

# Chiết xuất, phân lập, tinh chế và thiết lập chất chuẩn dioscin từ thân rễ cây bầy lá một hoa (*Paris polyphylla*)

Cao Ngọc Anh<sup>1</sup>, Nguyễn Thị Vân<sup>1</sup>  
Đỗ Thị Hà<sup>2</sup>, Thái Nguyễn Hùng Thu<sup>3\*</sup>  
<sup>1</sup> Viện Kiểm nghiệm Thuốc Trung ương  
<sup>2</sup> Viện Dược liệu  
<sup>3</sup> Trường Đại học Dược Hà Nội

## Summary

A high purity compound (0.4 g) was extracted, isolated and purified from rhizome of *Paris polyphylla* by using column chromatographic method. The chemical structure of the isolate was identified as dioscin based on comparison of the UV, IR, MS, 1D-NMR (<sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C) spectra of isolated dioscin and those of standard dioscin purchased from Chengdu Herbpurify Co. Ltd (China) company. The dioscin working reference standard was established base on the criteria in Vietnamese Pharmacopoeia V and ASEAN requirements. The results show that vials are homogeneous in the process of packaging and content is 97.90% with an expanded uncertainty  $U = \pm 0.12\%$ , a coverage factor  $k = 2$  at the level of confident 95% (average results from two laboratories).

**Keywords:** *Paris polyphylla*, dioscin, reference standard.

## Đặt vấn đề

Dioscin có trong thành phần của cây bầy lá một hoa (*Paris polyphylla*)<sup>[1, 2]</sup>, một dược liệu được biết đến với các tác dụng dược lý như ức chế enzyme tyrosinase và chống bệnh Leishmania<sup>[3]</sup>, cầm máu trong bệnh chảy máu bất thường ở tử cung, kháng khuẩn, ức chế tổn thương ở dạ dày... đặc biệt là tác dụng chống ung thư và ức chế sự phát triển của khối u<sup>[4, 5]</sup>. Nhằm phục vụ công tác kiểm tra, đánh giá chất lượng dược liệu và các sản phẩm từ cây bầy lá một hoa tại Việt Nam, chúng tôi tiến hành chiết xuất, phân lập, tinh chế và thiết lập chất chuẩn dioscin từ thân rễ của cây bầy lá một hoa.

## Nguyên liệu và phương pháp nghiên cứu

**Chất chuẩn, trang thiết bị, dung môi và hóa chất**

Chịu trách nhiệm: Thái Nguyễn Hùng Thu  
Email: tnht22@yahoo.com  
Ngày nhận: 24/9/2020  
Ngày phân biện: 12/11/2020  
Ngày duyệt bài: 24/12/2020

**Chất chuẩn:** Chất chuẩn dioscin được cung cấp bởi Hãng Chengdu Herbpurify Co. Ltd; SKS: S-048-180530; Hàm lượng: 98,03%, Độ ẩm: 1,45%.

**Trang thiết bị:** Máy cất quay chân không IKA RV 3V (Hãng IKA - Đức); tủ sấy UFB 500 (Hãng Memmert, Đức); cân phân tích MS105 (Hãng Mettler, Thụy Sĩ); máy sắc ký lỏng hiệu năng cao Acquity ARC (Hãng Waters, Mỹ); máy sắc ký lỏng hiệu năng cao điều chế Shimadzu LC-20A (Nhật Bản); máy phân tích nhiệt trọng lực TGA (Hãng Mettler Toledo, Thụy Sĩ); máy quang phổ UV-Vis U-1900 (Hãng Hitachi, Nhật Bản); máy cộng hưởng từ hạt nhân Bruker Avance AM500FT- NMR (Hãng Bruker BioSpin, Thụy Sĩ); máy đo phổ khối APCI-MS Varian Agilent 1100LC-MSD (Hãng Agilent Technologies, Mỹ) và các dụng cụ cần thiết khác trong phòng thí nghiệm.

