

# Xây dựng phương pháp định tính, định lượng hoạt chất *ent-7 $\beta$ -hydroxy-15-oxokaur-16-en-18-yl acetate* trong dược liệu khô sâm cho lá (*Croton tonkinensis* Gagnep.)

Nguyễn Văn Thoan<sup>1</sup>, Bùi Mạnh Hùng<sup>2</sup>,  
Nguyễn Thị Hà Ly<sup>3</sup>, Phương Thiện Thương<sup>3,\*</sup>

<sup>1</sup>Viện nghiên cứu phát triển Y dược Phương Đông, 19 Nguyễn Ngọc Nai, Thanh Xuân, Hà Nội, Việt Nam

<sup>2</sup>Trường THPT chuyên Hà Nội - Amsterdam, Số 1, Hoàng Minh Giám, Cầu Giấy, Hà Nội, Việt Nam

<sup>3</sup>Khoa Hóa phân tích - Tiêu chuẩn, Viện Dược liệu, 3B, Quang Trung, Hoàn Kiếm, Hà Nội, Việt Nam

Nhận ngày 3 tháng 4 năm 2017

Chỉnh sửa ngày 27 tháng 4 năm 2017; Chấp nhận đăng ngày 14 tháng 6 năm 2017

**Tóm tắt:** Hợp chất *ent-7 $\beta$ -hydroxy-15-oxo kaur-16-en-18-yl acetat (CT1)* là thành phần chính của dược liệu chỉ được tìm thấy duy nhất trong loài *Croton tonkinensis* Gagnep. và có nhiều tác dụng dược lý quan trọng nên có thể coi là hoạt chất đặc trưng cho loài này. Tuy nhiên, Dược điển Việt Nam IV (2009) có quy định việc định tính dược liệu khô sâm cho lá theo dược liệu đối chiếu mà chưa sử dụng chất **CT1** làm chất đánh dấu. Kết quả của nghiên cứu này cho biết có thể sử dụng sắc ký lớp mỏng và sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) để định tính chất **CT1** trong dược liệu khô sâm cho lá. Nghiên cứu cũng đã xây dựng được quy trình định lượng hợp chất **CT1** trong dược liệu khô sâm cho lá bằng kỹ thuật RP-HPLC và đã thẩm định các thông số cần thiết theo hướng dẫn chung của EMA. Kết quả định lượng chất **CT1** trong một số mẫu khô sâm thu hái tại miền Bắc cho thấy hàm lượng chất này trong lá là 0,507-1,274%, trong cành non là 0,318-0,461% và trong cành già là 0,135-0,176%, gợi ý rằng nên thu hái lá để thu được mẫu có hàm lượng **CT1** cao, dược liệu có thể có tác dụng tốt nhất. Các kết quả thu được gợi ý có thể sử dụng chất đối chiếu **CT1** cho việc nâng cấp tiêu chuẩn hóa và kiểm nghiệm dược liệu khô sâm cho lá trong chuyên luận Dược điển Việt Nam.

**Từ khóa:** *Crotonis tonkinensis*, *ent-7 $\beta$ -hydroxy-15-oxo kaur-16-en-18-yl acetat (CT1)*, reference compound, qualitative and quantitative analysis.

## 1. Đặt vấn đề

Trong y học dân gian Việt Nam, cây thuốc khô sâm cho lá (*Croton tonkinensis* Gagnep., Euphorbiaceae) được nhân dân nhiều nơi sử dụng làm thuốc chống viêm loét dạ dày, mẩn ngứa, ghè lở, vẩy nến [1-3]. Qua nhiều nghiên cứu của các tác giả trước đây và các nghiên cứu gần đây của chúng tôi cho biết, thành phần hóa

học chính của khô sâm cho lá là các diterpenoid thuộc nhóm *ent-kaurane*, trong đó hoạt chất chính là *ent-7 $\beta$ -hydroxy-15-oxokaur-16-en-18-yl acetate* (ký hiệu là **CT1**), cũng cho tác dụng chống ung thư [4-6] và chống viêm rất mạnh trên mô hình thử in vitro (tế bào) [4-7], và mô hình in vivo [8]. Ngoài ra, các *ent-kauran* diterpenoid cũng có nhiều tác dụng dược lý quan trọng khác [4, 9, 10]. Các kết quả này gợi ý rằng chất **CT1** là hoạt chất chính mang lại tác dụng chống viêm, giảm đau của dược liệu tiềm năng này nên có thể sử dụng làm chất đánh dấu trong các tiêu chí định tính, định lượng.

\* Tác giả liên hệ. ĐT: 84-972872418.

