

## NGHIÊN CỨU CHIẾT TÁCH VÀ ĐỊNH LƯỢNG STEROLS TỪ LÁ CỦA CÂY DIẾP CÁ (*HOULTUYNIA CORDATA* THUNB) Ở TỈNH THỪA THIÊN HUẾ BẰNG PHƯƠNG PHÁP SẮC KÝ LỎNG HIỆU NĂNG CAO

Phan Văn Cư, Nguyễn Thị Thu Hương

Trường Đại học Khoa học, Đại học Huế

**Tóm tắt.** Nghiên cứu chiết tách sterol tổng từ lá của cây Diệp cá (*Houttuynia cordata* Thunb) ở tỉnh Thừa Thiên Huế đã được thực hiện. Quá trình sử dụng phương pháp xà phòng hóa, tinh chế sản phẩm thu được sterol tổng, sau đó định lượng sterol tổng với thuốc thử Liebermann- Burchard (dùng cholesterol chuẩn USA) bằng phương pháp UV-VIS. Từ sterol tổng định lượng được stigmasterol, campesterol và  $\beta$ -sitosterol bằng phương pháp HPLC.

### 1. Mở đầu

Diếp cá có tên khoa học là *Houttuynia cordata* Thunb, thuộc họ lá Giấp (*Saururaceae*). Diệp cá là một loại cây thảo mộc rất phổ biến ở Việt Nam và một số nước châu Á khác. Ngoài việc dùng để làm rau ăn, diếp cá còn là một loài cây có khả năng chữa được nhiều bệnh như trĩ, phù thũng, thoát mủ, thông tiểu tiện, viêm, giải độc, thanh nhiệt... Sterols là một trong những thành phần hóa học của cây Diệp cá có hoạt tính sinh học và hàm lượng tương đối cao, có tác dụng về cải thiện lipid máu, giảm lượng cholesterol trong máu, xơ cứng động mạch..[4].

Ở Việt Nam, tác giả [2] đã nghiên cứu phân lập flavonoid trong cây Diệp cá. Gần đây chúng tôi mới tìm được tác giả Trần Thị Việt Hoa và cộng sự [3] đã phân lập được cấu tử  $\beta$ -sitosterol từ cây Diệp cá ở tỉnh Tiền Giang, ngoài ra ở Việt Nam chúng tôi chưa tìm thấy tác giả nào nghiên cứu đầy đủ về hợp chất sterol của loài cây này. Vì vậy trong bài báo này, chúng tôi giới thiệu kết quả nghiên cứu về chiết tách và định lượng sterol bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao từ dịch chiết thân lá của cây Diệp cá góp phần xác định sterol, là cơ sở khoa học và nâng cao giá trị sử dụng của cây Diệp cá ở Thừa Thiên Huế.

### 2. Nguyên liệu và phương pháp nghiên cứu

#### 2.1. Nguyên liệu

Nguyên liệu lá cây Diệp cá được thu mua ở xã Quảng Thành, huyện Quảng Điền, tỉnh Thừa Thiên Huế. Đây là vùng chuyên canh trồng rau màu phục vụ thành phố Huế. Nguyên liệu được thu mua vào tháng 02 và tháng 04/2010

## 2.2. Phương pháp nghiên cứu

### 2.2.1. Chiết tách sterol tổng, thô bằng phương pháp ngâm chiết

Nguyên liệu Diếp cá khô sau khi đã được xử lý cho vào bình dung tích 5 lít, cho tiếp còn 96<sup>0</sup>, khuấy cho nguyên liệu thấm đều dung môi, đậy kín bình. Tiến hành ngâm chiết 3 lần, mỗi lần 3 ngày, gộp các dịch chiết rồi cất đuổi dung môi thu được cao, tiếp tục chiết với dung môi ete petrol thu được cao ete petrol. Tiến hành xà phòng hóa cao ete petrol rồi chiết bằng dung môi n-hexan, đem tinh chế thu được tinh thể sterol tổng thô.

### 2.2.2. Định tính và định lượng trong sterol tổng bằng các phản ứng đặc trưng

(1). Định tính sterol và khảo sát dung môi trong sterol tổng bằng SKLM (sắc ký lớp mỏng)

+ Mẫu cao n-hexan (giàu sterol) được hòa tan trong CHCl<sub>3</sub>

Phản ứng Liebermann-Burchard: Cho vào cốc 1 ml anhydrid acetic, 1 ml CHCl<sub>3</sub> để lạnh ở 0<sup>0</sup>C, thêm vài giọt H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> đậm đặc rồi cho mẫu thử đã được hòa tan trong CHCl<sub>3</sub> vào, để yên trong vài phút thấy dung dịch chuyển từ màu xanh nhạt sang màu xanh lục là phản ứng dương tính.

