

Khảo sát hàm lượng flavonoid toàn phần trong dược liệu thổ ty tử và vị thuốc thổ ty tử chích muối bằng phương pháp đo quang

Nguyễn Quốc Tuấn, Đào Việt Hưng, Ngô Thị Xuân Thịnh
Nguyễn Thị Minh Diệp, Phạm Quốc Tuấn*

Trung tâm NC và Chuyển giao CN Dược – Trường Cao đẳng Y Dược Phú Thọ

Summary

A spectrometric method was established to determine total flavonoid content in crude and salt-processed semen *Cuscutae*, with a good linearity, precision, and stability. The detection wavelength was set at 510 nm, and an extraction solvent was optimized. This method is applied to quantify the content of total flavonoid in samples of semen *Cuscutae*, which were purchased at several markets and traditional medicine clinics (Phu Tho province). The results showed that the contents of flavonoids in salt-processed products accounted for 7.80 - 11.32 mg/g lower than in crude materials (12.48 - 17.29 mg/g). It was understood that the contents of flavonoids were reduced during salt processing.

Keywords: Semen *Cuscutae*, total flavonoid, spectrometric method.

Đặt vấn đề

Thổ ty tử (*Semen Cuscutae*) là hạt lấy của quả chín đã phơi, sấy khô của dây tơ hồng (*Cuscuta chinensis* hoặc *Cuscuta australis*) [1]. Vị thuốc thổ ty tử đã được sử dụng lâu đời trong y học cổ truyền và trong dân gian ở Trung Quốc, Việt Nam để chữa bệnh liệt dương, di tinh, đau lưng, mỏi gối, tai ù, mắt mờ, sốt khát nước, dùng lâu đẹp nhan sắc [2].

Các nghiên cứu về thành phần hóa học của thổ ty tử chỉ ra rằng, thành phần chính là các flavonoid, lignan và một số dẫn xuất của acid quinic [3-7]. Hiện nay, theo khảo sát của chúng tôi, dược liệu thổ ty tử có trên thị trường nước ta hầu hết được nhập khẩu từ Trung Quốc, chất lượng rất khó kiểm soát.

Bên cạnh đó, chuyên luận Thổ ty tử trong Dược điển Việt Nam (ĐDVN) V hiện tại có chỉ tiêu định tính và định lượng một flavonoid là hyperosid ($\geq 0,1\%$) [1], chưa có chỉ tiêu định lượng

flavonoid toàn phần. Để góp phần tiêu chuẩn hóa chất lượng dược liệu, vị thuốc thổ ty tử và kiểm soát chất lượng chúng lưu hành trên thị trường trong nước thì công trình nghiên cứu xây dựng phương pháp định lượng flavonoid toàn phần trong dược liệu và vị thuốc này là cấp thiết, có ý nghĩa khoa học và thực tiễn.

Nguyên vật liệu và phương pháp

Mẫu nghiên cứu

Mẫu nghiên cứu: Dược liệu chuẩn thổ ty tử (hạt dây tơ hồng - *Cuscuta chinensis* Lam.) được mua từ Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương, số kiểm soát: CV 0116 031.01 (CC-1).

Các mẫu thổ ty tử khảo sát: Được thu mua ở 03 địa điểm khác nhau trên địa bàn tỉnh Phú Thọ (PT1- PT3).

Mẫu thổ ty tử chích muối: Các mẫu dược liệu được chế biến thành vị thuốc thổ ty tử chích muối theo phương pháp quy định tại Thông tư số 30/2017/TT-BYT ngày 11/7/2017 của Bộ Y tế về việc Hướng dẫn phương pháp chế biến các vị thuốc y học cổ truyền [8].

Dung môi, hóa chất

Chất chuẩn: Hyperosid được cung cấp bởi Trung tâm Nghiên cứu và Chuyển giao Công nghệ Dược – Trường Cao đẳng Y Dược Phú Thọ, hàm lượng đạt $\geq 95\%$ theo HPLC.

