

**XÂY DỰNG QUY TRÌNH ĐỊNH LƯỢNG SAPONIN TOÀN PHẦN
TRONG RỄ ĐÌNH LĂNG (*POLISCIAS FRUTICOSA* (L) HAMRS)
ĐƯỢC THU HÁI TẠI THÁI NGUYÊN BẰNG PHƯƠNG PHÁP ĐO QUANG**

Bùi Thị Luyện*, Hoàng Thị Cúc, Dương Ngọc Nga,
Nguyễn Hồng Thái, Nguyễn Thị Hồng Hạnh
Trường Đại học Y Dược - ĐH Thái Nguyên

TÓM TẮT

Mục tiêu: Xây dựng phương pháp xác định saponin toàn phần trong rễ đình lăng bằng phương pháp đo quang. Phương pháp: sử dụng phương pháp đo độ hấp thụ tử ngoại sau khi chiết mẫu và làm phản ứng tạo màu Rosenthaler của saponin với thuốc thử acid perchloric và vanillin trong acid acetic băng cho sản phẩm màu tím hoa cà. Kết quả: Khoảng tuyến tính được xây dựng với nồng độ acid oleanolic trong khoảng 5-30 µg/ml với độ tuyến tính $r \approx 1$. Phương pháp phân tích độ đúng và độ lặp lại (99,775%) đều cho kết quả phù hợp với yêu cầu phân tích với giá trị RSD lần lượt là 4,74 và 3,5%.

Kết luận: Như vậy, phương pháp đo quang phổ UV-vis đã xây dựng đạt yêu cầu phép định lượng saponin tổng trong dược liệu đình lăng.

Từ khóa: định lượng, đình lăng, saponin toàn phần, độ hấp thụ tử ngoại UV-vis

Ngày nhận bài: 12/8/2019; Ngày hoàn thiện: 08/10/2019; Ngày đăng: 11/10/2019

**BUILDING THE METHOD OF QUANTIFICATION OF TOTAL SAPONIN
IN ROOTS OF POLISCIAS FRUTICOSA WHICH WERE HARVESTED
AT THAI NGUYEN BY UV-VIS SPECTROPHOTOMETRY**

Bui Thi Luyen*, Hoang Thi Cuc, Duong Ngoc Nga,
Nguyen Hong Thai, Nguyen Thi Hong Hanh
University of Medicine and Pharmacy - TNU

ABSTRACT

Objective: To establish for content determination of total saponins in the roots of *poliscias fruticosa*. *Methods:* Total saponins was determined by UV-VIS spectrophotometry after extracts of the sample had been coloured. *Results:* The methods was linear in the range of 5-30 µg/ml ($r=0.9987$), and the average recovery was 99.775%, RSD was 3.5% (n=6) and repetition rate with RSD= 4.74%. *Conclusion:* The methods is qualified for the determination of the contents of saponins in herbal medicine poliscias fruticosa.

Keywords: *determination, total saponin, UV-Vis spectrophotometric, poliscias fruticosa.*

Received: 12/8/2019; Revised: 08/10/2019; Published: 11/10/2019

* Corresponding author. Email: builuyentn@gmail.com

1. Đặt vấn đề

Ở Việt Nam, các nghiên cứu về đỉnh lãng được thực hiện nhiều vào những năm 60 - 80 với một loạt các công trình nghiên cứu của Ngô Ứng Long, Đặng Hạnh Phúc, Đỗ Công Huỳnh,... với các nghiên cứu sâu về tác dụng bổ chung, tác dụng tăng lực, tác dụng sinh thích nghi, tác dụng trên tim mạch, tiết niệu hệ thống máu, hệ thần kinh trung ương, hoạt động sinh dục và hệ thống enzym. Giai đoạn những năm 90 các nghiên cứu về thành phần hóa học ở mức độ cao hơn đã được tiến hành, đã xác định cấu trúc phân tử của các hoạt chất bằng các phương tiện thiết bị hiện đại như UV, IR, NMR, các nghiên cứu này đều được cho thấy trong đỉnh lãng có chứa các saponin triterpenoid với một genin đã được xác định rõ là acid oleanolic. Tuy nhiên, các tài liệu này chủ yếu mới chỉ đưa ra các kết quả nghiên cứu về tác dụng dược lý hoặc thành phần hóa học cấu trúc phân tử mà ít đề cập đến việc kiểm soát chất lượng dược liệu [1].