Email: pththuong@hpmu.edu.vn

<https://doi.org/10.25073/2588-1132/vnumps.4067>

Tìm kiếm trên các tài liệu khoa học đã công bố cho thấy có ít nghiên cứu về định tính, định lượng hoạt chất chính này trong dược liệu khổ sâm cho lá. Do đó, Dược điển Việt Nam IV vẫn chưa có tiêu chí định tính, định lượng sử dụng hợp chất đánh dấu trong việc kiểm nghiệm dược liệu này [11]. Với những lý do trên, chúng tôi thực hiện đề tài “Xây dựng phương pháp định tính, định lượng hợp chất *ent-7 $\beta$ -hydroxy-15-oxokaur-16-en-18-yl acetate (CT1)* trong dược liệu khổ sâm cho lá (*Croton tonkinensis* Gagnep.)” với mục tiêu đóng góp cơ sở khoa học cho việc nâng cấp các tiêu chí định tính, định lượng cho chuyên luận Khổ sâm cho lá trong Dược điển Việt Nam.

## 2. Nguyên vật liệu, thiết bị nghiên cứu

### 2.1. Nguyên liệu

Chất *ent-7 $\beta$ -hydroxy-15-oxokaur-16-en-18-yl acetate (CT1)*, Hình 1) được phân lập từ dược liệu khổ sâm cho lá từ một nghiên cứu trước đây [12]. Chất CT1 có độ tinh khiết 96% (tính theo phần trăm diện tích pic trên máy HPLC-DAD) và cũng được thể hiện trên các phổ  $^1\text{H}$ - và  $^{13}\text{C}$ -NMR. Dược liệu dùng cho định tính, định lượng chất CT1 là các mẫu lá, cành của cây khổ sâm cho lá được thu hái ở các địa phương khác nhau vùng Bắc bộ (Bảng 6). Các mẫu sau khi thu hái được phơi, sấy khô ở  $50^\circ\text{C}$  và lưu tại Khoa Hóa phân tích - Tiêu chuẩn, Viện Dược liệu.

### 2.2. Hóa chất và dung môi

Các dung môi methanol (MeOH), ethanol (EtOH), *n*-hexan (Hx), ethyl acetat (EtOAc), toluen, benzen được mua của các công ty và đạt tiêu chuẩn phân tích. Các dung môi dùng cho HPLC, HPTLC được mua của hãng Merck. Bản sắc ký lớp mỏng trắng sẵn silica gel 60 F<sub>254</sub> của hãng Merck.

### 2.3. Thiết bị dùng trong nghiên cứu

Thiết bị chính được dùng cho nghiên cứu gồm cân kỹ thuật Precisa XT 620M; cân phân tích Precisa XT 220A; máy cất quay Buchi B481; Máy HPTLC chấm mẫu bán tự động CAMAG LINOMAT5 và hệ thống CAMAG REPROSTAR3 kết nối với máy vi tính; Máy sắc ký lỏng hiệu năng cao HPLC (Shimadzu, 2010).

### 2.4. Phương pháp nghiên cứu

#### 2.4.1. Định tính bằng sắc kí lớp mỏng (TLC)

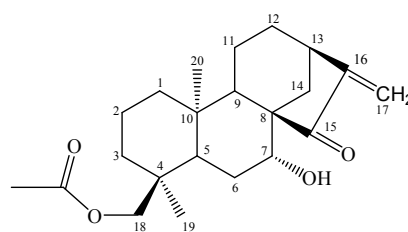
Tiến hành chạy sắc ký TLC để định tính chất CT1 trong dịch chiết từ dược liệu bằng nhiều hệ dung môi triển khai rồi lựa chọn hệ có sắc ký đồ tốt nhất. Quan sát bản mỏng ở các bước sóng UV 254nm và 366nm; sau đó phun thuốc thử dung dịch H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 10% (TT) trong EtOH, sấy ở  $120^\circ\text{C}$  đến khi hiện vết. Quan sát các vết xuất hiện ở ánh sáng thường và bước sóng UV 366 nm, so sánh giá trị hệ số di chuyển R<sub>f</sub> so với chất đối chiếu CT1 [2].



A



B



C

Hình 1. Dược liệu khổ sâm cho lá và hoạt chất chính CT1.  
(A: cây khổ sâm cho lá; B: dược liệu khổ sâm cho lá; C: chất CT1)

2.4.2. Xây dựng phương pháp phân tích định tính và định lượng chất **CT1** bằng sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC)

Sử dụng phương pháp chiết bằng Soxhlet để chiết xuất hợp chất từ dược liệu bằng dung môi MeOH. Khảo sát lựa chọn chương trình sắc ký HPLC thích hợp để định tính, định lượng hợp chất **CT1** trong dược liệu để tìm các điều kiện phù hợp gồm qui trình chuẩn bị mẫu từ dược liệu và qui trình phân tích **CT1** bằng HPLC pha tĩnh (cột), thành phần pha động, bước sóng phát hiện, tốc độ dòng pha động, thể tích tiêm mẫu, nồng độ dung dịch thử, dung môi pha mẫu. Qui trình định lượng được thẩm định theo hướng dẫn chung của EMA bao gồm các tiêu chí: độ đặc hiệu, tính thích hợp của hệ thống, độ tuyến tính và khoảng nồng độ tuyến tính, độ đúng, độ chính xác, giới hạn phát hiện (LOD) và giới hạn định lượng (LOQ). Áp dụng qui trình được xây dựng để tiến hành định lượng hợp chất **CT1** trong các mẫu dược liệu Khổ sâm cho lá thu hái và thu mua trên thị trường.