Chịu trách nhiệm: Phạm Quốc Tuấn
Email: phamquoctuan@duocphutho.edu.vn
Ngày nhận: 02/8/2020
Ngày phản biện: 13/9/2020
Ngày duyệt bài: 29/10/2020

Hóa chất, dung môi: Methanol (MeOH), ethanol (EtOH), nước cất, natri nitrit, nhôm clorid, natri hydroxyd.

Máy móc, thiết bị

Máy UV-Vis UV 1800, dải đo 190 - 900 nm (Shimadzu, Nhật Bản); bể chiết siêu âm D-78224 (Elma, Đức); cân phân tích AUW220D (Shimadzu, Nhật Bản); nồi cách thủy WNB14 (Mettler, Đức); máy cô quay chân không (Buchi, Thụy Sĩ).

Phương pháp nghiên cứu

Điều kiện đo quang

Lấy chính xác 1 ml dịch chiết mẫu cho vào bình định mức có dung tích 10 ml có chứa sẵn 4 ml dung môi. Thêm vào bình 0,3 ml dung dịch natri nitrit 5%, sau khoảng 5 phút thêm 0,3 ml dung dịch nhôm clorid 10 %, sau 6 phút cho thêm 2 ml dung dịch natri hydroxyd 2 M và bổ sung dung môi cho đủ 10 ml. Dung dịch được trộn đều và xác định độ hấp thụ quang so với mẫu trắng tại bước sóng 510 nm [10]. Dung dịch mẫu trắng cũng được tiến hành song song nhưng không chứa chất phân tích.

Chuẩn bị dung dịch đo quang

Dung dịch mẫu thử: Cân chính xác khoảng 1 g mẫu dược liệu (đã được xác định độ ẩm) chiết với 50 ml MeOH 80% trong thời gian 30 phút, bổ sung MeOH 80% đã bay hơi cho đủ 50 ml, lọc lấy dịch lọc. Sau đó tiến hành làm phản ứng tạo màu đo quang để xác định hàm lượng flavonoid toàn phần.

Dung dịch mẫu chuẩn: Chuẩn bị một dãy dung dịch chuẩn hyperosid có nồng độ chính xác 40, 60, 120, 240 và 480 µg/ml.

Thẩm định phương pháp

Phương pháp được đánh giá thông qua các chỉ tiêu: Tính đặc hiệu, độ lặp lại, khoảng tuyến tính, hiệu suất thu hồi [9].

Tính toán kết quả

Hàm lượng flavonoid toàn phần trong các mẫu thử tỷ tử được xác định bằng quy trình đã xây dựng. Thực hiện xác định hàm lượng của mỗi mẫu 3 lần, kết quả là ($M \pm SD$) của các giá trị thực nghiệm thu được.

$$X_{(mg/g)} = \frac{C \times 50}{1000} \times \frac{100}{m \times (100-b)}$$

Trong đó:

- X: Hàm lượng flavonoid toàn phần trong 1 g

dược liệu (mg/g);

- C: Nồng độ của flavonoid trong dung dịch mẫu thử tính được từ đường chuẩn tương ứng (µg/ml);

- m: Lượng cân mẫu thử (g);

- b: Độ ẩm mẫu thử (%).

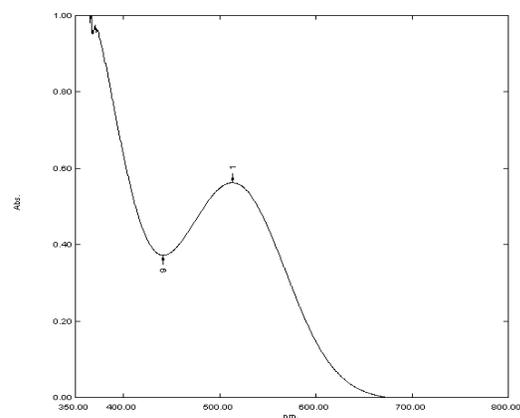
Áp dụng phương pháp xây dựng được định lượng flavonoid toàn phần

Mẫu dược liệu thô tỷ tử được mua tại các cửa hàng bán dược liệu và các phòng chẩn trị y học cổ truyền trên địa bàn tỉnh Phú Thọ. Ngoài ra, các mẫu này còn được chế biến thành vị thuốc thô tỷ tử chích muối theo phương pháp của Bộ Y tế và được đánh giá hàm lượng flavonoid.