Mặt khác, theo khuyến cáo của tổ chức y tế thế giới về nghiên cứu thuốc từ dược liệu, ngoài các yếu tố hiệu quả lâm sàng, nghiên cứu về cơ chế tác dụng, cần phải có các nghiên cứu về thành phần hóa học cũng như các phương pháp đánh giá chất lượng dược liệu một cách khoa học được đầy đủ. Chính vì vậy, chúng tôi tiến hành đề tài:

Xây dựng quy trình định lượng Saponin toàn phần trong rễ Đỉnh lãng (*Poliscias Fruticosa*) được thu hái tại Thái Nguyên bằng phương pháp đo quang.

2. Nguyên liệu và phương pháp nghiên cứu

Nguyên vật liệu, hóa chất và thiết bị

Nguyên liệu: Vô Rễ Đỉnh lãng (*Poliscias Fruticosa* (L) Hamrs) 5 năm tuổi được thu hái tại Thái Nguyên.

Hóa chất, dung môi: đạt độ tinh khiết phân tích (PA), chất chuẩn acid oleanolic của Viện kiểm nghiệm thuốc Trung ương hàm lượng 98%.

Thiết bị: Máy siêu âm Power sonic 405; máy cắt quay Rotavapor R-220, Rotavapor R-200

(BUCHI); tủ sấy Memmert, Binder-FD115; bếp điện, bếp đun cách thủy; tủ sấy chân không Heraeus VT6025, Châu Âu; cân kỹ thuật Precisa BJ 610C, cân phân tích Precisa 262SMA-FR, cân xác định độ ẩm Precisa HA 60; máy đo quang UV-Vis Spectrophotometer...

Phương pháp nghiên cứu

* *Xây dựng quy trình định lượng acid oleanolic trong dược liệu đỉnh lãng bằng phương pháp đo quang*

Nhiều công trình nghiên cứu về thành phần hoạt chất trong đỉnh lãng như nghiên cứu của các tác giả Nguyễn Thị Ánh Tuyết [1], Võ Duy Huân [2] đều cho thấy trong đỉnh lãng có chứa các saponin triterpenoid với một sapogenin đã được xác định là acid oleanolic. Vì vậy, để chiết xuất acid oleanolic trong đỉnh lãng, chúng tôi tiến hành tham khảo các tài liệu về chiết xuất saponin và sapogenin trong dược liệu [2],[3], [4], [5], [6], [7]. Căn cứ vào các tài liệu tham khảo và quy trình thực nghiệm, chúng tôi tiến hành xây dựng phương pháp định lượng như sau:

- Chuẩn bị thuốc thử (TT), dung dịch chuẩn, dung dịch thử và môi trường

+ Chuẩn bị thuốc thử vanillin trong acid acetic băng 50 mg/ml: Cân 0,5 g vanillin tinh thể pha trong acid acetic băng vừa đủ 10 ml thu được thuốc thử có nồng độ 50 mg/ml.

+ Thuốc thử: acid perchloric

+ Môi trường: acid acetic băng

+ Dung dịch chuẩn: lấy chính xác khoảng 5,0 mg chất chuẩn acid oleanolic pha trong ethanol tuyệt đối vừa đủ 50ml thu được dung dịch chuẩn có nồng độ 0,1mg/ml.

+ Dung dịch thử: Cân chính xác khoảng 50,0 g bột rễ đỉnh lãng chiết hồi lưu với 60 ml tetrahydrofuran (THF) để loại chất béo, chiết siêu âm với dung môi ethanol 70% (tỷ lệ dung môi: dược liệu = 10:1), chiết 3 lần, mỗi lần trong 1 giờ. Lọc, gộp dịch chiết và loại dung môi dưới áp suất giảm thu được dịch chiết

đậm đặc (khoảng 7-10 ml), pha loãng gấp đôi với nước cất, lắc với n-butanol bão hòa nước (3 lần x 20 ml), để chiết chọn lọc lấy thành phần saponin. Thu hồi dung môi butanol đến cạn hoàn toàn. Cân chính xác khoảng 5,0 mg cấn pha trong ethanol tuyệt đối vừa đủ 10 ml thu được dung dịch thử có nồng độ 0,5 mg/ml.

- Khảo sát và tìm điều kiện đo quang

+ Khảo sát cực đại hấp thụ quang

+ Khảo sát ảnh hưởng của nhiệt độ phản ứng

+ Khảo sát ảnh hưởng của thời gian phản ứng

+ Khảo sát ảnh hưởng của nồng độ thuốc thử vanillin

+ Khảo sát ảnh hưởng của acid perchloric

- Thẩm định và đánh giá phương pháp: Xác định khoảng nồng độ tuyến tính, độ lặp lại, độ đúng,

- Ứng dụng phương pháp đã xây dựng xác định hàm lượng saponin trong các bộ phận dùng làm thuốc của đinh lăng: phân tích 5-10 mẫu

- Phương pháp xử lý số liệu: sử dụng các phương pháp xử lý thống kê trong phân tích, phần mềm Microsoft office excel...