2.4.3. Xử lý và đánh giá kết quả

Các số liệu thực nghiệm được xử lý bằng phương pháp thống kê thông qua các giá trị trung bình, độ lệch chuẩn (SD) và độ lệch chuẩn tương đối (RSD) [2].

### 3. Kết quả nghiên cứu

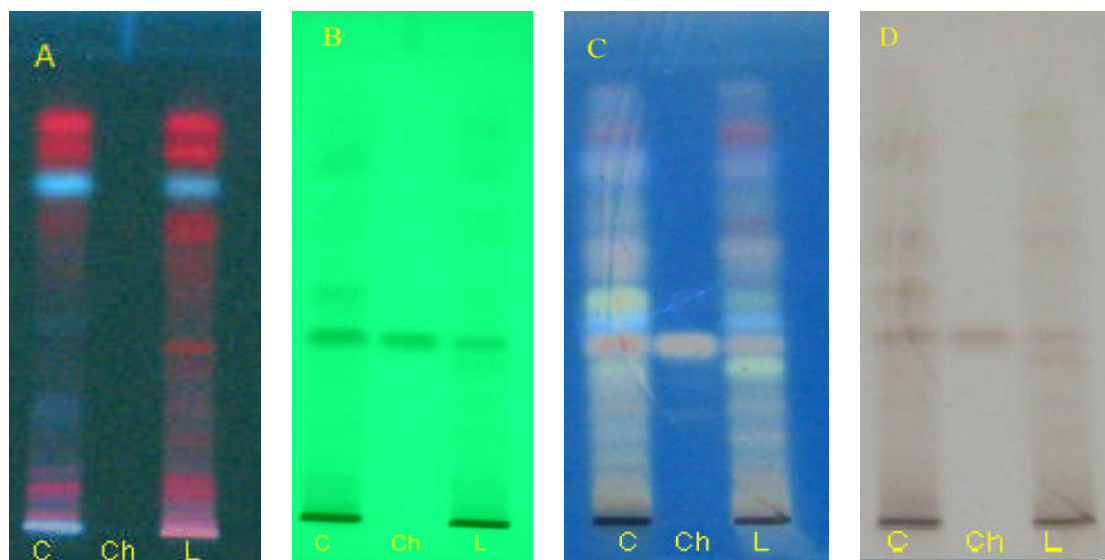
#### 3.1. Xây dựng phương pháp định tính chất **CT1** bằng sắc ký lớp mỏng (TLC)

Mẫu thử: Cân khoảng 0,1g bột lá dược liệu hoặc 0,5g bột cành dược liệu cho vào bình nón 50ml, thêm 20 ml MeOH, siêu âm 30 phút, lọc và cô dịch lọc còn 3ml dược dịch chấm sắc ký.

Mẫu đối chiếu: cân khoảng 0,5 mg chất **CT1** và hòa tan trong 1ml MeOH.

Tiến hành sắc ký: khảo sát với 04 hệ dung môi (tỉ lệ thể tích/ thể tích):

**Hệ A:** Hex-EtOAc (2:1); **Hệ B:** Toluene-EtOAc (7:3); **Hệ C:** EtOAc-EtOH-H<sub>2</sub>O (8:2:1); và **Hệ D:** Benzen-EtOAc (95:5, theo ĐVNN IV).



Hình 2. Sắc ký đồ TLC của dược liệu khổ sâm cho lá và chất **CT1**.

Chú thích (Hình 2): C: Dịch chiết từ cành; Ch: Chất **CT1**; L: dịch chiết lá. Hình A và C: Quan sát dưới ánh sáng UV 366nm trước (A) và sau (C) khi phun thuốc thử H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 10% trong EtOH; Hình B: Quan sát dưới ánh sáng UV-254nm trước khi phun thuốc thử; Hình D: Quan sát dưới ánh sáng thường sau khi phun thuốc thử H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 10% trong EtOH và sấy ở 120 °C.

Kết quả Quan sát cho thấy hệ dung môi A cho kết quả sắc ký đồ tách tốt nhất (chất **CT1** có  $R_f \sim 0,4$ ) nên được lựa chọn làm hệ dung môi khai triển. Sắc ký đồ TLC được biểu hiện trong Hình 2 cho thấy hệ dung môi này có thể sử dụng để định tính khô sâm cho lá có chất đối chiếu **CT1**.