Sau khi định tính bằng phản ứng đặc trưng với thuốc thử Liebermann-Burchard có sterol, chúng tôi tiến hành tinh chế cao n-hexan (giàu sterol) trong acetone lạnh thu được tinh thể sterol, lấy tinh thể tiến hành định tính và định lượng.

+ Khảo sát dung môi tiến hành sắc ký lớp mỏng

Hệ 1: n-hexan-etyl acetat = 90:10; hệ 2: n-hexan : etyl acetat = 8 : 2; hệ 3: n-hexan-cloroform: 90:10. Kết quả cho hệ dung môi n-hexan : etyl acetat = 8 : 2 (v/v) phù hợp để triển khai sắc ký lớp mỏng. Thuốc thử hiện màu soi UV ở λ = 254 nm và thuốc thử H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 10 %/ etanol; Silicagel 60-F<sub>254</sub> trắng sẵn bề dày 0,2 mm (Merck)

(2). Định lượng sterol tổng bằng phương pháp trắc quang (Wall- Kelley) [5]

Thực hiện phản ứng Liebermann-Burchard của mẫu sterol tổng và mẫu chuẩn cholesterol (Merck): Sterol / CHCl<sub>3</sub> + thuốc thử Liebermann-Burchard → phức màu xanh lục. Đo độ hấp thụ trên máy quang phổ hấp thụ UV-VIS Jasco V-530 (Nhật) ở bước sóng 620 nm, từ đó tính toán hàm lượng sterol tổng bằng phương pháp so sánh

$$\frac{A_T}{A_C} = \frac{C_T}{C_C} \Rightarrow C_T = C_C \times \frac{A_T}{A_C} \quad (1)$$

(3). Định tính và định lượng một số thành phần của sterol từ sterol tổng bằng phương pháp HPLC (SHIMAZU) [1, 6,7] được tiến hành ở Trung tâm kiểm nghiệm thuốc- Mỹ phẩm- Thực phẩm Thừa Thiên Huế.

+ Thể tích bơm tiêm: 20 μL cho mỗi mẫu thử và mẫu chuẩn

+ Cột sắc ký: cột C8 25 mm x 4,6 mm, 5 μm (USA)

+ Nhiệt độ tiến hành: 30 ± 1<sup>0</sup>C

+ Tốc độ dòng: 1,5 mL/ phút cho mỗi mẫu thử và mẫu chuẩn + Detector UV-196

nm + Hệ dung môi pha động: acetonitril: đệm phosphat 0,025M (95: 5 = v/v) pH=5,8.

• Nồng độ của mẫu thử được định lượng bằng phương pháp chuẩn ngoại theo công thức sau:

$$C_t = C_c \times S_t / S_c \quad (2)$$

Trong đó:  $C_t$ : nồng độ mẫu thử;  $C_c$ : nồng độ chất chuẩn;  $S_t$  ( $H_t$ ): diện tích (chiều cao) của peak mẫu thử;  $S_c$  ( $H_c$ ): diện tích (chiều cao) của peak mẫu chuẩn.

• Công thức tính số mg các chất campesterol, stigmasterol và β- sitosterol có trong 100 g bột thân lá Diếp cá khô: (3)

$$m \text{ ( mg/ 100g diếp cá khô )} = \frac{S_{th}}{S_{ch}} \cdot C_{ch} \cdot V \cdot \frac{100}{a} \quad (3)$$

Trong đó:  $S_{th}$ : diện tích peak mẫu thử;  $S_{ch}$ : diện tích peak mẫu chuẩn;  $C_{ch}$ : nồng độ mẫu chuẩn (mg/ mL);  $V$ : thể tích methanol dùng để hòa tan mẫu thử (mL);

$a$ : số gam Diếp cá khô đem chiết (g).

### 3. Kết quả và thảo luận

#### 3.1. Chiết tách sterol tổng, thô bằng phương pháp ngâm chiết

Khối lượng mẫu diếp cá khô: 302 g và độ ẩm thu được theo phương pháp khối lượng 12,08%. Kết quả thu được 12,0232g cao n-hexan giàu sterol (3,98%) rồi đem tinh chế.

#### 3.2. Định tính sterol tổng

Kết quả SKLM cho thấy có 3 vết rõ ràng nhất, vết có màu xanh lục có  $R_f$  =0,31cm trùng với mẫu stigmasterol chuẩn, một vết có màu vàng nâu, một vết có màu hồng.