Kết quả và bàn luận

Lựa chọn bước sóng phát hiện

Tiến hành thực hiện phản ứng như điều kiện đo quang, sau đó quét phổ UV-Vis mẫu chuẩn hyperosid. Kết quả thấy rằng dung dịch có hấp thụ quang cực đại tại bước sóng 510 nm (hình 1), và được chọn làm bước sóng định lượng flavonoid toàn phần trong các mẫu thử tỷ tử.



Hình 1. Phổ hấp thụ UV-Vis của mẫu chuẩn hyperosid

Tối ưu hóa dung môi chiết xuất

Tiến hành chiết xuất bằng các dung môi khác nhau: MeOH 100%; MeOH 80%, MeOH 60% và EtOH 96%; EtOH 80%, EtOH 60% với thời gian chiết siêu âm 30 phút và tỉ lệ dược liệu/dung môi như nhau là 1/20. Dung dịch chiết được thực hiện phản ứng với điều kiện đo quang như nhau.

Bảng 1. Kết quả khảo sát dung môi chiết

Dung môi	MeOH			EtOH		
	100%	80%	60%	96%	80%	60%
Độ hấp thụ quang (Abs)	0,225	0,269	0,250	0,213	0,248	0,241

Kết quả ở bảng 1 cho thấy với các điều kiện như nhau, dung môi MeOH 80% cho hấp thụ quang lớn nhất. Do vậy MeOH 80% được lựa chọn là dung môi chiết xuất.

Khảo sát nhiệt độ chiết xuất

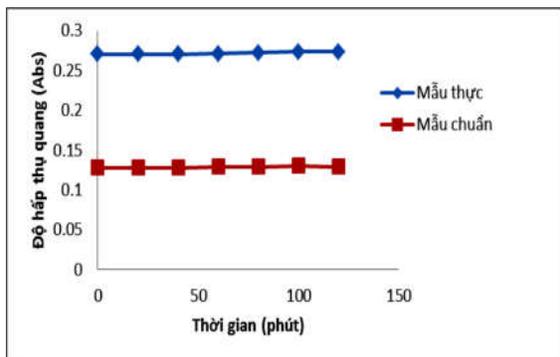
Sau khi lựa chọn dung môi chiết xuất, giữ nguyên các điều kiện như trên tiến hành chiết mẫu thử tỷ tử ở các nhiệt độ 25, 35, 45, 55 và 65°C. Kết quả được ghi lại ở bảng 2 cho thấy tại nhiệt độ 25 - 55 °C độ hấp thụ quang tăng dần, trong khi ở nhiệt độ 55 - 65 °C độ hấp thụ quang gần như không có sự khác biệt. Do vậy, nhiệt độ chiết được lựa chọn tại 55 °C.

Bảng 2. Kết quả khảo sát nhiệt độ chiết xuất

Nhiệt độ (°C)	25	35	45	55	65
Độ hấp thụ quang (Abs)	0,148	0,152	0,192	0,208	0,209

Đánh giá độ ổn định của phản ứng tạo màu

Để khảo sát độ ổn định màu của phản ứng, tiến hành làm phản ứng (3 lần), đo độ hấp thụ quang liên tục trong 120 phút của dung dịch hyperosid chuẩn (150 µg/ml) và dung dịch mẫu thực. Kết quả cho thấy độ hấp thụ quang hầu như không thay đổi (hình 2).