### 3.2. Xây dựng phương pháp phân tích định tính, định lượng chất **CT1** bằng sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC)

#### 3.2.1. Xây dựng phương pháp

\* Chuẩn bị mẫu chuẩn: Cân chính xác khoảng 5,5mg chất **CT1** đối chiếu, hoà tan với 5ml MeOH trong bình định mức 5,0ml (1,1 mg/ml). Sau đó pha loãng mẫu thành các nồng độ 5,5; 11,0; 55,0; 110,0; 150,0; 220,0 và 550,0  $\mu\text{g/ml}$ , lọc qua màng lọc kích cỡ 0,45 $\mu\text{m}$  được đây các dung dịch chuẩn.

\* Chuẩn bị mẫu thử: Cân chính xác khoảng 0,5g bột lá hoặc 2,0g bột cành Khổ sâm cho lá cho vào bình Soxhlet. Thêm 200ml MeOH và tiến hành chiết tới khi dịch chiết không còn màu. Lọc lấy dịch rồi thu hồi toàn bộ dịch chiết thu được cần. Hòa tan lại cần bằng 20 ml MeOH và cho vào bình định mức 25ml, rồi thêm MeOH đến vạch. Lọc qua màng lọc kích

cỡ 0,45 $\mu\text{m}$  (bỏ 5ml dịch lọc đầu) được dung dịch tiêm sắc ký.

\* Khảo sát điều kiện chạy sắc ký: sau khi khảo sát các điều kiện và cuối cùng chúng tôi đã lựa chọn được điều kiện sắc ký như sau:

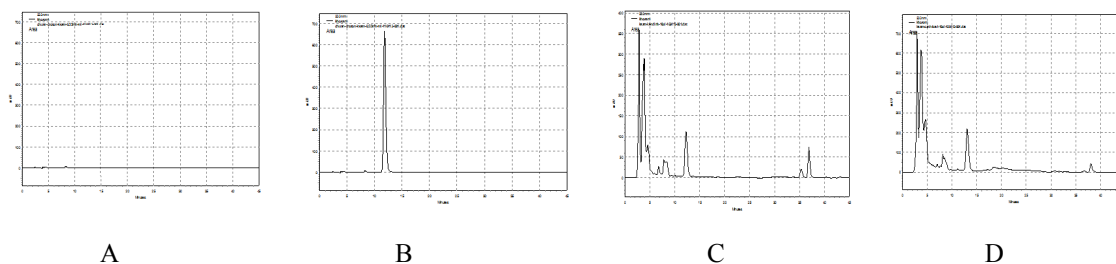
- Cột: Bondapak<sup>TM</sup> C18 (3,9mm  $\times$  300mm; 5 $\mu\text{m}$ )
- Pha động: Acetonitril - Nước cất (65:35)
- Tốc độ dòng: 0,4ml/phút
- Thể tích tiêm: 10 $\mu\text{l}$
- Detector: UV, bước sóng 233nm.

Sắc ký đồ HPLC thu được cho các pic của chất **CT1** tách rõ ràng, sắc ký đồ (Hình 3) của mẫu thử lá và cành Khổ sâm cho lá đều có pic có thời gian lưu trùng với thời gian lưu ( $t_R \sim 12,8$  phút) của chất **CT1**, nhiều nền thấp ở cả mẫu chuẩn và mẫu thử. Như vậy có thể dùng các điều kiện sắc ký đã lựa chọn để phân tích định tính, định lượng chất **CT1** trong dược liệu.

#### 3.2.2. Thẩm định phương pháp

##### 3.2.2.1. Độ đặc hiệu

Tiến hành phân tích mẫu blank (methanol), mẫu chất **CT1**, mẫu lá và mẫu cành khổ sâm cho lá theo điều kiện sắc ký đã lựa chọn. Các sắc ký đồ thu được như hình 3 (A, B, C, D).



Hình 3. Sắc ký đồ HPLC của mẫu blank (A), chất **CT1** (B), các dịch chiết MeOH của lá (C) và cành (D) Khổ sâm cho lá.

Kết quả thu được cho thấy tín hiệu pic của **CT1** xuất hiện tại thời gian lưu ( $t_R \sim 12,8$  phút). Trên sắc ký đồ mẫu blank, không thấy xuất hiện tín hiệu pic tại thời gian lưu này và trên sắc ký đồ các mẫu thử lá và cành cây khổ sâm cho lá có tín hiệu pic này, tín hiệu này tách khỏi các tín hiệu khác xuất hiện trên sắc ký đồ. Điều này chứng tỏ, phương pháp có tính đặc hiệu-chọn

lọc phù hợp cho phân tích **CT1** trong dược liệu khổ sâm cho lá.

##### 3.2.2.2. Khảo sát tính thích hợp của hệ thống

Để đánh giá tính thích hợp của hệ thống sắc ký, tiến hành pha 01 mẫu đối chiếu có nồng độ 150  $\mu\text{g/ml}$  như mô tả ở trên. Tiến hành sắc ký lặp lại 6 lần với điều kiện đã lựa chọn cho kết quả như bảng 1.