#### 3.3. Định lượng sterol tổng bằng phương pháp Wall-Kelley

Tiến hành định lượng đo mẫu chuẩn và mẫu thử. Kết quả ở bảng sau:

**Bảng 1. Kết quả đo UV-Vis của mẫu cholesterol chuẩn và mẫu thử**

Độ hấp thụ	Mẫu cholesterol chuẩn	Mẫu thử
$\lambda_{max}$ (nm)	620	620
A <sub>1</sub>	0,4809	0,2630
A <sub>2</sub>	0,4815	0,2635
A <sub>3</sub>	0,4819	0,2639
A <sub>tb</sub>	0,4814	0,2635

$$\text{Từ: } \frac{A_t}{A_c} = \frac{C_t}{C_c} \rightarrow C_t = \frac{A_t}{A_c} \cdot C_c$$

Từ kết quả đo UV-Vis hàm lượng sterol tổng trong mẫu thử được trình bày ở bảng sau:

**Bảng 2.** Hàm lượng (%) sterol tổng của Diệp cá

Sterol tổng	Mẫu thử	Mẫu khô
Hàm lượng (%)	38,07	0,017

Vậy 100 g Diệp cá khô thì hàm lượng sterol tổng là 17,4 mg.

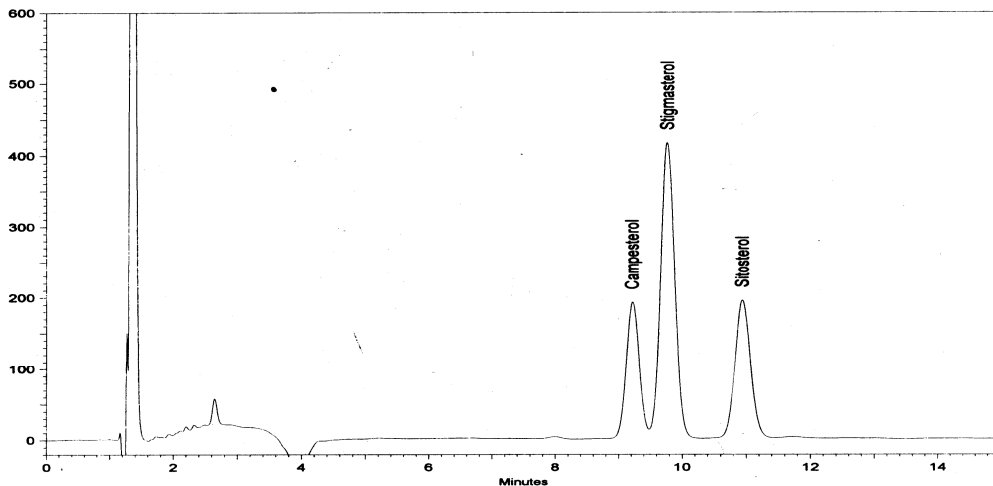
### 3.4. Định tính và định lượng một số thành phần sterol từ sterol tổng bằng phương pháp HPLC

#### 3.4.1. Định tính một số thành phần sterol trong mẫu thử

#### TRUNG TÂM KIỂM NGHIỆM THUỐC - MỸ PHẨM - THỰC PHẨM THỪA THIÊN HUẾ

Tên người chạy máy : DIEM HONG  
 Tên phương pháp: C:\CLASS-VP\Methods\Hong\Sterols.met  
 Tên Data: C:\CLASS-VP\HONG\Sterols\Huong\Chuan-Rep1  
 Thời gian chạy máy: 5/5/2010  
 Lượng bơm mẫu: 20 ul

