

Chiết xuất, phân lập, tinh chế và thiết lập chất chuẩn polyphyllin D từ thân rễ cây bầy lá một hoa (*Paris polyphylla* Sm. var. *chinensis* (Franch.) H. Hara)

Cao Ngọc Anh¹, Nguyễn Thị Phương Lan²

Đỗ Thị Hà³, Thái Nguyễn Hùng Thu^{4*}

¹ Viện Kiểm nghiệm Thuốc Trung ương

² Cục Quản lý Y, Dược cổ truyền

³ Viện Dược liệu

⁴ Trường Đại học Dược Hà Nội

Summary

A high purity compound (0.414 g) was extracted, isolated from rhizome of *Paris polyphylla* Sm. var. *chinensis* (Franch.) H. Hara by column chromatography, and purified by preparative high performance liquid chromatography. The chemical structure of the isolate was identified as polyphyllin D based on comparison of the UV, IR, MS, 1D-NMR (¹H and ¹³C) spectrums of isolated polyphyllin D and those of standard polyphyllin D purchased from Chengdu Herbpurify Co. Ltd (China) company. The polyphyllin D working reference standard was established base on the criteria in Vietnamese Pharmacopoeia V and ASEAN requirements. Results show that vials are homogeneous in the process of packaging and content are 97.47%, an expanded uncertainty $U = \pm 0.32\%$, a coverage factor $k = 2$ at the level of confident 95% (average results from two laboratories).

Keywords: *Paris polyphylla*, polyphyllin D, reference standard.

Đặt vấn đề

Bầy lá một hoa (*Paris polyphylla* Sm. var. *chinensis* (Franch.) H. Hara) là một dược liệu quý hiếm, có tác dụng kháng vi sinh vật^[1], cầm máu^[2]. Nghiên cứu về thành phần hóa học của bầy lá một hoa cho thấy saponin là thành phần chính của loài này và là thành phần có hoạt tính chống ung thư tiềm năng^[3]. Tổng hợp tài liệu đến thời điểm hiện tại đã có khoảng 150 hợp chất saponin được phân lập từ cây bầy lá một hoa. Cấu trúc của các hợp chất này chủ yếu thuộc nhóm saponin steroid khung spirostan (diosgenin, pennogenin), pseudo-spinostan, furostan, pregnan và saponin tri terpenoid^[4].

Polyphyllin D (Diosgenin-3-O- α -L-arabinofuranosyl-(1 \rightarrow 4)- [α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)]- β -D-glucopyranosid) là một trong những thành phần chính của cây bầy lá một hoa và được chứng minh là hoạt chất có tác dụng kiềm chế nhiều loại tế bào ung thư như: ức chế dòng tế bào ung thư gan HepG2 và cả dòng tế bào ung thư gan kháng thuốc R-HepG2^[5], gây độc tế bào ung thư vú^[6], ung thư phổi^[7]... Dược điển Trung Quốc 2015 sử dụng 4 chất đánh dấu để kiểm nghiệm dược liệu *Paris* (rễ phơi khô của 2 loài *Paris polyphylla* Sm. var. *yunnanensis* (Franch.) Hand. Mazz. và *Paris polyphylla* Sm. var. *chinensis* (Franch.) H. Hara được thu hái vào mùa thu) gồm chonglou saponin I (pans saponin I, polyphyllin D), chonglou saponin II (paris saponin II), chonglou saponin VI (paris saponin VI) và chonglou saponin VII (paris saponin VII). Tổng hàm lượng của 4 chất trên không được thấp hơn 0,60% tính theo dược liệu khô kiệt^[8].

Chịu trách nhiệm: Thái Nguyễn Hùng Thu

Email: tnht22@yahoo.com

Ngày nhận: 24/12/2020

Ngày phản biện: 09/02/2021

Ngày duyệt bài: 19/02/2021

Nghiên cứu này được tiến hành nhằm xây dựng quy trình phân lập, tinh chế và thiết lập chất chuẩn polyphyllin D, góp phần tạo nguồn chất chuẩn phục vụ công tác kiểm tra và đánh giá chất lượng của dược liệu bầy lá một hoa và các sản phẩm từ dược liệu này.

Nguyên liệu và phương pháp nghiên cứu

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

Chất chuẩn: Chất chuẩn polyphyllin D được cung cấp bởi Chengdu Herbpurify Co. Ltd.; SKS: C-036-181216, hàm lượng 98,72%; độ ẩm 1,64%.