## Dung môi và hóa chất

Dung môi, hóa chất dùng để chiết xuất và phân lập: Ethanol (EtOH) 70%, ethyl acetat (EtOAc), methanol (MeOH), dicloromethan (DCM), aceton, nước cất, silica gel (40 - 63 μm, Merck), bản mỏng tráng sẵn DC-Alufolien

60 F<sub>254</sub> (silica gel; 0,25 mm; Hãng Merck), dung dịch H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 10% trong EtOH 96% để phát hiện vết chất.

Dung môi tinh khiết **HPLC** dùng trong thiết lập chuẩn: Acetonitril (Hãng Merck), methanol (Hãng Merck), acid phosphoric (Hãng Prolabo), nước cất hai lần.

#### **Đối tượng nghiên cứu**

Thân rễ cây bầy lá một hoa thu hái vào tháng 11/2017 tại tỉnh Lào Cai và được định danh tên khoa học là: *Paris polyphylla* var. *chinensis* Smith. Trilliaceae. Mẫu tươi thu hái được rửa sạch, để ráo nước, sấy ở nhiệt độ 55°C đến khô giòn, sau đó xay thành bột thô, sấy ở nhiệt độ 55°C đến khối lượng không đổi.

#### **Phương pháp nghiên cứu**

Chiết xuất, phân lập bằng chiết lỏng - lỏng kết hợp với sắc ký cột. Sử dụng **HPLC** điều chế để tinh chế. Khẳng định cấu trúc bằng các phương pháp phổ. Xây dựng tiêu chuẩn, kiểm tra chất lượng của nguyên liệu thiết lập chuẩn và thiết lập chuẩn theo các quy định của Dược điển Việt Nam V và ASEAN<sup>[6, 7]</sup>.

#### **Kết quả và bàn luận**

##### **Chiết xuất, phân lập và tinh chế dioscin từ thân rễ cây bầy lá một hoa**

1 kg bột thân rễ cây bầy lá một hoa được chiết hồi lưu bằng ethanol 70% trong thời gian 3 giờ × 3 lần với tỉ lệ dược liệu-dung môi là 1:8. Gộp các dịch chiết, lọc và cất thu hồi dung môi ở áp suất giảm thu được 370 g cao EtOH.

Phân tán cao EtOH trong nước, sau đó chiết phân bố lần lượt với dung môi dicloromethan, ethyl acetat và n-butanol (chiết 3 lần với tỷ lệ dung môi-dịch chiết là 1:1). Cất thu hồi dung môi dưới áp suất giảm thu được các cao phân đoạn dicloromethan (210 g), ethyl acetat (12 g), n-butanol (120 g) và cao nước (90 g).

Cao ethyl acetat được phân lập tiếp bằng sắc ký cột silica gel với gradient dung môi EtOAc-MeOH-H<sub>2</sub>O (90:5:5 → 0:100:0) thu được 7 phân đoạn (E1-E7). Phân đoạn E7 (sau khi bốc hơi dung môi có khối lượng 4 g) được phân lập tiếp bằng sắc ký cột silicagel với hệ dung môi EtOAc-MeOH-H<sub>2</sub>O (85:10:5) thu được 8 phân đoạn (E7A-E7H).

Phân đoạn E7F (sau khi bốc hơi dung môi có khối lượng 2 g) được phân lập tiếp bằng sắc ký cột với silica gel và hệ dung môi DCM-MeOH-H<sub>2</sub>O (80:19:1) thu được 4 phân đoạn

(E7F1 - E7F4). Qua kiểm tra bằng **SKLM**, phân đoạn E7F4 (sau khi bốc hơi dung môi có khối lượng 505 mg) có thành phần tương tự như E7G (sau khi bốc hơi dung môi có khối lượng 170 mg) và là hỗn hợp của dioscin và polyphyllin D (với tỷ lệ khoảng 1:2).

