



# Xây dựng phương pháp định lượng và theo dõi độ ổn định của oxostephanin trong thân lá cây củ dờm (*Stephania Dielsiana* Y. C. Wu) trong thời gian bảo quản

METHOD FOR THE QUANTIFICATION AND MONITORING OF THE STABILITY OF OXOSTEPHANIN IN THE STEMS AND LEAVES OF *STEPHANIA DIELSIANA* Y. C. WU IN THE STORAGE TIME

Trần Thị Thu Hiền<sup>1</sup>, Nguyễn Quốc Huy<sup>1</sup>, Hoàng Lê Sơn<sup>2</sup>  
Lê Thị Kim Vân<sup>2</sup>, Đào Thị Diễm<sup>1</sup>, Phạm Đoàn Anh Ninh<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Học viện Y Dược học cổ truyền Việt Nam

<sup>2</sup>Viện Dược Liệu

<sup>3</sup>Trường Cao đẳng Quân y 2 - Quân khu 7

## TÓM TẮT

Phương pháp định lượng oxostephanin trong thân lá củ dờm (*Stephania dielsiana* Y.C.Wu) bằng phương pháp đo quang UV-Vis tại bước sóng hấp thụ cực đại 414nm. Phương pháp xây dựng đã được thẩm định, các chỉ tiêu đạt yêu cầu, đảm bảo phương pháp có thể áp dụng định lượng oxostephanin trong thân lá củ dờm.

Đã áp dụng phương pháp định lượng để theo dõi độ ổn định của oxostephanin trong quá trình bảo quản, sơ chế. Hàm lượng oxostephanin có sự thay đổi khi tiến hành sấy ở các nhiệt độ sấy khác nhau và trong thời gian bảo quản khác nhau. Kết quả cho thấy nhiệt độ sấy tối đa khuyến cáo là 60°C và dược liệu sau khi thu hái nên được chiết ngay hoặc tối đa khoảng 4 tuần bảo quản.

**Từ khóa:** Độ ổn định, *Stephania dielsiana* Y.C. Wu, UV-Vis.

## SUMMARY

Quantitative method of oxostephanin in the stems and leaves of *S.dielsiana* by UV-Vis photometric method at the maximum absorption wavelength of 414 nm. The method has been validated, the criteria are satisfactory, ensuring that the method can be quantitatively applied to oxostephanin in the stems and leaves.

Quantitative method has been applied to monitor the stability of oxostephanin during storage and preliminary processing. The oxostephanin content changed when drying at different drying temperatures and during different storage times. The results show that the maximum recommended drying temperature is 60°C and the medicinal herbs should be extracted immediately or stored for up to 4 weeks

**Keywords:** độ ổn định, *Stephania dielsiana* Y.C. Wu, UV-Vis.

Ngày nhận bài: 28/5/2021

Ngày phản biện: 31/5/2021

Ngày chấp nhận đăng: 2/6/2021

## ĐẶT VẤN ĐỀ

Củ dòm (*Stephania dielsiana* Y. C. Wu) họ Tiết dè (Menispermaceae) được thu hái làm thuốc chữa đau lưng, nhức mỏi chân tay, đau bụng, đau dạ dày và sốt rét. Các nghiên cứu được lý cho thấy cao toàn phần, phân đoạn dịch chiết và hoạt chất của cây có tác dụng an thần, giảm đau, kháng viêm trên mô hình động vật [1], [3]. Nghiên cứu thành phần hóa học cho thấy ở thân lá và trong củ của cây củ dòm đều chứa hoạt chất oxostephanin với đặc tính chống ung thư trên 05 dòng tế bào ung thư gồm tế bào ung thư buồng trứng (OVCAR – 8), tế bào ung thư cổ tử cung (HeLa), tế bào ung thư biểu mô cuống phổi (HepG2), tế bào ung thư vú (MDA - MB – 231), tế bào ung thư phế nang (H358); hàm lượng trong thân và lá cao hơn trong củ [2], [4]. Điều này đặc biệt có ý nghĩa khi cây củ dòm thuộc nhóm quý hiếm trong tự nhiên, trong khi củ của cây được trồng tại vườn thuốc cần thời gian dài mới thu hoạch. Khi đó, bộ phận thường xuyên phải dọn dẹp và cắt tỉa là lá và thân sẽ là nguồn nguyên liệu lý tưởng rẻ tiền, sinh khối lớn để chiết tách oxostephanin. Tuy nhiên các hoạt chất trong phần thân lá của cây lại dễ bị thay đổi trong quá trình bảo quản.