Hình 2. Độ ổn định của phản ứng tạo màu

Thẩm định quy trình

Tính đặc hiệu của phương pháp

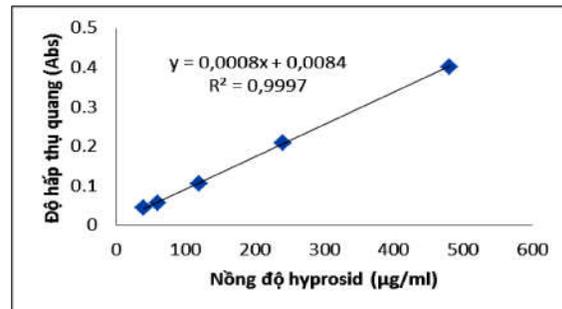
Với điều kiện đo quang và phương pháp xử lý mẫu đã lựa chọn, tiến hành thực hiện đo quang mẫu trắng, mẫu chuẩn hyperosid (10 µg/ml) và mẫu thực, làm lặp lại 6 lần. Kết quả đo mẫu trắng không cho tín hiệu, mẫu chuẩn và mẫu thực cho tín hiệu hấp thụ.

Xây dựng đường chuẩn

Chuẩn bị một dãy dung dịch chuẩn có nồng độ 40, 60, 120, 240 và 480 µg/ml rồi tiến hành đo độ hấp thụ quang với các điều kiện đã lựa chọn. Kết quả khảo sát có sự tương quan giữa độ hấp thụ và nồng độ hyperosid, được trình bày trong bảng 3. Phương trình đường chuẩn thu được như hình 3.

Bảng 3. Kết quả xây dựng đường chuẩn

Nồng độ (µg/ml)	40	60	120	240	480
Độ hấp thụ quang (Abs)	0,043	0,056	0,104	0,209	0,401



Hình 3. Đường chuẩn xác định hàm lượng flavonoid toàn phần

Độ lặp lại

Tiến hành thực hiện đo quang dung dịch mẫu thực với 6 lần thực hiện riêng biệt. Kết quả được ghi ở bảng 4 cho thấy phương pháp có độ lặp lại tốt với độ lệch chuẩn tương đối RSD < 1%, có thể áp dụng điều kiện đã lựa chọn để định lượng flavonoid toàn phần trong mẫu thử tỷ tử.

Bảng 4. Kết quả độ lặp lại của phương pháp đo quang

STT	1	2	3	4	5	6
$m_{mẫu} (g)$	1,0046	1,0069	1,0115	1,0365	1,0189	1,0431
Độ hấp thụ quang	0,269	0,270	0,271	0,273	0,272	0,273
Nồng độ tính theo đường chuẩn ($\mu g/ml$)	325,75	327,00	328,25	330,75	329,50	330,75
Số liệu thống kê	SD = 2,04 ; RSD = 0,62%					

Độ thu hồi
 Để xác định độ thu hồi của phương pháp, tiến hành bổ sung dung dịch mẫu chuẩn hyperosid ở các nồng độ chính xác 20, 60

và 120 $\mu g/ml$ vào mẫu thô ty tử đã biết hàm lượng flavonoid toàn phần. Tiến hành xử lý mẫu như Điều kiện đo quang và thực hiện đo quang lặp lại 6 lần, kết quả được ghi ở bảng 5.

Bảng 5. Kết quả xác định độ đúng của phương pháp

STT	Hàm lượng thêm vào ($\mu g/ml$)					
	20		60		120	
	Hàm lượng tìm thấy ($\mu g/ml$)	Hiệu suất thu hồi (%)	Hàm lượng tìm thấy ($\mu g/ml$)	Hiệu suất thu hồi (%)	Hàm lượng tìm thấy ($\mu g/ml$)	Hiệu suất thu hồi (%)
1	19,40	97,00	59,70	99,50	119,80	99,83
2	19,58	97,90	59,85	99,75	120,50	100,42
3	19,25	96,25	59,65	99,42	119,95	99,96
4	20,10	100,50	59,10	98,50	120,60	100,50
5	20,25	101,25	58,95	98,25	118,90	99,08
6	19,75	98,75	60,50	100,83	118,75	98,96
M	19,72	98,61	59,63	99,38	119,75	99,79
SD	0,39	1,96	0,56	0,93	0,78	0,65
RSD	1,99	1,99	0,93	0,93	0,65	0,65

Kết quả thực nghiệm cho thấy rằng phương pháp có độ thu hồi cao, đảm bảo độ chính xác khi định lượng flavonoid toàn phần trong dược liệu thô ty tử và sản phẩm chích muối tương ứng.

