

THẨM ĐỊNH PHƯƠNG PHÁP VÀ ĐỊNH LƯỢNG ALLANTOIN  
TRONG CỦ HOÀI SƠN (*Dioscorea hamiltonii* Hook.f.), HỌ CỬ NÂU  
(Dioscoreaceae) TRỒNG TẠI NHO QUAN, NINH BÌNH

Nguyễn Minh Tuấn<sup>1\*</sup>, Đỗ Văn Trường<sup>2</sup>, Nguyễn Văn Liệu<sup>3</sup>, Tạ Thu Hà<sup>3</sup>

1. Trường Đại học Đông Đô

2. Công ty TNHH Dược thảo Hoàng Thành

3. Học viện Quân y Hà Nội

\*Email: nguyentmtuan63@gmail.com

Ngày nhận bài: 13/6/2024

Ngày phản biện: 27/7/2024

Ngày duyệt đăng: 10/8/2024

TÓM TẮT

**Đặt vấn đề:** Hàm lượng chất allantoin trong củ Hoài sơn là một yêu cầu bắt buộc, nhưng Dược điển Việt Nam V chưa có phương pháp định lượng chất này. Cần phải nghiên cứu xây dựng phương pháp định lượng allantoin trong củ Hoài sơn thu hái tự nhiên và trồng trọt. **Mục tiêu nghiên cứu:** Thẩm định phương pháp và định lượng allantoin trong củ cây Hoài sơn trồng tại Nho Quan, Ninh Bình. **Đối tượng và phương pháp nghiên cứu:** Củ Hoài sơn thu hoạch sau 12 tháng tại Nho Quan (Ninh Bình); Định tính, định lượng hàm lượng allantoin bằng HPLC. **Kết quả:** Tính tương thích hệ thống bao gồm các thông số thời gian lưu, diện tích pic, hệ số bất đối và số đĩa lý thuyết với giá trị RSD < 2%. Quy trình thẩm định đạt các chỉ tiêu về độ đặc hiệu, tính tuyến tính và độ lặp lại theo hướng dẫn của ICH. Hàm lượng allantoin định lượng được theo phương pháp đã thẩm định là 0,068%, tính theo dược liệu khô. **Kết luận:** Đã thẩm định được phương pháp và xác định được hàm lượng allantoin trong củ Hoài sơn trồng tại Nho Quan, Ninh Bình là 0,068% tính theo dược liệu khô.

**Từ khóa:** Củ Hoài sơn, allantoin, HPLC.

ABSTRACT

VALIDATION AND DETERMINATION OF ALLANTOIN IN  
*Dioscorea hamiltonii* Hook.f., (Dioscoreaceae) GROWN  
IN NHO QUAN, NINH BINH

Nguyen Minh Tuan<sup>1\*</sup>, Do Van Tuong<sup>2</sup>, Nguyen Van Lieu<sup>3</sup>, Ta Thuy Ha<sup>3</sup>

1. Dong Do University

2. Hoang Thanh Herbal Medicine Company Limited

3. Military Medical Academy Hanoi

**Background:** The allantoin's content in *Dioscorea hamiltonii* Hook.f., is an important criteria, but Vietnamese Pharmacopoeia V does not provide any method to quantify this substance. It is necessary to develop a method to quantify allantoin in cultivated Hoai Son tubers. **Objective:** To validate a method and quantify allantoin in Hoai Son tubers grown in Nho Quan, Ninh Binh. **Materials and methods:** Hoai Son tubers were harvested after 12 months grown in Nho Quan (Ninh Binh). A high performance liquid chromatography (HPLC) method for the quantitative analysis of allantoin has been developed. **Results:** System suitability has been investigated for retention time, peak area, asymetry parameter and the theoretical number of plates. The result of this investigation showed that all values RSD < 2%. The validation procedure met the criteria for specificity, linearity and repeatability according to ICH guidelines. The contents of allantoin in Hoai Son tubers samples were determined by validated method reached 0.068% dry weight. **Conclusion:** The method has been validated and the allantoin content in Hoai Son tubers grown in Nho Quan, Ninh Binh was 0.068%.