Sản phẩm gộp của E7G và E7F4 (675 mg) được pha thành dung dịch có nồng độ hỗn hợp khoảng 5 mg/ml trong methanol. Tiếp tục phân lập hỗn hợp này bằng **HPLC** điều chế với hệ dung môi rửa giải là acetonitril - nước (50:50), cột C18 (250 × 10 mm, 10 μm), detector phát hiện ở bước sóng 203 nm, tốc độ dòng 10 ml/phút, thể tích tiêm 5000 μl. Gộp các dung dịch chứa riêng dioscin thu được từ quá trình phân lập bằng **HPLC** đem cất quay dưới áp suất giảm ở 50 °C để thu hồi dung môi acetonitril. Sau đó tiến hành cất quay dưới áp suất giảm ở 70 °C để loại nước.

Tiến hành lặp lại 2 lần quy trình phân lập tinh chế trên. Gộp sản phẩm thu được và hòa tan trong aceton, để vào tủ lạnh ở nhiệt độ 2 - 8 °C qua đêm để tạo mầm kết tinh, sau đó chuyển sang tủ đông (-20 °C) trong 24 giờ cho kết tinh hoàn toàn. Lọc để thu kết tủa, rửa tủa với aceton lạnh. Tủa thu được đem bay hơi aceton dư ở 50 °C, sau đó sấy chân không ở 60°C trong 24 giờ thu được dioscin tinh khiết (410 mg).

#### **Định tính và xác định cấu trúc**

**Sắc ký lớp mỏng:** Trên ba hệ dung môi có độ phân cực khác nhau gồm: CHCl<sub>3</sub>-MeOH-H<sub>2</sub>O (65:35:10), EtOAc-MeOH-H<sub>2</sub>O (85:15:5) và CHCl<sub>3</sub>-EtOAc-MeOH-H<sub>2</sub>O (15:40:22:10), dioscin tinh chế được chỉ cho 1 vết có màu sắc và giá trị R<sub>f</sub> phù hợp với vết của dioscin chuẩn.

**Sắc ký lỏng hiệu năng cao:** Thời gian lưu và phổ **UV-VIS** của pic dioscin trên sắc ký đồ của dung dịch thử (tinh chế được) tương ứng với thời gian lưu và phổ **UV-VIS** của pic dioscin trên sắc ký đồ dung dịch chuẩn.

**Phổ hồng ngoại (IR):** Phổ hồng ngoại của mẫu thử dioscin tinh chế được phù hợp với phổ hồng ngoại của dioscin chuẩn.

**Phổ khối lượng:** Phổ **HR-ESI-MS** của dioscin tinh chế được cho pic ion tại m/z 869,4895 [M+H]<sup>+</sup> tương ứng với công thức phân tử C<sub>45</sub>H<sub>72</sub>O<sub>16</sub> của dioscin.

**Phổ NMR:** Dữ liệu **<sup>1</sup>H-NMR**, **<sup>13</sup>C-NMR** của dioscin tinh chế được hoàn toàn phù hợp với dữ liệu **<sup>1</sup>H-NMR**, **<sup>13</sup>C-NMR** của dioscin đã công bố<sup>[8]</sup> (bảng 1).