Bảng 1. Kết quả khảo sát tính thích hợp của hệ thống

	Lần 1	Lần 2	Lần 3	Lần 4	Lần 5	Lần 6	TB	RSD
$t_R$ (phút)	12,940	12,847	12,788	12,868	12,711	12,762	12,82	0,64%
$S_{pic}$ (AU.s)	4486896	4547020	4550541	4518464	4547086	4505756	4525961	0,58%

Độ lệch chuẩn tương đối của thời gian và diện tích pic lần lượt là 0,64 và 0,58 (đều <2%). Kết quả cho thấy các điều kiện sắc ký đã lựa chọn và hệ thống HPLC sử dụng là phù hợp và đảm bảo sự ổn định của phép phân tích định lượng chất CT1.

3.2.2.3. Độ tuyến tính và khoảng tuyến tính của phương pháp định lượng

Chuẩn bị một dãy gồm 06 dung dịch mẫu đối chiếu CT1 như trên rồi tiến hành chạy sắc ký. Kết quả khảo sát (bảng 2), đường chuẩn và phương trình hồi quy (hình 4) cho thấy với khoảng nồng độ từ 5,5 đến 550  $\mu\text{g/ml}$  có sự tương quan tuyến tính giữa nồng độ của chất CT1 (x) và diện tích pic (y) với phương trình hồi quy:  $y = 33328 \cdot x + 27794$  (hệ số tương quan  $R^2 = 0,999$ ).

3.2.2.4. Độ đúng

Độ đúng của phương pháp được xác định bằng phương pháp thêm chuẩn [11], tức là thêm vào mẫu L1 đã được xác định hàm lượng một lượng chính xác chất CT1 sao cho tổng nồng độ của chúng vẫn nằm trong khoảng tuyến tính đã khảo sát. Cụ thể, pha dung dịch mẫu chất CT1 có nồng độ 11  $\mu\text{g/ml}$  và mẫu thử được pha dung dịch thử như trên. Hút chính xác 1ml dịch thử và 1ml dung dịch chất CT1, lắc cho đồng đều rồi tiến hành định lượng.

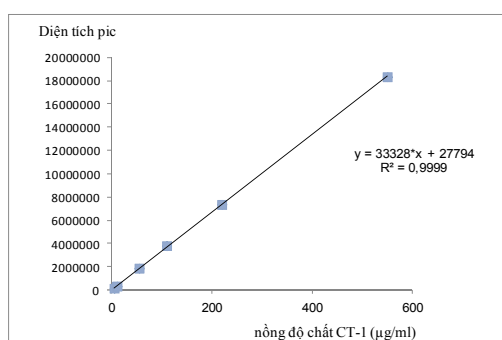
Hiệu suất thu hồi được tính theo công thức sau:

$$H(\%) = 100\% \times (2 \times C_{\text{thực}} - C_{\text{nền}}) / C_{\text{chuẩn}} \text{ được thêm vào}$$

Độ đúng của phương pháp được xác định từ tỉ lệ (%) thu hồi của chất đối chiếu thu được từ kết quả định lượng so với lượng chất chuẩn thêm vào. Kết quả thu được ghi ở bảng 3 cho thấy qui trình định lượng chất CT1 có khả năng thu hồi lại cao (> 96%, RSD < 2%), tức là phương pháp này có độ đúng cao.

Bảng 2. Kết quả khảo sát khoảng tuyến tính

Nồng độ ( $\mu\text{g/ml}$ )	5,5	11	55	110	220	550
Diện tích pic (AU.s)	153184	338339	1878735	3813983	7359854	18333800



Hình 4. Đường chuẩn và phương trình hồi quy của chất CT1.

Bảng 3. Kết quả khảo sát độ đúng của phương pháp

Số lần định lượng	Lượng CT1 thêm vào ( $\mu\text{g}$ )	Lượng CT1 trung bình tìm lại được ( $\mu\text{g}$ )	% tìm lại được trung bình	Số liệu thống kê
6	11	10,6	96,36	RSD = 1,82%

## 3.2.2.5 Độ chính xác

*Độ lặp lại của phương pháp*

Độ lặp lại của phương pháp được xác định bằng cách tiến hành 06 thí nghiệm riêng biệt để định lượng 01 mẫu lá khô sâm cho lá thu hái ở

Ba Vi (mẫu L1). Kết quả thu được ở bảng 4 cho thấy hàm lượng trung bình tìm thấy chất **CT1** là 0,8296%, RSD=0,92%. Như vậy, có thể áp dụng chương trình đã lựa chọn để định lượng chất **CT1** trong mẫu dược liệu.