#### KẾT QUẢ:



1: 196 nm, 8 nm

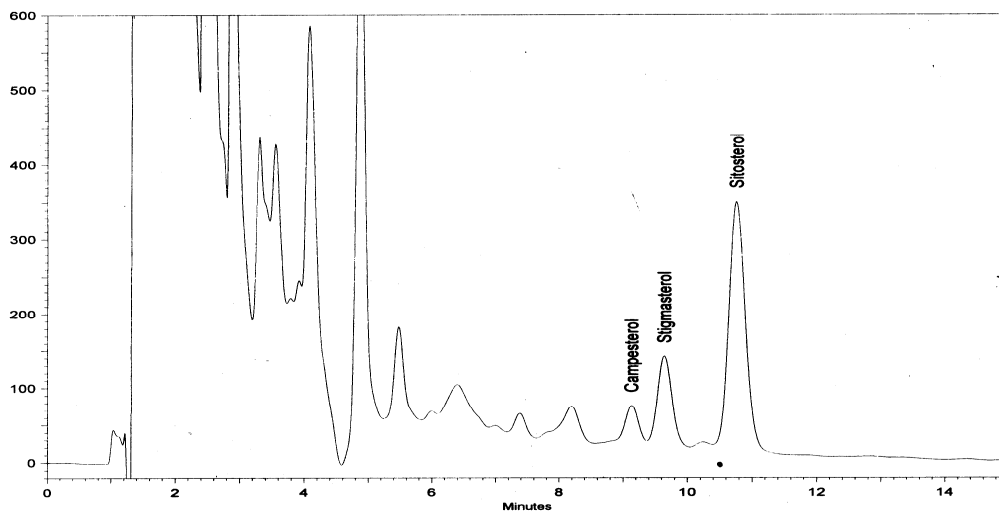
Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
Campesterol	9.216	2759377	9055.31
Stigmasterol	9.771	6427494	8950.62
Sitosterol	10.933	3330783	9320.87

**Hình 1.** Sắc đồ HPLC của hỗn hợp chuẩn

**TRUNG TÂM KIỂM NGHIỆM THUỐC - MỸ PHẨM - THỰC PHẨM THỪA THIÊN HUẾ**

Tên người chạy máy : DIEM HONG  
 Tên phương pháp: C:\CLASS-VP\Methods\Hong\Sterols.met  
 Tên Data: C:\CLASS-VP\HONG\Sterols\Huong\Thu-Rep1  
 Thời gian chạy máy: 5/5/2010  
 Lượng bơm mẫu: 20 ul

**KẾT QUẢ:**



1: 196 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
Campesterol	9.131	857666	8160.15
Stigmasterol	9.643	1978722	8147.68
Sitosterol	10.763	6042790	8307.12

**Hình 2. Sắc đồ HPLC của mẫu thử**

Tiêm 6 lần hỗn hợp campesterol + stigmasterol +  $\beta$ -sitosterol và mỗi lần đối với từng chất riêng lẻ với nồng độ như trên và 3 lần với mẫu thử. Kết quả chỉ ra ở bảng sau:

**Bảng 3. Thời gian lưu của mẫu chuẩn và mẫu thử**

STT	Hợp chất sterol phân tích	Thời gian lưu của mẫu chuẩn (phút)	Thời gian lưu của mẫu thử (phút)
1	Campesterol	9,216	9,134
2	Stigmasterol	9,771	9,643
3	$\beta$ -sitosterol	10,933	10,763

Thời gian lưu của ba peak trong mẫu thử tương đương trùng với thời gian lưu của ba peak trong hỗn hợp campesterol + stigmasterol +  $\beta$ -sitosterol chuẩn.

## 3.4.2. Định lượng một số thành phần sterol trong mẫu thử

## 3.4.2.1. Độ lặp lại của phương pháp HPLC

Tiêm lặp lại 6 lần vào hệ thống HPLC dung dịch chuẩn chứa campesterol, stigmasterol và sitosterol với nồng độ lần lượt là 200 ppm, 200 ppm, 250 ppm.

Bảng 4. Độ lặp lại của mẫu chuẩn trong phương pháp HPLC

Mẫu	Số lần tiêm	TR trung bình (phút)	RSD của thời gian lưu (%)	Diện tích peak(mAU.s) trung bình	RSD của diện tích peak (%)
Campesterol	6	9,332	0,90	2816811	1,17
Stigmasterol	6	9,890	0,92	6492936	1,03
$\beta$ -sitosterol	6	11,083	0,98	3396305	2,72

Kết quả cho thấy giá trị RSD của thời gian lưu, diện tích peak của campesterol, stigmasterol và  $\beta$ -sitosterol có giá trị RSD không quá 3%. Vậy hệ thống HPLC ổn định và phù hợp để tiến hành định lượng mẫu thử.

## 3.4.2.2. Hàm lượng của mẫu thử

Từ công thức (2) ta có:

+ Nồng độ của campesterol trong mẫu thử:

$$C_t = 200 \text{ (ppm)} \times 834244 / 2816811 = 59,2 \text{ (ppm)} = 0,0592 \text{ mg/ mL}$$

+ Nồng độ của stigmasterol trong mẫu thử:

$$C_t = 200 \text{ (ppm)} \times 1953692 / 6492936 = 60,2 \text{ (ppm)} = 0,0602 \text{ mg/ mL}$$

+ Nồng độ của  $\beta$ -sitosterol trong mẫu thử:

$$C_t = 250 \text{ (ppm)} \times 6027418 / 3396305 = 443,7 \text{ (ppm)} = 0,4437 \text{ mg/ mL}$$

Từ công thức (3) ta có:

Số mg campesterol có trong 100g bột thân lá Diệp cá khô

$$m_C = 0,0592 \cdot 1 \cdot 100 / 302 = 0,0196 \text{ mg/ 100 g}$$

Vậy trong 302 g thân lá Diệp cá khô có hàm lượng campesterol là: **0,0592 mg**.