Phương pháp đo quang UV-Vis là một phương pháp định lượng đơn giản, không yêu cầu máy móc quá phức tạp và dễ dàng triển khai định lượng với số lượng mẫu lớn trong thời gian ngắn. Bài báo này thông báo kết quả xây dựng quy trình định lượng oxostephanin trong thân lá cây củ dòm bằng phương pháp đo quang UV-Vis và áp dụng theo dõi độ ổn định của oxostephanin trong quá trình bảo quản.

## NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### Nguyên liệu

Nguyên liệu nghiên cứu là thân lá cây củ dòm được thu hái tại xã Tân Lĩnh - huyện Ba Vì - Hà Nội

vào tháng 11, 12 năm 2018. Loại nghiên cứu đã được giám định tên khoa học là *Stephania dielsiana* Y.C. Wu, họ Tiết dè (Menispermaceae). Mẫu nghiên cứu được lưu trữ tại khoa Bào chế - Chế biến, Viện Dược liệu.

### Phương pháp nghiên cứu

#### Xây dựng và thẩm định phương pháp định lượng oxostephanin bằng đo quang UV-Vis

Dung dịch thử: 1g dược liệu (độ ẩm 3,769%)/50ml methanol.

Dung dịch chuẩn gốc: 1mg oxostephanin/ 1ml dung dịch methanol.

Khảo sát bước sóng cực đại hấp thụ: Pha loãng dung dịch chuẩn gốc thành các nồng độ khác nhau, sau đó tiến hành quét phổ các dung dịch trên trong vùng từ 190nm đến 800nm với mẫu trắng là methanol.

Thẩm định phương pháp định lượng: xác định khoảng tuyến tính, giới hạn phát hiện (LOD), giới hạn định lượng (LOQ), độ chính xác, độ đúng.

#### Theo dõi độ ổn định của oxostephanin trong thân, lá củ dòm trong quá trình bảo quản, sơ chế

Khảo sát sự thay đổi hàm lượng oxostephanin trong thân, lá củ dòm qua quá trình sấy ở các nhiệt độ sấy khác nhau: 40, 50, 60, 70°C bằng tủ sấy.

Khảo sát sự thay đổi hàm lượng oxostephanin trong thân, lá củ dòm trong thời gian bảo quản: sử dụng mẫu dược liệu khô, tiếp tục bảo quản trong thời gian 1, 2, 4, 6, 8 và 16 tuần ở điều kiện thường.

Định lượng oxostephanin bằng phương pháp quang phổ UV-Vis. Hàm lượng oxostephanin trong củ dòm được tính theo công thức:

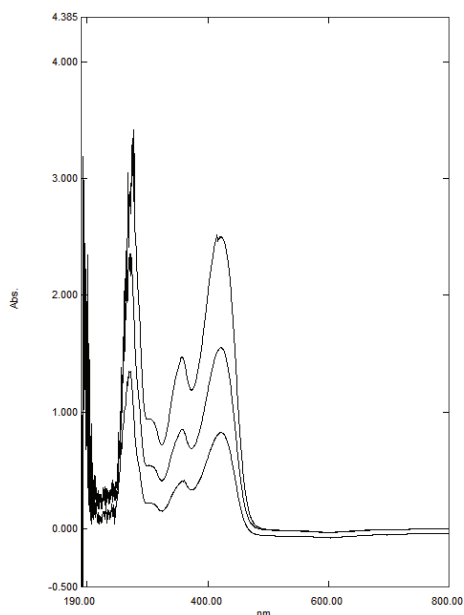
Hàm lượng oxostephanin (%) =  $[(C_{\text{thực}} \times V \times k \times 10^{-6}) / (m \times (100 - H))] \times 100$

## KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

### Xây dựng và thẩm định phương pháp định lượng oxostephanin bằng phương pháp đo quang UV-Vis



+ **Bước sóng cực đại phổ hấp thụ:** tiến hành cân 1,0001 mg chất chuẩn oxostephanin và hòa tan bằng 1 ml dung môi MeOH. Pha loãng dung dịch chuẩn trên thành dãy nồng độ, sau đó lấy 1 ml các dung dịch đã pha loãng đem quét bước sóng bằng máy đo quang phổ với mẫu trắng là dung dịch MeOH.



Hình 1. Phổ hấp thụ UV-Vis của chất chuẩn oxostephanin

Oxostephanin hấp thụ cực đại tại bước sóng 254 nm, 357 nm và 414 nm. Tuy nhiên nhận thấy tại bước sóng 414 nm đặc trưng cho oxostephanin hơn 2 bước sóng còn lại do nhiều hợp chất tự nhiên cũng có phổ hấp thụ cực đại tại bước sóng 254 nm và 357 nm. Từ đó để tài lựa chọn bước sóng  $\lambda = 414$  nm cho các bước nghiên cứu tiếp theo.

+ **Xác định khoảng tuyến tính**

Pha dãy nồng độ dung dịch chuẩn:

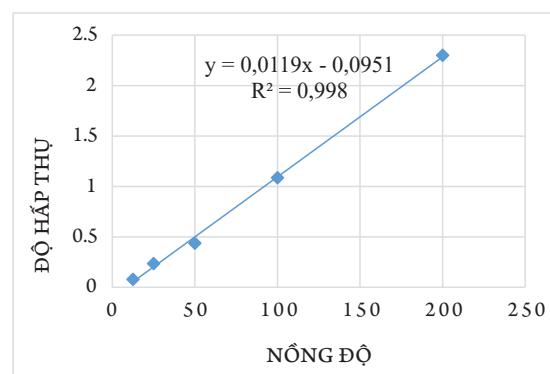
Cân 1,0000 mg chất chuẩn oxostephanin và hoà tan bằng 1 ml dung môi MeOH. Lắc đều và đem siêu âm cho chất chuẩn tan hết. Từ dung dịch chuẩn trên, tiến hành pha loãng thành các dãy nồng

độ tương ứng: 200, 100, 50, 25, 12,5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  bằng phương pháp pha loãng gấp đôi. Thực hiện đo độ hấp thụ UV-Vis của các dung dịch trên tại bước sóng 414 nm, kết quả được thể hiện ở bảng 1 và hình 2.

Bảng 1. Độ hấp thụ UV-Vis của các dung dịch chuẩn tại các nồng độ

STT	C ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	A
1	12,5	0,079
2	25	0,235
3	50	0,436
4	100	1,085
5	200	2,299

Phương trình hồi quy tuyến tính:  $y = 0,0119x - 0,0951$   
 $R^2 = 0,998$



Hình 2. Đồ thị biểu diễn sự phụ thuộc của độ hấp thụ UV-Vis vào nồng độ oxostephanin tại bước sóng 414 nm

**Nhận xét:** Độ hấp thụ UV-Vis và nồng độ oxostephanin có mối tương quan chặt chẽ, đạt yêu cầu ICH với hệ số tương quan  $R^2 = 0,998 > 0,995$ . Phương trình hồi quy tuyến tính  $y = 0,0119x - 0,0951$  hay  $\text{Abs} = 0,0119C - 0,0951$ . Dựa vào phương trình đã xây dựng được để xác định nồng độ oxostephanin thông qua độ hấp thụ A.