Trang thiết bị: Các thiết bị phân tích của Viện Kiểm nghiệm Thuốc Trung ương đã được hiệu chuẩn, đáp ứng yêu cầu của ISO/IEC 17025 và GLP; các trang thiết bị chiết xuất, phân lập và đo phổ của Viện Dược liệu, Viện Hóa học - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam, Viện Hóa Sinh biển - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam, bao gồm: Máy cất quay chân không IKA RV 3V (IKA - Đức); Tủ sấy UFB 500 (Mettler, Đức); Cân phân tích MS105 (Mettler, Thụy Sĩ); Máy sắc ký lỏng hiệu năng cao Acquity ARC (Water, Mỹ); Máy sắc ký lỏng hiệu năng cao điều chế Shimadzu LC-20A (Nhật Bản); Máy phân tích nhiệt trọng lực TGA (Mettler Toledo, Thụy Sĩ); Máy quang phổ UV-Vis U-1900 (Hitachi, Nhật Bản); Máy cộng hưởng từ hạt nhân Bruker Avance AM500FT- NMR (Bruker BioSpin, Thụy Sĩ); Máy đo phổ khối APCI-MS Varian Agilent 1100LC-MSD (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 μ m, Hãng Merck), bản mỏng tráng sẵn DC-Alufolien 60 F₂₅₄ (silica gel; 0,25 mm; Hãng Merck), dung dịch H₂SO₄ 10% trong EtOH 96% để phát hiện vết chất.

- Dung môi tinh khiết **HPLC** dùng trong thiết lập chuẩn: Acetonitril, methanol (Hãng Merck), acid phosphoric (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 ^[9, 10].

Kết quả và bàn luận

Chiết xuất

Bột thân rễ cây bầy lá một hoa (1 kg) được chiết hồi lưu bằng ethanol 70% trong thời gian 3 giờ \times 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 lập

Phân tán cao EtOH trong nước, sau đó chiết lỏng - lỏng 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–H₂O (90:5:5 \rightarrow 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–H₂O (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 silicagel và hệ dung môi DCM–MeOH–H₂O (80:19:1) thu được 4 phân đoạn (E7F1 - E7F4). Qua kiểm tra bằng sắc ký lớp mỏng, 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 với

polyphyllin D. Hỗn hợp này có tỷ lệ dioscin-polyphyllin D khoảng 1:2.

Tinh chế polyphyllin D bằng sắc ký lỏng hiệu năng cao điều chế

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 polyphyllin D 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 thu được các cặn. Hòa tan các cặn 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 polyphyllin D tinh khiết (414 mg).

Định tính và xác định cấu trúc

Sắc ký lớp mỏng: Trên ba hệ dung môi có độ phân cực khác nhau gồm: CHCl₃ - MeOH - H₂O (65:35:10), EtOAc - MeOH - H₂O (85:15:5) và CHCl₃ - EtOAc - MeOH - H₂O (15:40:22:10), polyphyllin D tinh chế được chỉ cho 1 vết duy nhất có màu sắc và giá trị R_f phù hợp với vết của polyphyllin D chuẩn.

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

Phổ hồng ngoại: Phổ hồng ngoại của mẫu polyphyllin D tinh chế được phù hợp với phổ hồng ngoại của polyphyllin D chuẩn.

Phổ khối lượng: Phổ **HR-ESI-MS** của polyphyllin D tinh chế được cho pic ion tại *m/z* 855,4756 [M+H]⁺ tương ứng với công thức phân tử C₄₄H₇₀O₁₆ của polyphyllin D.

Phổ cộng hưởng từ: Dữ liệu ¹H-NMR, ¹³C-NMR của polyphyllin D tinh chế được phù hợp với dữ liệu ¹H-NMR, ¹³C-NMR của polyphyllin D

đã công bố [11] được tổng hợp ở bảng 1.

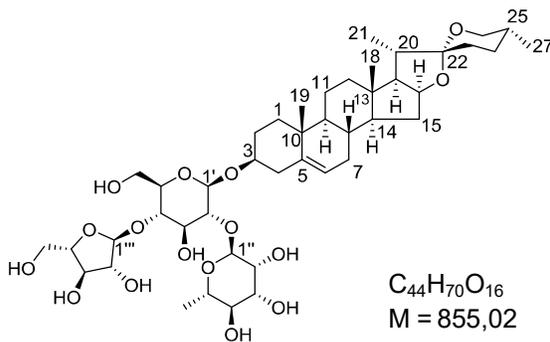
Bảng 1. Dữ liệu phổ của hợp chất polyphyllin D tinh chế được