Bảng 4. Kết quả khảo sát độ lặp lại của phương pháp bằng mẫu L1

	Lần 1	Lần 2	Lần 3	Lần 4	Lần 5	Lần 6	Số liệu thống kê
m <sub>dược liệu</sub> (g)	0,5038	0,5098	0,4900	0,5011	0,5064	0,5015	-
Hàm lượng chất <b>CT1</b> (%)	0,8356	0,8180	0,8294	0,8315	0,8389	0,8242	-
Hàm lượng trung bình chất <b>CT1</b> (%)	0,8296						RSD = 0,92 %

*Độ chính xác trung gian (độ chính xác ngày)*

Độ chính xác trung gian được đánh giá dựa trên độ lệch chuẩn tương đối của 12 thí nghiệm trên cùng một mẫu phân tích trong 2 ngày khác nhau - mỗi ngày phân tích lặp lại 6 lần theo phương pháp đã xác định. Kết quả thu được cho thấy các giá trị RSD thu được đều nhỏ hơn 2%, chứng tỏ phương pháp phân tích đạt yêu cầu về độ chính xác khác ngày.

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

Để xác định LOD và LOQ, ta phân tích mẫu chuẩn ở nồng độ còn có thể xuất hiện tín hiệu của chất phân tích và xác định tỷ lệ tín

hiệu chia cho nhiều đường nền (S/N; S là chiều cao tín hiệu của chất phân tích, N là nhiều đường nền).

Phân tích mẫu **CT1** ở nồng độ 22 µg/ml, sau đó pha loãng dần đến khi dung dịch chuẩn không còn xuất hiện tín hiệu của chất phân tích (Bảng 5). Nồng độ dung dịch chuẩn là 0,022 µg/ml, thì tỷ số giữa chiều cao tín hiệu và nhiều đường nền:  $S/N=2H/h=2 \times 0,6/0,4=3$ , đạt trong khoảng từ 2-3. Như vậy, nồng độ 0,022 µg/ml được coi là giới hạn phát hiện (LOD) của phương pháp. Giới hạn định lượng  $LOQ = 3,3 \times LOD = 0,0726$  (µg/ml).

Bảng 5. Kết quả xác định nồng độ giới hạn LOD

Nồng độ chất <b>CT1</b> (µg/ml)	22	2,2	1,1	0,055	0,022	0,0011
S <sub>pic</sub>	687790	93799	60770	14267	10010	Không có tín hiệu

3.3. Kết quả định lượng chất **CT1** trong các mẫu dược liệu

Với qui trình sắc ký đã lựa chọn, hàm lượng chất **CT1** trong mẫu dược liệu được tính toán theo công thức:

$$X \text{ (mg/g)} = \frac{C \times 25 \times 100}{M \times (100 - b)} \quad X' \text{ (%) } = X/10$$

Trong đó X và X' lần lượt là hàm lượng chất **CT1** trong dược liệu (X - đơn vị mg/g, X' -

đơn vị %); C là nồng độ **CT1** trong mẫu thử tính được từ đường chuẩn (mg/ml); M là khối lượng của mẫu dược liệu đem phân tích (g); b là độ ẩm của mẫu dược liệu đem phân tích (%).

Áp dụng quy trình đã xây dựng được để định lượng một số mẫu lá và cành Khổ sâm cho lá thu hái tại miền bắc Việt Nam thu được kết quả trong Bảng 6.

Bảng 6. Kết quả định lượng hoạt chất trong một số mẫu lá và cành Khổ sâm

TT	Mẫu (Địa điểm; ngày thu mẫu)	Ký hiệu	Khối lượng cân (g)	Độ ẩm (%)	$\overline{S}_{Pic}$ (AU.s)	Hàm lượng CT1	
						(mg/g)	(% kl/kl)
<b>Các mẫu lá (ký hiệu L)</b>							
1	Ba Vì, Hà Nội; 24/03/2013	L1	0,5079	10,86	4533845	7,47	0,747
2	Mỹ Đức, Hà Nội; 15/01/2013	L2	0,5056	12,47	3951124	6,65	0,665
3	Tp Bắc Giang, Bắc Giang; 28/03/2013	L3	0,5016	11,47	6333118	10,65	1,065
4	Vụ Bản, Nam Định; 23/03/2013	L4	0,5090	11,46	3778022	6,24	0,624
5	Thành phố Bắc Ninh, Bắc Ninh 20/04/2013	L5	0,5101	11,22	4948023	8,15	0,815
6	Tp Vĩnh Yên, Vĩnh Phúc; 20/02/2013	L6	0,5038	8,62	3136464	5,07	0,507
7	Chợ Đồng Xuân, Hà Nội; mua ngày 12/04/2013	L7	0,5039	12,85	3283216	5,56	0,556
8	Phố Lãn Ông, Hà Nội; mua ngày 02/04/2013	L8	0,5034	7,13	7965238	12,74	1,274
<b>Các mẫu cành (ký hiệu CN: cành non; CG: cành già)</b>							
9	Ba Vì, Hà Nội; 24/03/2013	CN1	2,0317	11,23	10065576	4,17	0,417
10	Mỹ Đức, Hà Nội; 15/01/2013	CN2	2,0128	12,78	10816935	4,61	0,461
11	Tp Bắc Giang, Bắc Giang; 28/03/2013	CN3	2,0268	11,55	<b>10989801</b>	4,59	0,459
12	Vụ Bản, Nam Định; 23/03/2013	CN4	2,0369	10,98	7726021	3,18	0,318
13	Tp Bắc Ninh, Bắc Ninh; 20/04/2013	CG5	2,0906	10,59	3857283	1,54	0,154
14	Tp Vĩnh Yên, Vĩnh Phúc; 20/02/2013	CG6	2,1856	9,17	4394492	1,65	0,165
15	Chợ Đồng Xuân, Hà Nội; mua ngày 12/04/2013	CG7	2,0253	6,70	<b>3420539</b>	1,35	0,135
16	Phố Lãn Ông, Hà Nội; mua ngày 02/04/2013	CG8	2,0311	6,69	<b>4464215</b>	1,76	0,176