+ Giới hạn phát hiện (LOD) và giới hạn định lượng (LOQ)

Chuẩn bị mẫu: Tiến hành pha loãng gấp đôi dung dịch chuẩn oxostephanin thành các nồng độ khác nhau. Sau đó quét phổ UV-Vis. Xác định được nồng độ 0,0008 µg/ml là nồng độ thấp nhất mà tại đó còn có thể phát hiện được oxostephanin, độ dốc  $a = 0,0119$

- Giới hạn phát hiện:  $LOD = (2 \times C_{\min})/a = 0,2017 \mu\text{g/ml}$

- Giới hạn định lượng:  $LOQ = (10 \times C_{\min})/a = 0,6723 \mu\text{g/ml}$

+ Độ chính xác của phương pháp

- **Độ lặp lại:** Tiến hành chiết 6 mẫu dược liệu với 50 ml dung môi methanol trong cùng điều kiện. Sau đó mỗi mẫu lấy 1 mL dung dịch đem đo UV-Vis 3 lần tại bước sóng 414 nm và lấy giá trị trung bình. Kết quả được thể hiện ở bảng 2.

Bảng 2. Kết quả khảo sát độ lặp lại của phương pháp

STT	Khối lượng cân (g)	Hàm ẩm (%)	Độ hấp thụ A trung bình	Nồng độ C (µg/ml)
1	1,001	3,769	0,438	44,79
2	1,0017	3,769	0,478	48,16
3	1,0018	3,769	0,484	48,66
4	1,0013	3,769	0,452	45,97
5	1,0012	3,769	0,448	45,64
6	1,0012	3,769	0,440	44,97
Trung bình				46,37
RSD (%)				1,51

- **Độ chính xác trung gian**

Độ lặp lại trong ngày (n=3)

Tiến hành chiết 3 mẫu dược liệu trong 50 ml dung môi MeOH trong cùng điều kiện. Sau đó mỗi mẫu lấy 1 mL dung dịch đem đo UV-Vis 3 lần tại bước sóng 414 nm và lấy giá trị trung bình. Kết quả được thể hiện ở bảng 3.

Bảng 3. Kết quả khảo sát độ lặp lại trong ngày của phương pháp

STT	Khối lượng cân (g)	Hàm ẩm (%)	Độ hấp thụ A	Nồng độ C (µg/ml)
1	1,0017	3,769	0,477	48,08
2	1,0015	3,769	0,469	47,40
3	1,0019	3,769	0,479	48,24
Trung bình				47,90
RSD (%)				0,36

Độ lặp lại khác ngày (n=3)

Tiến hành chiết độc lập 3 mẫu dược liệu trong 50 ml dung môi MeOH trong cùng điều kiện. Sau đó mỗi mẫu lấy 1 mL dung dịch đem đo UV-Vis 3 lần tại bước sóng 414 nm và lấy giá trị trung bình, đo trong 3 ngày liên tiếp. Kết quả được thể hiện ở bảng 4.

Bảng 4. Kết quả khảo sát độ lặp lại khác ngày của phương pháp

Ngày	Khối lượng cân (g)	Hàm ẩm (%)	Độ hấp thụ A	Nồng độ C (µg/ml)
1	1,001	3,769	0,438	44,79
2	1,001	3,769	0,445	45,39
3	1,001	3,769	0,449	45,72
Trung bình				45,30
RSD (%)				0,38

**Nhận xét:** Từ kết quả nhận thấy RSD trong ngày và khác ngày đều < 2 %. Như vậy, phương pháp có độ chính xác cao và đạt yêu cầu phân tích.