**Keywords:** *Dioscorea hamiltonii*, allantoin, HPLC.

## I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Cây Hoài sơn (*Dioscorea hamiltonii* Hook.f.) thường được gọi là cây Củ mài, là một loài dây leo phổ biến, phân bố rộng khắp các vùng rừng núi ở Việt Nam và đã được sử dụng làm thuốc từ lâu đời nay [1], [2], [6]. Củ Hoài sơn và hoạt chất Allantoin có nhiều tác dụng như: chống oxy hóa, điều hòa miễn dịch, hạ đường huyết, hỗ trợ chữa lành vết thương, bảo vệ da, bị viêm da tiết bã nhờn, bệnh vẩy nến,... [4], [6]. Hiện tại, trong ĐĐVN V có chuyên luận Hoài sơn, nhưng chưa đưa ra giới hạn hàm lượng và pháp định lượng của allantoin trong dược liệu này [1]. Vài năm gần đây, đã có một số công trình trong nước và trên thế giới nghiên cứu phương pháp xác định hàm lượng allantoin trong củ Hoài sơn bằng HPLC [3], [4], [8]. Cây Hoài sơn đã được trồng thử nghiệm từ năm 2020 tại Nho Quan, Ninh Bình lấy củ làm thuốc và việc đánh giá hàm lượng allantoin là một chỉ tiêu quan trọng để xác định chất lượng của dược liệu Hoài sơn [1]. Do vậy, nhóm nghiên cứu đã thẩm định và định lượng hàm lượng allantoin trong củ Hoài sơn trồng tại Ninh Bình.

## II. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1. Đối tượng nghiên cứu

**Nguyên liệu:** Củ thu hoạch từ cây Hoài sơn đã trồng được 12 tháng tại huyện Nho Quan, tỉnh Ninh Bình, được Viện Sinh thái và Tài nguyên sinh vật (Viện Hàn lâm KH&CN Việt Nam) giám định, có tên khoa học là *Dioscorea hamiltonii* Hook.f., họ Củ nâu: Dioscoreaceae [10]. Củ Hoài sơn được rửa sạch, sấy ở 60°C đến khô kiệt (hàm ẩm 0,03%).

**Dung môi, thuốc thử, thiết bị và dụng cụ:** đạt tiêu chuẩn dùng trong nghiên cứu.

**Chất chuẩn:** allantoin 20 mg (98,5%) xuất xứ Trung Quốc.

**Địa điểm nghiên cứu:** Viện Đào tạo Dược - Học viện Quân y; Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương - Bộ Y tế.

### 2.2. Phương pháp nghiên cứu

#### 2.2.1. Điều kiện phân tích

- Cột sắc ký: Cột Zorbax CN SB (150 x 4,6 mm, 5 µm). - Detector: UV 215 nm.  
- Thể tích tiêm: 20 µL; pha động: methanol - nước (2:98); tốc độ dòng: 0,2 ml/phút; nhiệt độ phòng cột: 25°C [5].

#### 2.2.2. Chuẩn bị mẫu phân tích

##### - Chuẩn bị dung dịch chuẩn

Cân chính xác khoảng 5 mg chất chuẩn allantoin cho vào bình định mức 10 mL, thêm nước vừa đủ 10 mL. Lắc đến tan hoàn toàn, dung dịch (DD) chuẩn gốc có nồng độ khoảng 500 µg/ml. Pha loãng DD chuẩn gốc trong các bình định mức thành dãy các DD có nồng độ khác nhau (12,5 - 25 - 50 - 75 - 100 - 125 µg/mL, lọc qua màng 0,45 µm.

##### - Chuẩn bị DD thử

Cân chính xác khoảng 1,0 g bột dược liệu cho vào bình nón 50 ml, thêm 2,5 mL nước và 25 ml ethanol 95%, lắc siêu âm trong 30 phút, đậy kín, để mẫu qua đêm ở 4°C. Lọc qua giấy lọc băng xanh, cô cách thủy dịch thu được đến cạn. Hòa tan cặn trong 5 mL nước cất, lắc siêu âm trong vòng 15 phút. Ly tâm DD ở tốc độ 7700 vòng/phút/15 phút thu được dịch trong. Lấy chính xác 1 mL dịch trong, cho vào bình định mức 10 mL, thêm nước vừa đủ. Lắc đều, lọc qua màng 0,45 µm và tiến hành phân tích HPLC.

**- Tính toán kết quả**

Hàm lượng allantoin P (mg/g) tính theo dược liệu khô được tính theo công thức:

$$P = \frac{C}{m \times (1 - R) \times 10}$$

m: Khối lượng dược liệu (g); R: Độ ẩm dược liệu (0,06%); C: Hàm lượng allantoin trong DD thử ( $\mu\text{g/mL}$ ).