#### 4. Bàn luận

Đến nay, hợp chất *ent-7 $\beta$ -hydroxy-15-oxo kaur-16-en-18-yl acetat (CT1)* mới chỉ được tìm thấy trong loài *C. tonkinensis*, chưa tìm

thấy ở bất kì loài thực vật và sinh vật nào khác, và chất này cũng là thành phần chính của dược liệu khổ sâm cho lá [4]. Do vậy, hợp chất CT1 có thể coi là chất đặc trưng cho loài *C.*

*tonkinensis*, nên có thể sử dụng để nhận biết và đánh giá chất lượng dược liệu này.

Dược điển Việt Nam IV (2010) có quy định việc định tính dược liệu khô sâm cho lá theo dược liệu chuẩn với hệ dung môi Benzen – EtOAc (tỷ lệ 95:5), các dấu hiệu để định tính theo định hướng đến thành phần alkaloid và flavonoid mà chưa giúp nhận biết sự có mặt của *ent*-kauran diterpenoid, là thành phần hóa học chính của các loài này [10]. Nghiên cứu này dùng chất đối chiếu **CT1** và hệ dung môi Hex – EtOAc (2:1) đã cho kết quả định tính rõ ràng bằng TLC. So với tiêu chuẩn ĐĐVN IV thì đã xác định rõ ràng hoạt chất chính (**CT1**) của dược liệu khô sâm cho lá, đồng thời sử dụng dung môi bớt độc hại hơn (thay benzen bằng *n*-hexan). Hơn nữa, nghiên cứu này cũng đã chứng minh rằng có thể sử dụng HPLC và chất đánh dấu **CT1** để định tính dược liệu Khô sâm cho lá, gợi ý việc bổ sung cho tiêu chuẩn ĐĐVN IV mới chỉ có định tính bằng phản ứng hóa học và TLC nhưng mới so sánh với dược liệu đối chiếu chứ chưa có chất đối chiếu [10].

Nghiên cứu này cũng đã xây dựng được qui trình định lượng hợp chất **CT1** trong dược liệu khô sâm cho lá và đã được thẩm định các thông số cần thiết. Kết quả định lượng chất **CT1** trong một số mẫu khô sâm thu hái tại miền Bắc cho thấy hàm lượng chất **CT1** trong lá là 0,507-1,274%, trong cành non là 0,318-0,461% và trong cành già là 0,135-0,176%. Kết quả cho thấy hàm lượng chất **CT1** trong mẫu lá cao hơn trong mẫu cành non là từ 1,5-2 lần và với cành già từ 3-7 lần. Trong ĐĐVN IV có quy định của dược liệu là lá và cành, không quy định cành con hay cành già [11]. Kết quả gợi ý nên thu hái lá để thu được hàm lượng chất **CT1** là cao nhất, dược liệu có thể có tác dụng tốt nhất.

## 5. Kết luận

Nghiên cứu này đã xây dựng được phương pháp định tính và định lượng dược hợp chất chính của khô sâm cho lá là **CT1** trong một số mẫu lá và cành khô sâm cho lá thu hái tại miền bắc Việt Nam. Các kết quả gợi ý có thể sử dụng

chất đối chiếu **CT1** cho việc nâng cấp tiêu chuẩn hóa và kiểm nghiệm dược liệu khô sâm cho lá trong chuyên luận Dược điển Việt Nam.