Hàm lượng saponin(%) tính theo dược liệu khô được tính bằng công thức:

$$X(\%) = \frac{C \cdot 10^{-6} \cdot k \cdot m_{cao} \cdot (100 - B) \cdot 100}{m_{cân} \cdot m_{dl} \cdot (100 - A)}$$

Trong đó: C: nồng độ của acid oleonic trong dung dịch mẫu thử ($\mu\text{g/ml}$)

k: hệ số pha loãng; A: Hàm ẩm dược liệu(%)

B: Hàm ẩm cao (%);

m_{dl} : khối lượng dược liệu dùng định lượng (g); m_{cao} : khối lượng cao chiết được (g); $m_{cân}$: khối lượng cao dùng định lượng (g)

3. Kết quả và bàn luận

3.1. Khảo sát cực đại hấp thụ quang

Bảng 1. Ảnh hưởng của nhiệt độ phản ứng tới mật độ quang

Nhiệt độ ($^{\circ}\text{C}$)	50	60	70	80	90
Mật độ quang (ABS)	0,402	0,468	0,813	0,815	0,819

Nhận xét: từ kết quả trên cho thấy, ở nhiệt độ 70-90 $^{\circ}\text{C}$ mật độ hấp thụ quang không thay đổi nhiều. Vì thế ở các thí nghiệm tiếp theo chúng tôi tiến hành ở 70 $^{\circ}\text{C}$.

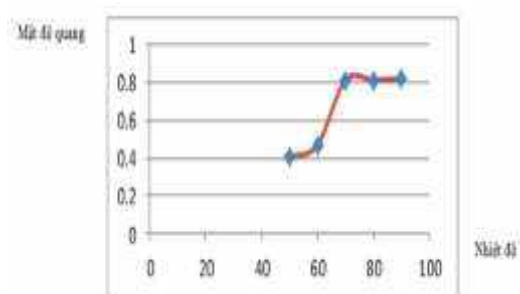
Hút chính xác 2 ml dung dịch chuẩn vào bình định mức 10ml, bốc hơi trên bếp cách thủy đến cạn ở 80 $^{\circ}\text{C}$. Thêm 0,3 ml vanillin /acid acetic băng (TT) và 1,0 ml acid perchloric (TT) vào, lắc đều và đun cách thủy ở 70 $^{\circ}\text{C}$ trong 20 phút. Sau đó làm lạnh nhanh trong cốc nước đá và thêm dung dịch acid acetic băng đến vạch. Quét phổ trên máy đo quang trong khoảng bước sóng từ 300-800 nm. Kết quả thu được giá trị bước sóng cực đại là 550 nm. Do đó chúng tôi chọn 550 nm là bước sóng khảo sát.

3.2. Khảo sát điều kiện phản ứng

Nhằm xác định các điều kiện tối ưu cho phản ứng tạo màu với thuốc thử, chúng tôi khảo sát các yếu tố của phản ứng sau:

3.2.1. Khảo sát nhiệt độ phản ứng

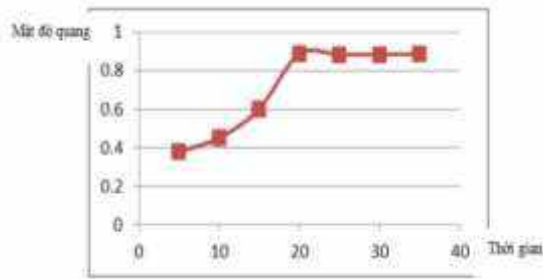
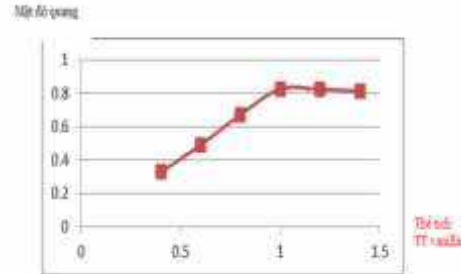
Chuẩn bị 6 bình định mức dung tích 10ml, đánh số 1-6. Hút chính xác vào 5 bình mỗi bình 2ml dung dịch chuẩn, bình 6 là 2 ml ethanol 96 %, làm khô đến cạn. Thêm vào cả 6 bình 0,3 ml thuốc thử vanillin và 1,0 ml thuốc thử acid perchloric, đặt bình vào bể điều nhiệt với các nhiệt độ tương ứng (50 $^{\circ}\text{C}$, 60 $^{\circ}\text{C}$, 70 $^{\circ}\text{C}$, 80 $^{\circ}\text{C}$, 90 $^{\circ}\text{C}$) trong 10 phút, sau đó làm lạnh nhanh, thêm acid acetic băng đến vạch và đo quang tại bước sóng 550 nm, bình 6 là mẫu trắng. Kết quả được trình bày trong bảng 1 và hình 1.