**Bảng 1. Dữ liệu phổ của hợp chất dioscin tinh chế được**

C/H	Dioscin tinh chế (*)		Dioscin <sup>[8]</sup> (**)	
	<sup>1</sup> H-NMR <sup>a</sup>	<sup>13</sup> C-NMR <sup>c</sup>	<sup>1</sup> H-NMR <sup>b</sup>	<sup>13</sup> C-NMR <sup>d</sup>
1		38,5		37,6
2		30,7		30,2
3	3,60 (1H, m)	79,3		78,2
4		39,5		39,1
5		141,9		141,0
6	5,40 (1H, m)	122,6	5,31 (1H, m)	121,8
7		33,2		32,4
8		32,4		31,8
9		51,7		50,5
10		38,0		37,2
11		22,0		21,2
12		40,9		39,3
13		41,4		40,0
14		57,8		56,8
15		32,8		32,3
16		82,2		81,6
17		63,7		63,1
18	0,83 (3H, s)	16,8	0,80 (3H, s)	16,4
19	1,07 (3H, s)	19,8	1,03 (3H, s)	19,5
20		42,9		42,1
21	0,97 (3H, d, 7,5)	14,9	1,04 (3H,d)	15,0
22		110,6		109,3
23		32,7		31,9
24		29,9		29,4
25		31,4		30,7
26		67,9		67,0
27	0,81 (3H, d, 6,5)	17,5	0,98 (3H, d)	17,3
1'	4,52 (1H, d, 7,5)	100,5	4,93 (1H, d, 6,5)	100,3
2'		79,3		78,9
3'		76,6		76,9
4'		80,0		78,2
5'		78,0		77,9
6'		62,0		61,4
1''	5,22 (1H, d, 1,5)	102,3	6,35 (1H, br)	102,2
2''		72,3		72,5
3''		72,4		72,8
4''		73,7		73,9
5''		69,8		69,4
6''	1,28 (3H, d, 6,5)	17,9		18,6
1'''	4,85 (1H, overlap)	103,0	5,80 (1H, br)	102,9
2'''		72,3		72,5
3'''		72,4		72,8
4'''		73,9		74,1
5'''		70,7		70,4
6'''	1,26 (3H, d, 6,5)	18,0		18,6

(\*) đo trong MeOD

(\*\*) đo trong pyridin-d<sub>5</sub>

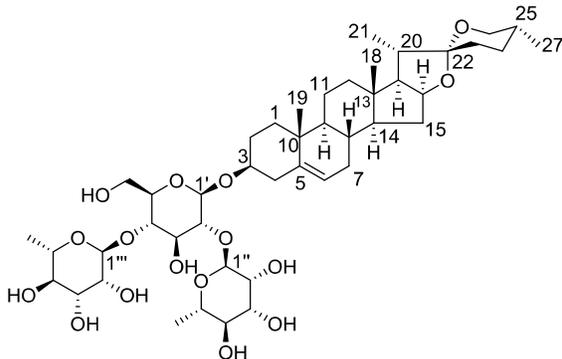
<sup>a</sup> 500 MHz

<sup>c</sup> 125 MHz

<sup>b</sup> 600 MHz

<sup>d</sup> 100 MHz

Cấu trúc hóa học của dioscin tinh chế xác định được như sau:



$C_{45}H_{72}O_{16}$  M = 869,04

### Thiết lập chất chuẩn dioscin

#### Tiêu chuẩn chất lượng nguyên liệu thiết lập chuẩn

**Tính chất:** Bột kết tinh màu trắng hoặc trắng ngà, ít tan trong nước, dễ tan trong methanol, dimethylsulfoxid.

**Định tính:** Bằng quang phổ hồng ngoại và **HPLC**.

**Mất khối lượng do làm khô:** Xác định bằng TGA, yêu cầu: Không quá 2,0%.

**Nhiệt độ nóng chảy:** Khoảng 274-276°C.

**Định lượng:** Bằng phương pháp **HPLC**, yêu cầu phải chứa không ít hơn 95,0% dioscin ( $C_{45}H_{72}O_{16}$ ), tính theo nguyên trạng.

**Tạp chất liên quan:** Bằng phương pháp **HPLC**, yêu cầu từng tạp riêng lẻ không được quá 1,0% và tổng tạp không được quá 1,5%.

#### Kiểm tra chất lượng nguyên liệu dùng thiết lập chuẩn

##### Định tính

Trên phổ **IR** của mẫu thử có các đỉnh đặc trưng ( $cm^{-1}$ ): số sóng 3445 (nhóm chức -OH); số sóng 1646 (-C=C-); số sóng 1044 (ether). Phổ hồng ngoại của mẫu thử dioscin tinh chế phù hợp với phổ hồng ngoại của dioscin chuẩn.