Số mg stigmasterol có trong 100g bột thân lá Diệp cá khô

$$m_{St} = 0,0602 \cdot 1 \cdot 100 / 302 = 0,0199 \text{ mg/ 100 g}$$

Vậy trong 302 g thân lá Diệp cá khô có hàm lượng stigmasterol là: **0,0602 mg**

Số mg  $\beta$ -sitosterol có trong 100g bột thân lá Diệp cá khô

$$m_{Si} = 0,4437 \cdot 1 \cdot 100 / 302 = 0,1469 \text{ mg/ 100 g}$$

Vậy trong 302 g thân lá Diếp cá khô hàm lượng  $\beta$ -sitosterol là: **0,4437 mg**.

Tổng hàm lượng campesterol, stigmasterol và  $\beta$ -sitosterol trong 100 g bột thân lá Diếp cá khô là:  $0,0196 + 0,0199 + 0,1469 = 0,1864$  mg

#### 4. Kết luận

**4.1.** Chọn được hệ dung môi phù hợp để triển khai SKLM: n-hexan : etyl acetat = 8 : 2 (v/v). Kết quả đã định tính được trong mẫu thử có stigmasterol và các cấu tử khác chưa định tính được nhưng có vết màu vàng nâu, màu tím rõ ràng.

**4.2.** Xác định được hàm lượng sterol tinh khiết trong thân lá cây Diếp cá bằng phương pháp Wall-Kelley là 0,017 %

**4.3.** Định tính và định lượng được một số thành phần sterol trong 302 g thân lá cây Diếp cá khô bằng phương pháp HPLC là Campesterol: 0,0592 mg, Stigmasterol: 0,0602 mg,  $\beta$ -Sitosterol: 0,4437 mg.

### TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1]. Trần Từ An, *Kiểm nghiệm dược phẩm*, Nxb. Y học, Hà Nội, 2005.
- [2]. Phan Văn Cư, *Nghiên cứu chiết xuất tinh dầu bằng phương pháp vi sóng và phân lập flavonoid trong dịch chiết cây Diếp cá (Houttuynia cordata Thunb) ở Thừa Thiên Huế*, Báo cáo nghiệm thu cấp Bộ, Mã số: B2008-DHH-01-66, 2010.
- [3]. Trần Thị Việt Hoa, Lê Thị Kim Oanh, *Phân lập và xác định cấu trúc một số hợp chất từ cây Diếp cá (Houttuynia cordata Thunb) của Việt Nam*, Tạp chí Phát triển KH&CN, tập 11, số 07, (2008).
- [4]. Đỗ Tất Lợi, *Những cây thuốc và vị thuốc Việt Nam*, Nxb. Khoa học và Kỹ thuật Hà Nội, 2006.
- [5]. Wall, M. E. and Kelley, E. G., *Determination and nature of leaf sterols*, Anal. Chem. 19: (1990), 677-683.
- [6]. Ellen Odéen, *Investigation of phytosterols in Alocasia Odora Roxb by reversed phase HPLC*, Faculty of Technology and sciences Department of chemistry and biomedical science, Published by Karlstads Universitet, 2009.
- [7]. Shu-Chen Chou, Tian-Shung Wu, *The constituents of the Houttuynia cordata Thunb*, China, etd-0626106-191008. Pdf, 2007.

**STUDY OF EXTRACTION AND QUANTIFICATION OF STEROLS FROM  
THE LEAVES OF HOUTTUYNIA CORDATA THUNB IN THUA THIEN HUE  
PROVINCE BY HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY  
METHOD**

**Phan Van Cu, Nguyen Thi Thu Huong**

*College of Sciences, Hue University*

**Abstract.** A study of extraction of total sterol from the leaves of *Houttuynia cordata* Thunb in Thua Thien Hue Province was done. Saponification method was used to purify total sterol obtained, which was then quantified by UV-VIS method, using Liebermann-Burchard reagent (with USA-standard cholesterol). From total sterol, stigmasterol, campesterol and  $\beta$ -sitosterol were quantified by HPLC method.