Hình 1. Đồ thị ảnh hưởng của nhiệt độ phản ứng tới mật độ quang

Bảng 2. Ảnh hưởng của thời gian phản ứng tới mật độ quang

Thời gian (phút)	5	10	15	20	25	30	35
Mật độ quang (ABS)	0,379	0,450	0,601	0,885	0,883	0,883	0,885

**Hình 2.** Đồ thị ảnh hưởng của thời gian phản ứng tới mật độ quang**Hình 3.** Đồ thị ảnh hưởng của nồng độ thuốc thử vanillin**Bảng 3.** Ảnh hưởng của nồng độ thuốc thử vanillin

V vanillin (ml)	0,1	0,3	0,6	0,9	1,2
Nồng độ vanillin (mg/ml)	0,5	1,5	3,0	4,5	6
Độ hấp thụ quang (abs)	0,329	0,655	0,797	0,724	0,701

3.2.2. Khảo sát ảnh hưởng của thời gian phản ứng

Chuẩn bị 8 bình định mức dung tích 10 ml, đánh số từ 1-8. Hút chính xác vào 7 bình (từ 1-7) mỗi bình 2 ml dung dịch chuẩn, bình 8 là 2 ml ethanol 96%, làm khô đến cạn, thêm cả vào 8 bình 0,3 ml thuốc thử vanillin và 1 ml thuốc thử acid perchloric, lắc đều. Cho vào bể điều nhiệt ở 70°C trong những khoảng thời gian nhất định (5 phút, 10 phút, 20 phút, 25 phút, 30 phút, 35 phút), sau đó làm lạnh nhanh trong cốc nước đá, thêm acid acetic băng đến vạch, lắc đều và đo độ hấp thụ ở 550 nm. Bình 8 là mẫu trắng. Kết quả khảo sát thu được như bảng 2 và hình 2.

Nhận xét: Kết quả cho thấy sau 20 phút phản ứng, độ hấp thụ đạt cực đại và gần như không thay đổi khi tăng thời gian. Vì vậy, chúng tôi chọn thời gian phản ứng là 20 phút.

3.2.3. Khảo sát ảnh hưởng của nồng độ thuốc thử vanillin/acid acetic băng

Tiến hành: chuẩn bị 6 bình định mức dung tích 10ml, đánh số từ 1-6. Hút chính xác vào 5 bình (từ 1-5), mỗi bình 2 ml dung dịch chuẩn, làm khô đến cạn. Thêm vào 6 bình lượng thuốc thử vanillin tương ứng như trong bảng và 1 ml thuốc thử acid perchloric, lắc

đều. Cho các bình vào bể điều nhiệt ở nhiệt độ 70°C trong 20 phút, sau đó làm lạnh nhanh trong cốc nước đá, thêm acid acetic đến vạch, lắc đều, đem đo độ hấp thụ ở 550 nm. Bình 6 là mẫu trắng. Kết quả như thể hiện ở bảng 3 và hình 3.

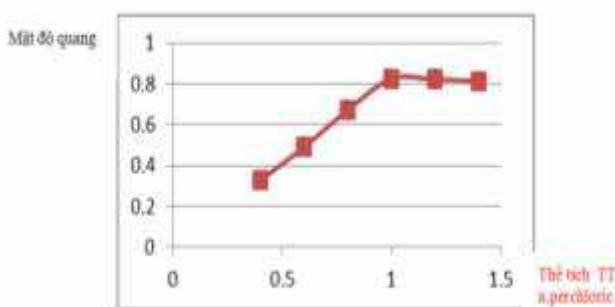
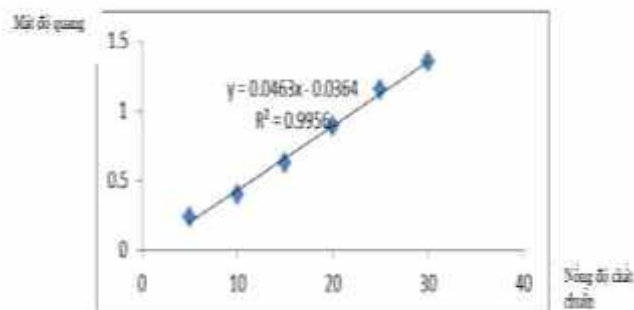
Nhận xét: Kết quả cho thấy khi dùng 0,6 ml thuốc thử vanillin /acid acetic băng (tương ứng với nồng độ 3mg/ml) thì mật độ quang đạt giá trị cực đại. Do đó, trong các thí nghiệm tiếp theo chọn giá trị này để tiến hành làm phản ứng tạo màu.