+ **Độ đúng của phương pháp**

Tiến hành chiết 9 mẫu dược liệu có khối lượng cân chính xác khoảng 1 g trong 50 ml MeOH trong cùng điều kiện chiết xuất. Thêm lần lượt 1,0 ml dung dịch chuẩn có nồng độ là 35, 45, 55 (µg/ml)



vào các ống nghiệm chứa 1 ml dung dịch thử. Mỗi mức nồng độ thêm vào làm 3 mẫu. Sau đó đem đo UV-Vis tại bước sóng 414 nm và dựa vào phương trình đường chuẩn, tính được hàm lượng chuẩn tìm lại. Từ đó, xác định được phần trăm tìm lại chuẩn. Kết quả được thể hiện ở bảng 5.

*Bảng 5. Kết quả khảo sát độ đúng của phương pháp*

STT	Lượng thêm vào ( $\mu\text{g/ml}$ )	Lượng tìm lại ( $\mu\text{g/ml}$ )	Tỷ lệ phần trăm tìm lại (%)
1	35	35,05	100,14
2	35	35,07	100,20
3	35	35,07	100,20
4	45	45,56	101,24
5	45	45,59	101,31
6	45	45,58	101,29
7	55	54,88	99,78
8	55	54,90	99,82
9	55	54,86	99,75
<b>Trung bình RSD (%)</b>			<b>100,41 0,63</b>

**Nhận xét:** Độ thu hồi của phương pháp nằm trong khoảng 99,75% đến 101,31%, trung bình 100,41%, RSD = 0,63% < 2%. Vậy phương pháp phân tích đã đạt yêu cầu.

**- Theo dõi độ ổn định của oxostephanin trong thân, lá củ dòm trong quá trình bảo quản, sơ chế**

+ *Khảo sát sự thay đổi hàm lượng oxostephanin trong thân, lá củ dòm qua quá trình sấy*

Dược liệu sau khi thu hái, được rửa sạch và đem sấy tại các nhiệt độ sấy khác nhau: 40, 50, 60, 70°C bằng tủ sấy trong thời gian 24 giờ. Sau đó tiến hành chiết khoảng 1 g dược liệu trong 50 ml dung dịch MeOH trong 60 phút bằng phương pháp chiết

siêu âm, ở cùng điều kiện chiết xuất. Lấy 1 ml dịch chiết, đem đo UV-Vis tại bước sóng 414 nm. Kết quả được thể hiện ở bảng 6.

*Bảng 6. Kết quả khảo sát sự thay đổi hàm lượng oxostephanin trong thân, lá củ dòm qua quá trình sấy*

Nhiệt độ sấy ( $^{\circ}\text{C}$ )	Hàm ẩm (%)	Khối lượng cân (g)	Độ hấp thụ A	Nồng độ ( $\mu\text{g/ml}$ )	Hàm lượng (%)
40	7,492	1,0013	0,495	49,588	0,054
50	5,528	1,0019	0,497	49,756	0,052
60	4,609	1,0015	0,367	38,832	0,041
70	3,778	1,0018	0,345	36,983	0,038

Sau khi thu hái thân, lá củ dòm và đem sấy ở các nhiệt độ sấy khác nhau bằng tủ sấy, nhận thấy hàm lượng oxostephanin có sự thay đổi. Kết quả cũng cho thấy khi nhiệt độ sấy cao (70°C) hàm lượng oxostephanin thu được ít hơn so với khi sấy ở khoảng nhiệt độ thấp hơn. Do vậy, khuyến cáo cần kiểm soát nhiệt độ sấy cho phù hợp để hàm lượng dược chất thu được là nhiều nhất. Nhiệt độ tối đa khuyến cáo là 60°C.

+ *Khảo sát sự thay đổi hàm lượng oxostephanin trong thân, lá củ dòm trong thời gian bảo quản*

Sử dụng mẫu dược liệu khô với hàm ẩm đo được ban đầu đạt 3,769%, tiếp tục bảo quản trong thời gian 1, 2, 4, 6, 8 và 16 tuần ở điều kiện thường. Sau mỗi khoảng thời gian bảo quản đó, lấy khoảng 1 g dược liệu chiết với 50 ml MeOH trong 60 phút bằng phương pháp chiết siêu âm. Sau đó, lấy 1 mL dịch chiết đem đo UV-Vis. Kết quả được thể hiện ở bảng 7.

