensis*, kết quả cho thấy hàm lượng polyphyllin I dao động từ 3,63 đến 15,36 mg/g và polyphyllin II từ 3,60 đến 7,15 mg/g, tổng hàm lượng 2 chất này từ 8,07 - 28,94 mg/g [16].

Kết quả nghiên cứu của Huang Yuan-Yuan và cs. năm 2017 cho thấy hàm lượng saponin trong các mẫu thuộc loài *P. polyphylla* var. *chinensis* có sự khác biệt khá lớn giữa các mẫu thu tại các vùng khác nhau. Cụ thể, tổng hàm lượng polyphyllin I, II, VI, VII, H, dioscin và gracillin dao động từ 0,116 - 4,577% tính theo khối lượng dược liệu khô kiệt. Trong số 19 mẫu nghiên cứu thuộc loài này, có 10 mẫu không phát hiện được polyphyllin D, các mẫu còn lại có hàm lượng từ 0,022 - 1,292% tính theo khối lượng dược liệu khô kiệt. Đối với hợp chất gracillin, có 10 mẫu không phát hiện được, các mẫu còn lại có hàm lượng dao động từ 0,041 - 1,193% [17].

Kết quả nghiên cứu trước đây của chúng tôi

cho thấy tổng hàm lượng 4 hợp chất này trong các mẫu *Paris polyphylla* var. *chinensis* thu ở một số vùng ở Việt Nam dao động từ 2,45 $\pm$ 0,05% đến 10,36 $\pm$ 0,12% tính theo khối lượng dược liệu khô kiệt, nhìn chung cao hơn các mẫu trong nghiên cứu này [18]. Tuy nhiên, hàm lượng từng saponin trong các mẫu dược liệu cũng có sự dao động đáng kể.

Như vậy, kết quả đánh giá về hàm lượng các saponin chính trong các mẫu thu tại các vùng khác nhau là căn cứ để lựa chọn loài để bảo tồn, nhân giống và nghiên cứu phát triển phục vụ nghiên cứu, sản xuất và nhu cầu sử dụng dược liệu của nhân dân.

5. Kết luận

Trong nghiên cứu này chúng tôi đã đánh giá chất lượng các mẫu dược liệu bầy lá một hoa thuộc 2 loài bầy lá một hoa Việt Nam - *Paris vietnamensis* (Takht.) H.Li. và bầy lá một hoa Trung Quốc - *Paris polyphylla* var. *chinensis* (Franch.) H. Hara) thu thập tại 7/7 huyện của tỉnh Lai Châu bằng HPLC-DAD dựa trên hàm lượng 4 hợp chất có hoạt tính sinh học được nghiên cứu nhiều ở các loài thuộc chi *Paris* là: paris saponin D, paris saponin H, gracillin và polyphyllin D. Kết quả cho thấy các mẫu thân rễ thuộc loài *Paris polyphylla* var. *chinensis* Sm. có chứa cả 4 loại saponin kể trên trong khi các mẫu thuộc loài *Paris vietnamensis* (Takht.) H.Li. thiếu thành phần polyphyllin D nhưng lại có hàm lượng paris saponin H cao. Sự vắng mặt của polyphyllin D và hàm lượng paris saponin H cao vượt trội có thể là đặc điểm đặc trưng về thành phần hóa học giúp phân biệt loài bầy lá một hoa Việt Nam - *P. vietnamensis* với bầy lá một hoa - *P. polyphylla* var. *chinensis*.

Lời cảm ơn: Bài báo là sản phẩm của đề tài cấp Sở Khoa học công nghệ Lai Châu "Nghiên cứu bảo tồn và phát triển một số loài cây thuốc quý hiếm có giá trị kinh tế thuộc chi bầy lá một hoa tại tỉnh Lai Châu" mã số: 208/ĐTLC.03/18.