## Tài liệu tham khảo

- [1] Đỗ Huy Bích và cộng sự (2004), Cây thuốc và động vật làm thuốc ở Việt Nam, NXB Khoa học và Kỹ thuật, Hà Nội, tập II, tr. 87-89.
- [2] Võ Văn Chi (1997), Từ điển cây thuốc Việt Nam, NXB Trẻ, TP Hồ Chí Minh, tr. 622-623.
- [3] Đỗ Tất Lợi (2001), Các cây thuốc và vị thuốc Việt Nam, NXB Y học, tr. 826.
- [4] Phương Thiện Thương và cộng sự (2011), Tổng quan nghiên cứu về thành phần hóa học và tác dụng sinh học của cây khô sâm cho lá, Tạp chí Dược liệu 16 (1+2), 9-19.
- [5] Thuong P. T. et al. (2014), *ent*-Kaurane diterpenoids from *Croton tonkinensis* induce apoptosis in colorectal cancer cells through the phosphorylation of JNK mediated by reactive oxygen species and dual-specificity JNK kinase MKK4, *Anti-cancer Agents in Medicinal Chemistry* 14, 1051-1061.
- [6] Kuo P.C. et al. (2007), Crotonkinins A and B and related diterpenoids from *Croton tonkinensis* as anti-inflammatory and antitumor agents, *J. Nat. Prod.* 70, 1906-1909.
- [7] Kou P.C. et al. (2013), Anti-inflammatory diterpenoids from *Croton tonkinensis*, *J. Nat. Prod.* 76, 230-236.
- [8] Nguyễn Văn Thoan và cộng sự (2016), Tác dụng chống viêm cấp và mạn của hợp chất *ent*-7 $\beta$ -hydroxy-15-oxokaur-16-en-18-yl acetate từ khô sâm cho lá, *Tạp chí Khoa học ĐHQGHN, Khoa học Y Dược* 32 (2), 26-31.
- [9] Dao T.T. et al. (2010), Sirt1 inhibitory diterpenoids from the Vietnamese medicinal plant *Croton tonkinensis*, *Planta Med.* 76, 1011-1014.
- [10] Tuan D.T. et al. (2011), *ent*-Kaurane diterpenoids from *Croton tonkinensis* stimulate osteoblast differentiation, *J. Nat. Prod.* 74, 2526-2531.
- [11] Bộ Y tế (2009), Dược điển Việt Nam IV, NXB Y học, tr. 802-803.
- [12] Trần Thu Hiền và cộng sự (2016), Nghiên cứu chiết xuất, phân lập hợp chất diterpenoid chính từ cây khô sâm cho lá (*Croton tonkinensis* Gagnep.), *Tạp chí Dược học* 56 (483), 60-62.



## Development of a Method for Qualitative and Quantitative Analysis of the Compound *ent-7 $\beta$ -hydroxy-15-oxokaur-16-en-18-yl Acetate* in the Medicinal Material *Crotonis Tonkinensis*

Nguyen Van Thoan<sup>1</sup>, Bui Manh Hung<sup>2</sup>,  
Nguyen Thi Ha Ly<sup>3</sup>, Phuong Thien Thuong<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Research Institute of Oriental Medicine and Pharmacy, Quoc Gia Pharmaceutical Joint-Stock Company, 119 Nguyen Ngoc Nai, Thanh Xuan, Hanoi, Vietnam

<sup>2</sup>Hanoi-Amsterdam High School, 1 Hoang Minh Giam, Cau Giay, Hanoi, Vietnam

<sup>3</sup>National Institute of Medicinal Materials, 3B Quang Trung, Hoan Kiem, Hanoi, Vietnam

**Abstract:** The compound *ent-7 $\beta$ -hydroxy-15-oxo kaur-16-en-18-yl acetat (CT1)* is the major constituent and found uniquely in the medicinal plant *Croton tonkinensis* Gagnep. This compound was also found to have numerous pharmaceutical activities, therefore, it should be considered as a main bioactive constituent of this plant material. However, the Vietnamese Pharmacopoeia IV (2009) postulates the qualitative analysis of this herb by thin layer chromatography (TLC) using standard sample of herbal *Crotonis tonkinensis*. In this study, we indicate that the material of this herb could be qualitative analysed by TLC and HPLC by using **CT1** as a reference compound. The study also develops a method for quantitative analysis of the compound **CT1** in the medicinal materials *Crotonis tonkinensis* by HPLC (column C18; UV detector at 233 nm; solvent acetonitril-water 65:35). The contents of **CT1** in some *Crotonis tonkinensis* samples collected in northern Vietnam were determined to be 0,51–1,27 % in leaves, 0,32–0,46 % in green stems and 0,14–0,18 % in old stems, indicating that leaves contain highest amount of **CT1**. The results of this study suggest that the compound **CT1** should be used as a reference compound for qualitative and quantitative analysis of the material herb *Crotonis tonkinensis* in Vietnamese Pharmacopoeia.

**Keywords:** *Crotonis tonkinensis*, *ent-7 $\beta$ -hydroxy-15-oxo kaur-16-en-18-yl acetat (CT1)*, reference compound, qualitative and quantitative analysis.