Ứng dụng phương pháp định lượng

Từ kết quả xây dựng được quy trình định lượng hàm lượng flavonoid toàn phần, tiến hành

áp dụng định lượng cho các mẫu thô ty tử được thu mua tại các cửa hàng bán dược liệu, các phòng chẩn trị y học cổ truyền trên địa bàn tỉnh Phú Thọ và các sản phẩm chích muối tương ứng. Hàm lượng flavonoid toàn phần trong các mẫu thô ty tử được tính trong 1 g khô tuyệt đối theo hyperosid và được trình bày trong bảng 6.

Bảng 6. Kết quả định lượng flavonoid toàn phần trong các mẫu thô ty tử

Tên mẫu	Mẫu dược liệu			Mẫu chích muối		
	Khối lượng mẫu (g)	Độ ẩm (%)	Hàm lượng flavonoid (mg/g)	Khối lượng mẫu (g)	Độ ẩm (%)	Hàm lượng flavonoid (mg/g)
CC-1	1,0285	7,20	17,11 \pm 0,05**	1,0153	8,33	11,32 \pm 0,04
PT1	1,0617	8,41	13,47 \pm 0,06**	1,0306	9,72	8,84 \pm 0,05
PT2	1,0097	9,56	17,29 \pm 0,08**	1,0141	9,83	11,11 \pm 0,05
PT3	1,0088	9,32	12,48 \pm 0,06**	1,0189	9,91	7,80 \pm 0,03

** $p < 0,01$ khi so sánh dược liệu thô ty tử với sản phẩm chích muối tương ứng.

Từ kết quả ở bảng 6 cho thấy, chỉ có mẫu PT2 cho hàm lượng tương đương so với mẫu thô ty tử chuẩn, hai mẫu còn lại có hàm lượng flavonoid toàn phần từ 72,94 - 78,73% so với

mẫu chuẩn. Sản phẩm chích muối tương ứng của các dược liệu thô ty tử thu mua đều có hàm lượng flavonoid thấp hơn có ý nghĩa thống kê ($p < 0,01$). Điều này gợi ý có thể hàm lượng

flavonoid bị giảm trong quá trình chích muối, cũng phù hợp với nghiên cứu trước đây của Yang S. và CS. [11]. Tuy nhiên, trong y học cổ truyền Trung Quốc và Việt Nam sử dụng vị thuốc thổ ty tử chích muối là do có tác dụng tốt với thận, phục hồi chức năng giới tính, cải thiện chức năng miễn dịch, tăng khả năng chống oxy hóa [11]. Ngoài ra, cũng trong một nghiên cứu khác so sánh tác dụng dược động học của một số hợp chất phenolic và flavonoid trong thổ ty tử và sản phẩm thổ ty tử chích muối cũng cho kết quả sản phẩm thổ ty tử chích muối có khả năng tăng sự hấp thu và sinh khả dụng tốt hơn [12]. Theo ĐĐVN V, dược liệu thổ ty tử được đánh giá qua hàm lượng hyperosid phải chứa không ít hơn 0,1%, và chất chiết được không nhỏ hơn 9,0%. Trong thực tế vị thuốc thổ ty tử chích muối được bán nhiều tại các cửa hàng dược liệu hoặc phòng chẩn trị y học cổ truyền nhưng chưa có tiêu chuẩn chất lượng, đặc biệt là chỉ tiêu định lượng các thành phần chính dẫn tới khó kiểm soát chất lượng sản phẩm. Với phương pháp đo quang đã xây dựng cho kết quả định lượng nhanh, chính xác, có ý nghĩa thực tiễn trong việc góp phần xây dựng tiêu chuẩn và kiểm tra đánh giá chất lượng dược liệu thổ ty tử và vị thuốc thổ ty tử chích muối qua hàm lượng flavonoid toàn phần.