Tài liệu tham khảo

1. Võ Văn Chi (2021), Từ điển Cây thuốc Việt Nam (bộ mới), NXB Y học, 134-135.
2. The Pharmacopoeia Commission of the Ministry of Health of the People's Republic of China (2015), *Pharmacopoeia of the People's Republic of China, Paridis Rhizoma (Chonglou, Paris root)*, 312.
3. Wei J. C., Gao W. Y., Yan X. D., Wang Y., Jing S. S., Xiao P. G. (2014), Chemical constituents of plants from the Genus *Paris*, *Chemistry & Biodiversity*, 11(9), 1277-1297.
4. Zhang J. Y., Wang Y. Z., Zhao Y. L., Yang S. B., Zuo Z. T., Yang M. Q., Zhang J., Yang W. Z., Yang T. M., Jin H. (2011), Phytochemicals and bioactivities of *Paris* species, *Journal of Asian Natural Products Research*, 13(7), 670-681.
5. Nguyễn Thị Thu (2017), Khai thác và phát triển nguồn gen bầy lá một hoa (*Paris chinensis* Franch.) và Huyết rồng lảo (*Spatholobus suberectus* Dunn.) làm nguyên liệu sản xuất thuốc.
6. Mã Văn Kiều, Cao Ngọc Anh, Lê Thị Loan, Đỗ Thị Hà, Thái Nguyễn Hùng Thu (2018), Xây dựng phương pháp định lượng một số saponin trong cây bầy lá một hoa Việt Nam bằng HPLC-PDA, *Tạp chí Dược liệu*, 23(4), 235-240.
7. Ju J. F., Zhu Z. M., Du Z. K. (2015), Optimization of the extraction technology of saponins from *Paris polyphylla* with central composite design-response surface method, *China Pharmacy*, 28, 3967-3969.
8. 张琳, 梁波 (2009), Method for preparing *Paris polyphylla* total saponin, Google Patents: CN 100500196C.
9. Liu Z., Wang J., Gao W., Man S., Wang Y., Liu C. (2013), Preparative separation and purification of steroidal saponins in *Paris polyphylla* var. *yunnanensis* by macroporous adsorption resins, *Pharmaceutical biology*, 51(7), 899-905.
10. Cao Ngọc Anh, Đỗ Thị Hà, Nguyễn Thị Thu, Lê Thị Loan, Thái Nguyễn Hùng Thu (2019), Điều chế và thiết lập chuẩn gracillin từ thân rễ bầy lá một hoa (*Paris polyphylla* var. *chinensis* Smith), *Tạp chí Dược học*, 59(6), 26-32.
11. Đỗ Thị Hà, Cao Ngọc Anh, Nguyễn Thị Thu, Lê Thị Loan, Nguyễn Minh Khởi, Thái Nguyễn Hùng Thu (2019), Điều chế và thiết lập chuẩn paris saponin H từ thân rễ bầy lá một hoa, *Tạp chí Dược liệu*, 24(2), 67-73.
12. Aoac International (2012), *AOAC Guidelines for Single Laboratory Validation of*

Chemical Methods for Dietary Supplements and Botanicals. 13. ICH Harmonised Tripartite Guideline (2005), *Validation of analytical procedures: text and methodology*, Q2 (R1), 1 (20), 05. 14. Liang Y., Liu Z., Gao W., Man S. (2012), Determination of nine steroidal saponins in *Paris polyphylla* from different areas of Guizhou province by HPLC, *China Journal of Chinese Materia Medica*, 37(15), 2309-2312. 15. Huang Y., Cui L. J., Liu W. N., Wang Q. (2006), Quantitative analysis of steroidal saponins in Chinese material medica *Rhizoma Paridis* by HPLC-ELSD, *China Journal of Chinese Materia Medica*, 31(15), 1230-1233. 16. Yang Y., Zhang J., Jin H., Zhang J., Wang Y. (2016), Quantitative analysis in combination with fingerprint technology and chemometric analysis applied for evaluating six species of wild *Paris* using UHPLC-UV-MS, *Journal of Analytical Methods in Chemistry*. 17. Huang Y. Y., Liu D. H., Peng H. S., Hao Q. X., Chen M. L., Zhang A. Z., Chen M., Kang L. P., Huang L. Q. (2017), Determination of eight steroidal saponins in 15 kinds of genus *Paris*, *China Journal of Chinese Materia Medica*, 42(18), 3443-3451. 18. Đỗ Thị Hà (2019), Đề tài KHCN cấp Bộ Y tế "Nghiên cứu cây bầy lá một hoa (*Paris polyphylla* var. *chinensis* Smith.) theo hướng hỗ trợ điều trị ung thư vú".

Tạp chí Dược liệu, tập 28, số 1/2023 (Trang 15 - 20)

PHÂN LẬP VÀ THIẾT LẬP CHẤT ĐỐI CHIẾU ORCINOL GLUCOSID TỪ THÂN RỄ SÂM CAU

**Nguyễn Thị Ánh Nguyệt¹, Nguyễn Huỳnh Thanh Tuyền¹, Lê Văn Huân²,
Lê Thị Hương Lan¹, Phan Văn Hồ Nam¹, Trần Thị Vân Anh^{1*}**

¹Khoa Dược - Đại học Y Dược thành phố Hồ Chí Minh;

²Khoa Dược - Trường Đại học Bình Dương

*Email: ttvananh@ump.edu.vn

(Nhận bài ngày 09 tháng 01 năm 2023)