3.2.4. Khảo sát ảnh hưởng của nồng độ thuốc thử acid perchloric

Chuẩn bị 7 bình định mức dung tích 10 ml, đánh số từ 1-7. Hút chính xác vào 6 bình (từ 1-6), mỗi bình 2 ml dung dịch chuẩn, làm khô đến cạn. Thêm vào cả 6 bình 0,6 ml thuốc thử vanillin và 1 lượng thuốc thử acid perchloric tương ứng như trong bảng, lắc đều. Cho các bình vào bể điều nhiệt ở nhiệt độ 70°C trong 20 phút, sau đó làm lạnh nhanh trong cốc nước đá, thêm acid acetic đến vạch, lắc đều và đem đo độ hấp thụ ở 550 nm. Bình 7 là mẫu trắng. Kết quả thể hiện ở bảng 4 và hình 4.

Bảng 4. Ảnh hưởng của nồng độ thuốc thử acid perchloric

V thuốc thử (ml)	0,4	0,6	0,8	1,0	1,2	1,4
Nồng độ thuốc thử (ml/ml)	0,04	0,06	0,08	0,1	0,12	0,14
Mật độ quang	0,327	0,490	0,671	0,825	0,822	0,813

**Hình 4.** Đồ thị ảnh hưởng của nồng độ thuốc thử acid perchloric**Hình 5.** Đồ thị biểu diễn sự phụ thuộc mật độ quang vào nồng độ chất chuẩn tại bước sóng 550nm**Bảng 5.** Độ hấp thụ quang của dãy dung dịch chuẩn

Nồng độ chất chuẩn (µg/ml)	5	10	15	20	25	30
Mật độ quang (abs)	0,232	0,385	0,588	0,892	1,05	1,347
Phương trình hồi quy tuyến tính	$Y = 0,0463x - 0,0364$					
Hệ số tương quan	$R^2 = 0,9956$					

Nhận xét. Thể tích acid perchloric 1,0 ml mật độ đo quang đạt giá trị cực đại. do đó chúng tôi chọn thể tích 1,0 ml acid perchloric để tiến hành các thí nghiệm tiếp theo.

Kết luận: từ kết quả quá trình khảo sát chúng tôi đưa ra quy trình xử lý mẫu như sau:

Nhiệt độ phản ứng: 70°C; thời gian phản ứng: 20 phút; bước sóng đo quang: 550 nm;

Nồng độ TT vanillin/acid acetic băng: 0,6 ml; nồng độ TT a. perchloric: 1,0 ml

Thẩm định phương pháp phân tích

3.3. Xác định khoảng tuyến tính

Chuẩn bị các bình định mức dung tích 10ml được đánh số thứ tự. Hút chính xác vào 6 bình định mức các thể tích dung dịch chuẩn lần lượt là 0,5 ml; 1,0 ml; 1,5 ml; 2,0 ml; 2,5 ml; 3,0 ml và mẫu trắng được chuẩn bị song song, chỉ không chứa chất chuẩn; bốc hơi trên bếp cách thủy đến cạn ở 80°C. Cho vào lần lượt vào các bình này là 0,6 ml thuốc thử vanillin/ acid acetic băng; 1,0 ml thuốc thử acid perchloric rồi ủ ở 70°C trong 20 phút. Sau đó làm lạnh nhanh trong cốc nước đá và thêm dung dịch acid acetic băng đến vạch.

Lắc đều, đo mật độ quang ở 550 nm. Kết quả được trình bày ở bảng 5.

Từ kết quả ở bảng 5 và hình 5 cho thấy với nồng độ của acid oleanolic trong dung dịch đo quang từ 5-30 µg/ml có sự tương quan tuyến tính giữa độ hấp thụ quang và nồng độ acid oleanolic theo phương trình $y = 0,0463x - 0,0364$, với hệ số tương quan $R^2 = 0,9956$.

3.4. Độ lặp lại của phương pháp

Để xác định độ lặp lại của phương pháp, tiến hành với 6 thí nghiệm riêng biệt, với cùng điều kiện chiết (mẫu M0).