Kết luận

Nghiên cứu đã xây dựng được phương pháp định lượng flavonoid toàn phần tính theo hyperosid trong dược liệu và sản phẩm chích muối của thổ ty tử bằng phương pháp đo quang. Áp dụng phương pháp xây dựng đã xác định được hàm lượng flavonoid toàn phần của 03 mẫu dược liệu thổ ty tử thu mua trên địa bàn tỉnh Phú Thọ và các sản phẩm chích muối tương ứng của chúng. Hàm lượng flavonoid toàn phần trong sản phẩm trích muối nhỏ hơn trong dược liệu thổ ty tử, đồng thời phương pháp thực hiện đơn giản, nhanh chóng, rẻ tiền, chính xác, có giá trị tham khảo hữu ích trong việc nâng cấp, tiêu chuẩn hóa và kiểm tra chất lượng dược liệu và vị thuốc thổ ty tử chích muối.

Nghiên cứu này được tài trợ bởi Sở Khoa học và Công nghệ tỉnh Phú Thọ (Đề tài cấp tỉnh năm 2020).

Tài liệu tham khảo

1. Bộ Y tế (2017), *Dược điển Việt Nam*, tập V, Nhà xuất bản Y học.
2. Đỗ Tất Lợi (2004), *Những cây thuốc và vị thuốc Việt Nam*, Nhà xuất bản Y học.
3. Chang B. Kwon Y., Kim C. (2000), "Antioxidative constituents from the seeds of *Cuscuta chinensis*", *Natural Product Sci.*, 6, pp. 135-138.
4. He X. H., Yang W. H., Ye M., Wang Q., Guo D. (2011), "Differentiation of *Cuscuta chinensis* and *Cuscuta australis* by HPLC-DAD-MS analysis and HPLC-UV quantitation", *Planta Medica*, 77, pp. 1950-1957.
5. Li J., Guo H. (1997), "Flavonoids of *Cuscuta australis* R. Br.", *China J. of Chinese Materia Medica*, 22 (1), pp. 38-39, 62.
6. Ye M., Li Y., Yan Y., Liu H., Ji X. (2002), "Determination of flavonoids in semen *Cuscutae* by RP-HPLC", *J. of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 28 (3), pp. 621-628.
7. Ye M., Yan Y. N., Qiao L., Ni X. M. (2002), "Studies on chemical constituents of *Cuscuta chinensis*", *China J. of Chinese Materia Medica*, 27 (2), pp. 115-117.
8. Bộ Y tế (2017), Thông tư Hướng dẫn chế biến các vị thuốc Y học cổ truyền, Số 30/2017/TT-BYT, ngày 11/7/2017.
9. Viện Kiểm nghiệm An toàn Vệ sinh thực phẩm Quốc gia (2010), *Thẩm định phương pháp trong phân tích hóa học và vi sinh vật*, NXB Khoa học & Kỹ thuật Hà Nội.
10. Nguyễn Quốc Tuấn, Nguyễn Thị Bích Thu (2013), Định lượng flavonoid toàn phần trong nụ và lá vối bằng phương pháp đo quang, *Tạp chí Dược liệu*, 18 (3), tr. 167-172.
11. Yang S., Xu H., Zhao B., Li S., Li T., Xu X., Zhang T., Lin R., Li J., Li X. (2016), "The difference of chemical components and biological activities of the crude product and salt-processed product from semen *Cuscutae*", *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 16, <https://doi.org/10.1155/2016/8656740>.
12. Liu J., Zou S., Liu W., Li J., Hao J., He J., Gao X., Liu E., Chang Y. (2019), "An established HPLC-MS/MS method for evaluation of influence of salt processing on pharmacokinetics of six compounds in *Cuscutae* semen", *Molecules*, 24, doi: 103390/molecules24132502.