Thời gian lưu của pic chính trên sắc ký đồ **HPLC** của dung dịch thử tương ứng với thời gian lưu của pic dioscin trên sắc ký đồ của dung dịch chuẩn.

**Mất khối lượng do làm khô:** Kết quả nghiên cứu được ghi trong bảng 2:

**Bảng 2.** Kết quả xác định mất khối lượng do làm khô của nguyên liệu thiết lập chuẩn dioscin

STT	Lượng cân (mg)	Độ ẩm (%)	Yêu cầu	Kết luận
1	3,8350	1,29		
2	4,1350	1,27	≤ 2,0%	Đạt
3	4,0315	1,29		
<b>Trung bình</b>		1,28		

**Nhiệt độ nóng chảy:** Kết quả nghiên cứu được ghi trong bảng 3:

**Bảng 3.** Kết quả xác định nhiệt độ nóng chảy của nguyên liệu thiết lập chuẩn dioscin

STT	Nhiệt độ nóng chảy (°C)	Yêu cầu	Kết luận
1	275,4	274-276°C	Đạt
2	275,5		
3	275,5		
<b>Trung bình</b>		275,5	

##### Định lượng

Thực hiện theo điều kiện **HPLC** trong phần xây dựng tiêu chuẩn nguyên liệu. Các thông số kiểm tra sự phù hợp của hệ thống sắc ký thu được

như sau: RSD của thời gian lưu và diện tích pic ( $n = 6$ ) là 0,02% và 0,02% ( $\leq 2,0\%$ ), số đĩa lý thuyết là 5973 ( $\geq 3000$ ), độ phân giải là 2,0 ( $\geq 1,5$ ). Kết quả định lượng thu được như bảng 4.

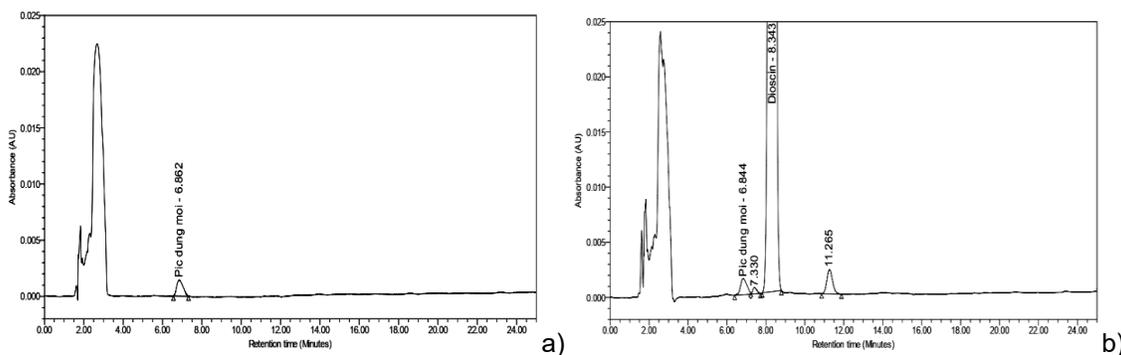
**Bảng 4. Kết quả định lượng nguyên liệu thiết lập chuẩn dioscin**

STT	Khối lượng mẫu thử (mg)	Diện tích pic S (mAU.s)	Hàm lượng (%)	Yêu cầu	Kết luận
1	4,97	2905852	97,21	≥ 95,0% dioscin (C <sub>45</sub> H <sub>72</sub> O <sub>16</sub> ), tính theo nguyên trạng	Đạt
2	4,95	2922458	98,16		
3	4,93	2904653	97,96		
4	5,02	2939888	97,37		
5	4,97	2923081	97,79		
6	4,93	2940697	99,17		
<b>Trung bình</b>			97,94		
<b>RSD (%)</b>			0,72		