Tóm tắt

Thân rễ sâm cau (*Rhizoma curculiginis*) là vị thuốc sử dụng phổ biến trong y học cổ truyền điều trị chứng liệt dương, yếu sinh lý, đau nhức xương khớp... Nghiên cứu sâm cau ở Việt Nam cho thấy orcinol glucosid (OG) là 1 trong những thành phần hóa học chính. Nghiên cứu này được thực hiện với mục tiêu phân lập và thiết lập chất đối chiếu (CDC) orcinol glucosid (OG) cần thiết cho việc tiêu chuẩn hóa dược liệu sâm cau (*Rhizoma curculiginis*). Hợp chất OG (1,1 g) đã được phân lập từ thân rễ sâm cau bằng các phương pháp sắc kí. Cấu trúc của OG được xác định bằng phổ UV, IR, MS và NMR. Kết quả thiết lập CDC theo ISO Guide 35 và ISO Guide 13528 cho thấy OG đạt hàm lượng với giá trị ấn định là 98,57% (n = 18; s = 0,01; U = 0,02), đủ điều kiện thiết lập chất chuẩn.

Từ khoá: Chuẩn đối chiếu, Sâm cau, Orcinol glucosid.

Summary

Isolation and Establishment of the Reference Standard for Orcinol Glucoside from *Rhizoma curculiginis*

Rhizoma curculiginis is used popularly in traditional medicine for improving physiological function of men and treatment of rheumatism... *Rhizoma curculiginis* in Vietnam has orcinol glucoside as the main constituent. This study was carried out with the aim of isolation and establishment orcinol glucoside (OG) as the reference standard for the standardization of *Rhizoma curculiginis*. Orcinol glucoside (1,1 g) was isolated from *Rhizoma curculiginis* using column chromatographic methods. The chemical structure of OG was elucidated using UV, IR, MS, and NMR spectroscopic techniques. The result of establishment for the reference standard following by ISO Guide 35 and ISO Guide 13528 showed that the content of OG was 98.57% (n = 18; s = 0.01; U = 0.02), meet the requirements of a reference standard.

Keywords: *Rhizoma curculiginis*, Reference standard, Orcinol glucoside.

1. Đặt vấn đề

Sâm cau (*Curculigo orchioides* Gaertn., họ Hypoxidaceae) là một cây thuốc được sử dụng phổ biến trong các bài thuốc cổ truyền của Việt Nam, Trung Quốc, Ấn Độ. Thân rễ sâm cau đã được sử dụng rộng rãi như một loại thuốc bổ để điều trị liệt dương, hen suyễn, tinh trùng lạnh, đau lưng, mỏi gối, và tê chân tay [1]. Các nghiên cứu cho thấy thân rễ sâm cau có các thành phần hóa học gồm saponin cycloartan [2], phenolic glycosid [3],[4] và chlorophenyl glucosid [5],[6].

Nghiên cứu về thành phần hóa học sâm cau ở Việt Nam cho thấy orcinol glucosid là một thành phần hóa học chính bên cạnh các hợp chất curculigosid [7]. Orcinol glucosid (OG) có các tác dụng sinh học đáng chú ý như chống trầm cảm, chống oxy hóa [8] và cải thiện chứng loãng xương ở người già [9]. Một số nghiên cứu cũng đã sử dụng hợp chất này làm chất đánh dấu (marker) để kiểm

tra chất lượng hoặc đánh giá dược tính của dược liệu và chế phẩm từ dược liệu [7],[10],[11]. Vì vậy, mục đích của nghiên cứu là thiết lập chất đối chiếu OG phù hợp yêu cầu của chất chuẩn quốc gia để bổ sung danh mục ngân hàng chất chuẩn tại Việt Nam nhằm phục vụ cho việc xây dựng tiêu chuẩn dược liệu cũng như các chế phẩm từ sâm cau.

2. Nguyên liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Nguyên liệu

Thân rễ sâm cau tươi (35 kg) được thu mua tại Lào Cai vào tháng 3 năm 2021. Mẫu được định danh thuộc loài *Curculigo orchioides* bằng cách phân tích trình tự gene trnH-psbA và rps16 so sánh với dữ liệu trên ngân hàng gen thế giới (NCBI) có mức độ tương đồng 100%. Thân rễ sâm cau tươi được rửa sạch, cắt nhỏ, sấy ở nhiệt độ 55°C, sau đó đem xay thô, thu bột (11 kg) (độ ẩm 9,7%) làm nguyên liệu chiết xuất, phân lập orcinol glucosid (OG).