Tiến hành: chuẩn bị bình định mức dung tích 10 ml. Hút chính xác vào bình mức 1 ml dung dịch thử, bốc hơi đến cạn trong nồi cách thủy ở 80°C. Lần lượt cho vào bình này 0,6 ml thuốc thử vanillin/acid acetic băng, 1,0 ml thuốc thử acid perchloric rồi ủ ở 20°C trong 20 phút. Sau đó làm lạnh nhanh trong cốc nước đá và thêm dung dịch acid acetic băng đến vạch. Lắc đều, đo độ hấp thụ quang tại 550 nm. Mẫu trắng được chuẩn bị song song, chỉ không chứa dung dịch thử. Kết quả thu được như thể hiện ở bảng 6.

Bảng 6. Kết quả xác định độ lặp lại của phương pháp đo quang

Mẫu	Khối lượng được liệu (g)	Hàm ẩm được liệu (%)	Khối lượng cần (g)	Hàm ẩm cần (%)	Khối lượng cân (g)	Mật độ quang (abs)	Độ hấp thụ A	Hàm lượng saponin trung bình (%)
M1	50,0126	5,15	6,664	3,01	0,0056	0,653	0,654	3,63
	50,0126	5,15	6,664	3,01	0,0056	0,653		
	50,0126	5,15	6,664	3,01	0,0056	0,655		
M2	50,0126	5,15	6,664	3,01	0,0053	0,651	0,651	3,815
	50,0126	5,15	6,664	3,01	0,0053	0,650		
	50,0126	5,15	6,664	3,01	0,0053	0,653		
M3	50,0126	5,15	6,664	3,01	0,0050	0,650	0,653	4,055
	50,0126	5,15	6,664	3,01	0,0050	0,656		
	50,0126	5,15	6,664	3,01	0,0050	0,655		
M4	50,0126	5,15	6,664	3,01	0,0056	0,632	0,633	3,52
	50,0126	5,15	6,664	3,01	0,0056	0,636		
	50,0126	5,15	6,664	3,01	0,0056	0,633		
M5	50,0126	5,15	6,664	3,01	0,0053	0,655	0,653	3,83
	50,0126	5,15	6,664	3,01	0,0053	0,652		
	50,0126	5,15	6,664	3,01	0,0053	0,652		
M6	50,0126	5,15	6,664	3,01	0,0051	0,643	0,644	3,925
	50,0126	5,15	6,664	3,01	0,0051	0,645		
	5 0,0126	5,15	6,664	3,01	0,0051	0,646		

RSD = 4,74%

Bảng 7. Kết quả đánh giá độ đúng của phương pháp

STT	Khối lượng cần (g)	Lượng chuẩn thêm ($\times 10^{-3}$ g)	Độ hấp thụ	Lượng chuẩn thu hồi ($\times 10^{-3}$ g)	Độ thu hồi (%)
1	0,0056	15	1,240	14,9	99,33
2	0,0056	15	1,243	15,03	100,17
3	0,0056	15	1,246	15,10	100,67
4	0,0056	15	1,213	14,26	95,06
5	0,0056	15	1,239	14,92	99,5
6	0,0056	15	1,205	14,05	93,67
Hàm lượng trung bình (%)					99,775
RSD (%)= 3,5%					

Kết quả ở bảng 6 cho thấy phương pháp có độ lặp lại có thể chấp nhận được thông qua RSD = 4,74%.

3.5. Độ đúng

Độ đúng được xác định bằng phương pháp thêm chính xác acid oleanolic chuẩn vào mẫu thử đã xác định hàm lượng saponin toàn phần (M1) sao cho tổng nồng độ nằm trong khoảng tuyến tính đã khảo sát. Tiến hành chiết và định lượng, từ kết quả thu được xác định độ thu hồi của phương pháp. Thực hiện ở một mức nồng độ với 6 lần lặp lại riêng biệt. Kết quả thu được như bảng 7.

Nhận xét: kết quả khảo sát cho thấy phương pháp phân tích đã lựa chọn có tỷ lệ thu hồi cao 99,775%, có độ đúng tốt với giá trị RSD = 3,5%.