C/H	Polyphyllin D tinh chế được (*)		Polyphyllin D [11](**)	
	¹ H-NMR ^a	¹³ C-NMR ^c	¹ H-NMR ^b	¹³ C-NMR ^d
1		38,6		38,2
2		30,8		30,9
3	3,60 (1H, m)	79,7	3,92 (1H, m)	79,0
4		39,6		39,6
5		142,5		141,5
6	5,40 (1H, d, 5,0)	122,6	5,50 (1H)	122,6
7		32,9		33,0
8		32,5		32,4
9		51,8		51,0
10		38,1		37,8
11		22,0		21,8
12		41,0		40,6
13		41,5		41,2
14		57,9		57,4
15		33,2		32,9
16		82,2		81,9
17		63,8		63,5
18	0,83 (3H, s)	16,7	0,88 (3H, s)	17,1
19	1,07 (3H, s)	19,8	1,08 (3H, s)	20,1
20		43,0		42,7
21	0,98 (3H, d, 7,0)	14,7	1,19 (3H, d, 6,9)	15,7
22		110,6		110,4
23		32,8		32,5
24		29,9		29,9
25		31,4		31,3
26		67,9		67,6
27	0,80 (1H, d, 6,0)	17,4	0,75 (3H, d, 4,3)	18,0
1'	4,80 (1H, overlap)	100,7	4,96 (1H, d, 7,8)	100,9
2'		79,1		78,2
3'		76,6		78,6
4'		79,1		78,5
5'		77,9		77,3
6'		62,1		62,1

C/H	Polyphyllin D tinh chế được ^(*)		Polyphyllin D ^{[11](**)}	
	¹ H-NMR ^a	¹³ C-NMR ^c	¹ H-NMR ^b	¹³ C-NMR ^d
1''	5,23 (1H, s)	102,1	6,24 (1H, brs)	102,7
2''		72,3		73,0
3''		72,6		73,4
4''		74,1		74,7
5''		69,8		70,2
6''	1,26 (3H, d, 6,0)	17,9	1,79 (3H, d, 6,1)	19,3
1'''	5,06 (1H, d, 2,0)	110,1	5,92 (1H, brs)	110,1
2'''		83,2		83,6
3'''		78,3		78,2
4'''		86,2		87,1
5'''		63,1		63,3

(*) đo trong MeOD ^a500 MHz ^b600 MHz
(**) đo trong Pyridin-d₅ ^c125 MHz ^d150 MHz

Cấu trúc hóa học của polyphyllin D xác định được như sau:



Thiết lập chất chuẩn polyphyllin D
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: 244 - 247°C

Định lượng: Bằng phương pháp **HPLC**, yêu cầu phải chứa không ít hơn 95,0% polyphyllin D (C₄₄H₇₀O₁₆), tính theo nguyên trạng.

Tạp chất liên quan: Bằng phương pháp **HPLC**, yêu cầu từng tạp 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 3438 (nhóm chức - OH); số sóng 1631(-C=C-); số sóng 1053 (ether). Phổ hồng ngoại của mẫu thử phù hợp với phổ hồng ngoại của polyphyllin D chuẩn.

Thời gian lưu của pic chính trên sắc ký đồ của dung dịch thử tinh chế được tương ứng với thời gian lưu của pic polyphyllin D trên sắc ký đồ của dung dịch chuẩn.

- **Mất khối lượng do làm khô:** Kết quả thu được như ở bảng 2.

Bảng 2. Kết quả xác định mất khối lượng do làm khô nguyên liệu thiết lập chuẩn polyphyllin D

STT	Lượng cân (mg)	Độ ẩm (%)	Yêu cầu	Kết luận
1	4,1780	1,09		
2	3,6850	1,12		
3	3,9810	1,12	≤ 2,0 %	Đạt
Trung bình		1,11		

Nhiệt độ nóng chảy

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

STT	Nhiệt độ nóng chảy (°C)	Yêu cầu	Kết luận
1	244,9		
2	245,6		
3	246,8	244-247 °C	Đạt
Trung bình		245,8	

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% (≤ 2,0 %), số đĩa lý thuyết là 6220 (≥ 3000), hệ số bất đối xứng T = 1,0; độ phân giải là 2,1 (≥ 1,5). Kết quả định lượng thu được như bảng 4.