**Tạp chất liên quan**

Thực hiện theo điều kiện **HPLC** và yêu cầu trong phần tiêu chuẩn tạp chất liên quan của nguyên liệu thiết lập chuẩn. Diện tích pic dioscin thu được trong 6 lần tiêm lặp lại dung dịch

đối chiếu có RSD là 2,96% (≤ 5,0%) và độ phân giải là 1,6 (≥ 1,5). Trên sắc ký đồ của dung dịch thử xuất hiện 02 pic tạp (hình 1). Kết quả kiểm tra tạp chất trong nguyên liệu thiết lập chuẩn như ở bảng 5.



**Hình 1. Sắc ký đồ xác định tạp chất liên quan của mẫu thử dioscin**  
a) mẫu trắng      b) mẫu thử

**Bảng 5. Kết quả xác định tạp chất liên quan trong mẫu thử dioscin**

Tạp	Thời gian lưu (phút)	Diện tích pic (mAu.s)	%	Yêu cầu	Kết luận
1	7,330	8864	0,17	≤ 1,0%	Đạt
2	11,265	25076	0,48		
<b>Tổng tạp</b>			0,65	≤ 1,5%	Đạt

**Đóng gói**

Tiến hành đóng trong Glove-box: Nạp khí nitơ 99,99%. Độ ẩm tương đối trong buồng đóng 5 - 10%. Đánh số thứ tự từng lọ. Đóng 10 mg/lọ.

**Đánh giá đồng nhất lô trong quá trình đóng gói**

Lấy ngẫu nhiên 05 lọ để kiểm tra độ đồng nhất của quá trình đóng gói. Xác định hàm lượng của mẫu thử trong từng lọ, kết quả thu được như ở bảng 6.

**Bảng 6. Kết quả đánh giá đồng nhất lô trong quá trình đóng gói dioscin**

Lô số	1	2	3	4	5	TB	RSD (%)
Hàm lượng (%)	98,98	97,46	97,43	97,55	98,45	97,97	0,72

Kết quả cho thấy độ lệch chuẩn của kết quả hàm lượng trong các lô (n = 5) xác định được là 0,72% (RSD < 1,0%). Vậy lô bán thành phẩm đồng nhất về hàm lượng. Quy trình đóng gói ổn định.

**Đánh giá liên phòng thử nghiệm**

Phương pháp định lượng tiến hành như phần đánh giá đồng nhất lô và được tiến hành ở Khoa Nghiên cứu phát triển và Khoa Vật lý đo lường thuộc Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương. Kết quả tập hợp trong bảng 7.

**Bảng 7. Các thông số của hệ sắc ký và kết quả đánh giá liên phòng**

Các thông số	Yêu cầu	Khoa NCPT	
		HPLC Waters ARC	HPLC Agilent 1200
		Shimadzu C18 (250 × 4,6 mm; 5 μm)	Shimadzu C18 (250 × 4,6 mm; 5 μm)
$t_R$ (phút)		12,6	8,7
N	≥ 3000	6568	5643
T	$0,8 \leq T \leq 1,5$	0,96	0,85
$R_S$	≥ 1,5	2,3	2,2
RSD <sub>diện tích</sub> (%)	≤ 2,0	0,33	0,11
Hàm lượng trung bình	≥ 95,0%	97,92	97,89
Phương sai		0,056	0,033
Số kết quả (n)		6	6
Bậc tự do df			10
$T_{thực nghiệm}$			0,234
$T_{tiêu chuẩn}$			2,228

Các kết quả thu được cho thấy  $T_{thực nghiệm} < T_{tiêu chuẩn}$  nên kết quả phân tích ở 2 khoa khác nhau không có ý nghĩa thống kê.

**Xác định giá trị công bố trên CoA**

Tập hợp kết quả xác định hàm lượng đánh giá liên phòng như ở bảng 8.