Ứng dụng phương pháp vừa xây dựng vào định lượng một số mẫu rễ Đinh lăng: Cân chính xác khoảng 50,0 g bột rễ đinh lăng chiết hồi lưu với 60 ml tetrahydrofuran (THF) để loại chất béo, chiết siêu âm với dung môi ethanol 70% (tỉ lệ dung môi: được liệu = 10:1), chiết 3 lần, mỗi lần trong 1 giờ. Lọc, gộp dịch chiết và loại dung môi dưới áp suất giảm thu được dịch chiết đậm đặc (khoảng 7-10 ml), pha loãng gấp đôi với nước cất, lắc với n-butanol bão hòa nước (3 lần x 20 ml), để chiết chọn lọc lấy thành phần saponin. Thu hồi dung môi butanol đến cạn hoàn toàn. Cân chính xác khoảng 5,0 mg cần pha trong ethanol tuyệt đối vừa đủ 10 ml. Hút chính xác 1 ml dung dịch thử vào bình định mức 10 ml,

bốc hơi cách thủy đến cạn. Thêm 0,6 ml vanillin/acid acetic băng và 1,0 ml acid perchloric vào bình, lắc đều và ủ ở 70°C trong 20 phút. Sau đó làm lạnh nhanh trong cốc nước đá và thêm acid acetic băng đến vạch. Dung dịch so sánh là mẫu trắng được chuẩn bị song song với dung dịch thử. Định lượng theo phương pháp đường chuẩn. Thu được kết quả như kết quả trình bày ở bảng 8.

Bảng 8. Kết quả định lượng saponin toàn phần trong một số mẫu rễ đinh lăng

Mẫu	KL dược liệu (g)	Hàm ẩm DL (%)	KL cần (g)	Hàm ẩm cần (%)	KL cân (g)	Mật độ quang	HL saponin toàn phần (%)
M1	50,0028	5,15	6,8260	2,83	0,0053	0,550	3,34
M2	50,0122	6,30	6,9015	2,04	0,0049	0,653	4,385
M3	50,0126	6,25	6,2510	2,55	0,0048	0,620	3,835
M4	50,0123	5,55	6,0225	3,00	0,0050	0,489	2,87
M5	50,0117	5,80	6,6830	2,88	0,0052	0,655	3,14
M6	50,0256	5,80	5,9910	2,93	0,0050	0,432	2,35
M7	50,0230	7,05	6,0495	2,90	0,0056	0,536	2,79
M8	50,0311	7,00	5,0550	3,03	0,0053	0,460	1,98

Từ kết quả bảng 8: Kết quả định lượng cho thấy hàm lượng saponin toàn phần trong các mẫu đinh lăng được thu hái tại Thái nguyên có sự khác biệt dao động trong khoảng từ 1,98 đến 4,385% do vùng trồng và độ tuổi.

4. Bàn luận

Về phương pháp chiết xuất và tinh chế

Qua tham khảo các tài liệu và thực nghiệm, chúng tôi chọn quy trình chiết xuất và tinh chế đơn giản, dễ thực hiện, sử dụng dung môi rẻ tiền, ít độc hại, không đòi hỏi trang thiết bị đặc biệt, loại được nhiều tạp chất mà không làm hao hụt saponin.

4.1. Về khảo sát điều kiện đo quang

Do các saponin ít có các nối đôi, nhất là nối đôi liên hợp nên chỉ hấp thụ tử ngoại ở vùng sóng ngắn 195-210 nm. Vì vậy, để định lượng được saponin bằng phương pháp đo quang, chúng tôi tiến hành phản ứng Rosenthaler của saponin với thuốc thử acid perchloric và vanillin trong acid acetic băng cho sản phẩm màu tím hoa cà [6]. Các nghiên cứu về thành phần hóa học của Đinh lăng đã chỉ ra rằng phần thân rễ và lá đinh lăng có chứa nhiều saponin khung oleanan (hầu hết đều là saponin dẫn chất acid oleanolic) [2], [4], [8], [9]... với hàm lượng tương đối cao nên chúng tôi lựa chọn acid oleanolic làm chất chuẩn trong định lượng saponin toàn phần bằng phương pháp đo quang. Chúng tôi đã tiến hành khảo sát cực đại hấp thụ và các điều

kiện đo quang; quy trình đề xuất đơn giản, dụng cụ hóa chất rẻ tiền, dễ kiếm, ít độc hại và có thể áp dụng cho các mẫu có hàm lượng saponin thấp đồng thời dễ áp dụng trong các phòng thí nghiệm. Tuy nhiên, quá trình tiến hành cần đảm bảo chính xác về thời gian và nhiệt độ để tránh mắc sai số. Tuy nhiên quá trình tiến hành ở các nhiệt độ thay đổi (thủy phân ở 70°C, sau đó làm lạnh trong nước đá để dừng phản ứng và tránh bay hơi dung môi do đó thao tác cần nhanh nhẹn và đảm bảo về nhiệt độ, chính vì vậy nên kết quả đo quang khó ổn định.