Bảng 6. Kết quả đánh giá đồng nhất lô trong quá trình đóng gói chuẩn polyphyllin D

Lộ số	1	2	3	4	5	TB	RSD (%)
Hàm lượng (%)	96,67	98,18	97,40	98,14	97,48	97,58	0,64

Kết quả ở bảng 6 cho thấy độ lệch chuẩn của hàm lượng trong các lọ (n = 5) xác định được là 0,64% (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

Bảng 7. Các thông số của hệ sắc ký và kết quả đánh giá liên phòng chất chuẩn polyphyllin D

Các thông số	Yêu cầu	Khoa NCPT	Khoa Vật lý
		HPLC Water Shimadzu C18 (250 × 4,6 mm; 5 μm)	Shimadzu Agilent C18 (250 × 4,6 mm; 5 μm)
t_R (phút)		14,3	8,3
N	≥ 3000	6524	5720
T	$0,8 \leq T \leq 1,5$	1,0	0,8
R	≥ 1,5	2,3	2,4
RSD _{điện tích} (%)	≤ 2,0	0,17	0,34
Hàm lượng trung bình (%)		97,50	97,45
Phương sai		0,436	0,225
Số kết quả		6	6
Bậc tự do df			10
$T_{thực nghiệm}$			0,127
$T_{tiêu chuẩn}$			2,228

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 tổng hợp trong bảng 7.

Kết quả xử lý thống kê 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 polyphyllin D

STT	Hàm lượng (%) (nguyên trạng)	STT	Hàm lượng (%) (nguyên trạng)	Giá trị công bố trên CoA
1	98,35	7	97,32	Chuẩn phòng thí nghiệm Polyphyllin D SKS: PD.012020EC Hàm lượng: 97,47 % C ₄₄ H ₇₀ O ₁₆ (nguyên trạng) Độ không đảm bảo đo mở rộng: U = ± 0,32%, với hệ số phủ k = 2 ở độ tin cậy 95 %.
2	97,76	8	96,94	
3	97,81	9	97,82	
4	96,89	10	98,00	
5	96,54	11	97,76	
6	97,63	12	96,88	
Trung bình			97,47	
S			0,549	
RSD (%)			0,56	
U (%)			0,32	

Kết luận

Quy trình chiết xuất, phân lập và tinh chế polyphyllin D từ thân rễ cây bầy lá một hoa (*Paris polyphylla* Sm. var. *chinensis* (Franch.) H. Hara) đã được thực hiện bằng sắc ký cột và sắc ký lỏng hiệu năng cao điều chế. Kết quả thu được polyphyllin D đạt độ tinh khiết để thiết lập chất chuẩn. Quy trình kiểm tra chất lượng polyphyllin D 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 polyphyllin D với hàm lượng đạt 97,47% tính theo nguyên trạng, độ không đảm bảo đo mở rộng $U = \pm 0,32\%$ với hệ số phủ $k = 2$ ở mức tin cậy 95%.

Tài liệu tham khảo

1. Deng D., Lauren D. R., Cooney J. M., Jensen D. J., Wurms K. V., upntchard J., Cannon R. D., Wang M., Li M. (2008), "Antifungal saponins from *Paris polyphylla* Smith", *Planta Medica*, 74 (11), pp. 1397-1402.
2. Liu Z., Li N., Gao W., Man S., Ym S., Liu C. (2012), "Comparative study on hemostatic, cytotoxic and hemolytic activities of different species of *Paris* L.", *Journal of Ethnopharmacology*, 142 (3), pp. 789-794.
3. 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.
4. Wu S., Gao W., Duan H. Q., Jia W. (2004), "Advances in studies on chemical constituents and pharmacological activities of *Rhizoma paridis*", *Chinese Traditional and Herbal Drugs*, 35 (3), pp. 344-346.
5. Lee M. S. (2005), "Effects of polyphyllin D, a steroidal saponin in *Paris polyphylla*, in growth inhibition of human breast cancer cells and in xenograft", *Cancer Biology & Therapy*, 4 (11), pp. 1248-1254.
6. Ludagger C., Li C. J., Wu D. M., Lu J. M., Tu F., Wang L. J. (2011), "Induction of apoptosis by *Rhizoma paridis* saponins in MCF-7 human breast cancer cells", *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 5 (8), pp. 1086-1091.
7. Jiang H., Zhao P. J., Feng J. G., Su D., Ma S. L. (2014), "Effect of paris saponin I on radiosensitivity in a gefitinib-resistant lung adenocarcinoma cell line", *Oncology Letters*, 7 (6), pp. 2059-2064.
8. Pharmacopoeia of the people's republic of China (2015), IA, pp. 327-328.
9. Dược điển Việt Nam V (2017), Phụ lục 2.5.
10. SOP for the Production of ASEAN Reference Substances - 2015.
11. Shaojiang Deng, Biao Yu, Yongzheng Hui, Hai Yu, Xiuwen Han (1999), "Synthesis of three diosgenyl saponins: dioscin, polyphyllin D, and balanitin 7", *Carbohydrate Research*, 317, pp. 53-62.