Bảng 7. Kết quả khảo sát sự thay đổi hàm lượng oxostephanin trong thân, lá củ dền trong thời gian bảo quản

Thời gian bảo quản (tuần)	Hàm ẩm (%)	Khối lượng cân (g)	Độ hấp thụ A	Nồng độ ( $\mu\text{g/ml}$ )	Hàm lượng oxostephanin (%)	Tỷ lệ giảm hàm lượng oxostephanin (%)
1	3,769	1,0013	0,498	49,840	0,052	0
2	3,768	1,0015	0,490	49,168	0,051	1,92
4	3,669	1,0015	0,475	47,907	0,050	3,84
6	3,665	1,0018	0,419	43,204	0,045	13,46
8	3,650	1,0016	0,315	34,463	0,036	30,77
16	3,558	1,0012	0,159	21,354	0,022	57,69

Trong quá trình bảo quản dược liệu củ dền ở điều kiện thường trong khoảng thời gian 16 tuần, nhận thấy hàm lượng oxostephanin đo được có giá trị giảm dần. Do vậy, dược liệu sau khi thu hái nên được chiết ngay hoặc tối đa khoảng 4 tuần bảo quản.

## KẾT LUẬN

Phương pháp định lượng bằng phương pháp đp quang UV-Vis đã được xây dựng để định lượng hàm lượng oxostephanin trong thân, lá cây củ dền.

Phương pháp xây dựng đã được thẩm định, các chỉ tiêu đạt yêu cầu, đảm bảo phương pháp có thể áp dụng định lượng oxostephanin trong thân, lá củ dền.

Đã áp dụng phương pháp định lượng để theo dõi độ ổn định của oxostephanin trong quá trình bảo quản, sơ chế. Hàm lượng oxostephanin có sự thay đổi khi tiến hành sấy ở các nhiệt độ sấy khác nhau và trong thời gian bảo quản khác nhau. Kết quả cho thấy nhiệt độ sấy tối đa khuyến cáo là 60°C và dược liệu sau khi thu hái nên được chiết ngay hoặc tối đa khoảng 4 tuần bảo quản.

## LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu này là một phần được tài trợ bởi Đề tài NCKH cấp Bộ Y tế phê duyệt theo Quyết định 2721/QĐ-BYT ngày 28/6/2019.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Nguyễn Quốc Huy (2010), *Nghiên cứu về thực vật, thành phần hóa học, một số tác dụng sinh học của một số loài thuộc chi Stephania Lour. ở Việt Nam*, Luận án Tiến sĩ Dược học, ĐH Dược Hà Nội, Hà Nội.
2. Nguyễn Quốc Huy (2015), “Đánh giá tác dụng ức chế một số dòng tế bào ung thư của các chất tinh khiết phân lập từ loài *Stephania dielsiana* Y. C. Wu”, *Tạp chí Dược học*, số 1/2015, tr. 28 - 31.
3. Nguyễn Quốc Huy, Phạm Thanh Kỳ, Nguyễn Trọng Thông, Trần Thanh Tùng (2009), “Nghiên cứu tác dụng giảm đau, chống viêm của loài *Stephania dielsiana* Y.C.Wu”, *Tạp chí Dược học*, tập 14, số 6/2009, tr. 292 - 297.
4. Nguyễn Vũ Minh, Nguyễn Quốc Huy, Phạm Thanh Kỳ, Nguyễn Đức Toàn, Đỗ Thị Bích Thuận, Trương Đức Mạnh, Ngô Văn Tuyên (2014), “Định lượng oxostephanin trong củ dền (*Stephania dielsiana* Y.C.Wu) bằng sắc ký lỏng hiệu năng cao”, *Tạp chí Dược học*, tháng 4 năm 2014, số 457, tr. 54.