4.2. Về thẩm định phương pháp định lượng

Sau khi xây dựng một quy trình phân tích, để áp dụng quy trình vào phân tích trong thực tế một cách chính xác, cho kết quả tin cậy, cần thẩm định lại phương pháp theo quy định chung về phân tích định lượng. Khoảng tuyến tính được xây dựng với phương trình hồi quy có hệ số tương quan > 0,99 chứng tỏ có sự tương quan tuyến tính giữa khối lượng chất chuẩn và mật độ quang trong khoảng nồng độ khảo sát; độ đúng và độ lặp lại của phương pháp đều cho kết quả phù hợp với yêu cầu phân tích.

4.3. Về ứng dụng phương pháp xây dựng được trong phân tích mẫu thực

Từ kết quả định lượng 8 mẫu rễ đinh lăng, chúng tôi nhận thấy có sự khác biệt về hàm lượng saponin toàn phần giữa các mẫu đinh

lăng được trồng ở các địa điểm khác nhau. Do mới chỉ định lượng được một số ít mẫu thu hái trên địa bàn tỉnh Thái Nguyên vì vậy chưa thể đưa ra kết luận chính xác mà cần phải tiến hành trên số lượng mẫu lớn hơn về vùng trồng và độ tuổi để xác định được hàm lượng saponin trong đỉnh lăng khi được định lượng bằng phương pháp đo quang.

5. Kết luận

Từ kết quả thực nghiệm thu được, chúng tôi có kết luận sau:

- Phương pháp chiết xuất và tinh chế khá đơn giản với điều kiện không quá phức tạp nên dễ thực hiện trong điều kiện phòng thí nghiệm, không đòi hỏi trang thiết bị đặc biệt, dễ dàng triển khai áp dụng và tiết kiệm chi phí, thời gian.

- Đã xây dựng và thẩm định được phương pháp định lượng saponin toàn phần trong rễ đỉnh lăng. Kết quả thẩm định cho thấy các chỉ tiêu đạt yêu cầu.

- Đã áp dụng phương pháp để xác định hàm lượng saponin toàn phần trong 8 mẫu dược liệu rễ Đỉnh lăng thu hái được.

6. Kiến nghị

Ứng dụng phương pháp này để định lượng trên nhiều mẫu đỉnh lăng hơn nữa để có thể đưa ra một khoảng hàm lượng quy định nhằm góp phần tiêu chuẩn hóa nguyên liệu

- Tiếp tục phát triển phương pháp này để định tính, định lượng đỉnh lăng trong một số chế phẩm dạng cao và dạng viên...

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1]. Nguyễn Thị Ánh Tuyết, Nguyễn Tấn Thiện, Nguyễn Kim Phi Phụng “ Góp phần tìm hiểu hóa học của Đỉnh lăng”, *Tạp chí hóa học* tập 43, trang 624-627, 2005.
- [2]. Võ Duy Huân, Satoshi Yamamura, Kazuhiro Ohtani, Ryoji Kasai, Kazuo Yamasaki, Nguyễn Thới Nhâm và Hoàng Minh Châu, Olean Saponin from polycias fruticose, *Phytochemistry*, Vol. 47, pp. 451-457, 1998.
- [3]. Bộ y tế, *Dược điển Việt Nam V*, Nhà xuất bản Y học, Hà Nội, 2018.
- [4]. Ngô Văn Thu, *Hóa học saponin*, khoa Dược-Trường Đại học Y Dược Thành phố Hồ Chí Minh, trang 109-114, 1990.
- [5]. Huahong Wang, Zhezhi Wang, Wubao Guo, “Comparative determination of ursolic acid and oleanolic acid of *Macrocarpium officinalis* (Sieb. Et Zucc.) Nakai by RP – HPLC”, *Industrial crops and product*, 28, pp.328-332, 2008.
- [6]. Han Benyong, Chen Ying, Ren Ying, Chen Chaoyin “Content determination of total saponins from *Opuntia*”, *An Indian Journal of Bio technology*, 10(18), pp. 10400-10404, 2004.
- [7]. Chen Q. Zhang, Zhang W, Chen Z, “Identification and quantification of oleanolic acid and ursolic acid in Chinese herbs by liquid chromatography-ion trap mass spectrometry”, *Journal of Biomediacal chromatography*, 25 (12), pp. 1381 – 1388, 2011.
- [8]. Ngô Ứng Long, *Cây đỉnh lăng*, Nxb Bộ nông nghiệp, 1986.
- [9]. Nguyễn Thị Nguyệt, Võ Xuân Minh, Một số kết quả nghiên cứu về saponin trong đỉnh lăng”, *Tạp chí Dược học*, số 3, tr. 15-16, 1992.