**Bảng 8. Tập hợp kết quả của hai PTN và tính giá trị công bố trên CoA với chuẩn dioscin**

STT	Hàm lượng (%) (nguyên trạng)	STT	Hàm lượng (%) (nguyên trạng)	Giá trị công bố trên CoA
1	97,55	7	97,84	Chuẩn phòng thí nghiệm Dioscin SKS: D.012020EC Hàm lượng: 97,90% C <sub>45</sub> H <sub>72</sub> O <sub>16</sub> (nguyên trạng) Độ không đảm bảo đo mở rộng: $U = \pm 0,12\%$ , với hệ số phủ k = 2 ở độ tin cậy 95 %.
2	98,18	8	98,12	
3	97,93	9	97,78	
4	98,17	10	97,61	
5	97,82	11	98,04	
6	97,87	12	97,94	
<b>Trung bình</b>			97,90	
<b>S</b>			0,202	
<b>RSD (%)</b>			0,21	
<b>U (%)</b>			0,12	

## Kết luận

Quy trình chiết xuất, phân lập và tinh chế dioscin đã được thực hiện bằng sắc ký cột và sắc ký lỏng điều chế. Kết quả thu được chất dioscin đảm bảo độ tinh khiết để thiết lập chất chuẩn. Quy trình kiểm tra chất lượng dioscin đã được xây dựng bằng kỹ thuật **HPLC** với điều kiện sắc ký đơn giản và được thẩm định đáp ứng các yêu cầu về độ đặc hiệu, độ đúng, tính tuyến tính và độ chính xác. Kết quả đã thiết lập được chất chuẩn phòng thí nghiệm dioscin với hàm lượng đạt 97,90% tính theo nguyên trạng, độ không đảm bảo đo mở rộng  $U = \pm 0,12\%$  với hệ số phủ  $k = 2$  ở mức tin cậy 95%.

## Tài liệu tham khảo

1. Chen C. X., Zhou J. (1981), "Studies on the saponin components of plants in Yunnan V. Steroid glycosides and  $\beta$ -ecdysone of *Paris polyphylla* Sm. var. *yunnanensis* (FR.) HM.", *Acta Botanica Yunnanica*, 1, pp. 011.
2. Wang Y., Gao W. Y., Yuan L. C., Liu X. Q., Wang S. J., Chen C. (2007), "Chemical constituents from rhizome of *Paris polyphylla* var. *yunnanensis*", *Chinese Traditional and Herbal Drugs*, 38, pp. 17.
3. Devkota K. P., Khan M. T. H., Ranjit R., Meli L. A., Samreen, Iqbal C. M. (2007), "Tyrosinase inhibitory and antileishmanial

constituents from the rhizomes of *Paris polyphylla*", *Natural Product Research*, 21, pp. 321-327.

4. Zheng W., Yan C. M., Zhang Y. B., Li Z. H., Z. Q. Li, Li X. Y., Wang Z. W., Wang X. L., Chen W. Q., Yu X. H. (2015), "Antiparasitic efficacy of dioscin and zingiberis new saponin from *Costus speciosus* (Koen ex. Retz) Sm. against *Ichthyophthirius multifiliis*", *Parasitology*, 142 (3), pp. 473-479.

5. Wang Y., Zhang Y. J., Gao W. Y., Yan L. L. (2007), "Anti-tumor constituents from *Paris polyphylla* var. *yunnanensis*", *China Journal of Chinese Materia Medica*, 32 (14), pp. 1425-1428.

6. Dược điển Việt Nam V (2017), Phụ lục 2.5.

7. SOP for the Production of ASEAN Reference Substances - 2015.

8. Wang Zhao, Jiangbing Zhou, Yong Ju, Y. A. O. Shenqing, Zhang Hongjun (2001), "Effects of dioscin extracted from *Polygonatum zanlanscianense* Pamp on several human tumor cell lines", *Tsinghua Science and Technology*, 6 (3), pp. 239 – 242.