**2.2.3. Thẩm định quy trình định lượng**

Nghiên cứu này được tiến hành theo quy trình phân tích của tác giả Trần Thị Oanh và cộng sự (2014) [5] và thực hiện thẩm định lại một số tiêu chí nhằm đánh giá giá trị sử dụng và tính phù hợp của phương pháp để áp dụng định lượng allantoin trong củ Hoài sơn trồng ở Ninh Bình. Bao gồm các chỉ tiêu sau: Tính tương thích hệ thống, độ đặc hiệu chọn lọc, khoảng tuyến tính và độ lặp lại.

**- Khảo sát tính tương thích hệ thống**

Tiến hành tiêm lặp lại 6 lần DD chuẩn allantoin có nồng độ  $12,5 \mu\text{g/mL}$  vào hệ thống sắc ký. Khảo sát độ lệch chuẩn tương đối RSD (%) của thời gian lưu, diện tích pic, hệ số đối xứng và số đĩa lý thuyết. *Yêu cầu:* RSD (%) của thời gian lưu  $\leq 1\%$ , diện tích pic  $\leq 2\%$ , hệ số đối xứng  $\leq 2\%$  và số đĩa lý thuyết  $\geq 2000$ .

**- Khảo sát độ đặc hiệu chọn lọc**

Mẫu trắng: nước; DD chuẩn, DD thử đã pha.

Tiến hành sắc ký trong điều kiện đã lựa chọn và ghi sắc ký đồ của mẫu trắng, DD chuẩn, DD thử để so sánh. *Yêu cầu:* Trên sắc ký đồ của mẫu trắng không phát hiện pic tại vị trí thời gian lưu của pic allantoin hoặc có phát hiện nhưng hệ số ảnh hưởng không vượt quá  $2\%$ .

**- Khảo sát khoảng tuyến tính**

Khảo sát sự phụ thuộc tuyến tính giữa nồng độ với diện tích pic của allantoin trong khoảng  $12,5 \mu\text{g/mL}$ - $125 \mu\text{g/mL}$ . *Yêu cầu:* Hệ số tương quan của đường chuẩn không dưới 0,99.

**- Khảo sát độ lặp lại**

Tiến hành với DD mẫu thử với điều kiện sắc ký đã lựa chọn. Xác định RSD (%). *Yêu cầu:* RSD  $\leq 2\%$ .

**2.2.4. Xác định hàm lượng allantoin trong củ Hoài sơn**

*Yêu cầu:* Hàm lượng allantoin không được dưới 0,04%.

**- Xử lý số liệu:** Các số liệu thu thập xử lý bằng phần mềm Microsoft excel 2016.

**III. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU****3.1. Kết quả thẩm định phương pháp định lượng****3.1.1. Tính tương thích hệ thống**

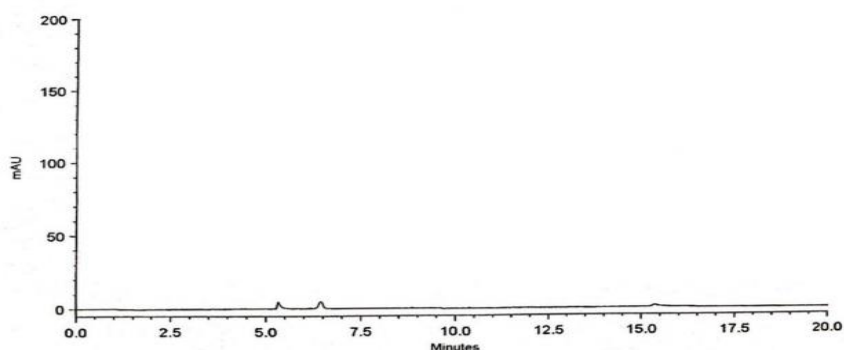
Bảng 1. Kết quả khảo sát tính tương thích hệ thống sắc ký

STT	Thời gian lưu (phút)	Diện tích pic ( $\mu\text{V}\cdot\text{s}$ )	Hệ số bất đối	Số đĩa lý thuyết (N)
1	9,420	1.460.869,46	1,239	11671
2	9,453	1.472.649,12	1,250	11984
3	9,420	1.472.713,68	1,242	11716
4	9,420	1.458.535,80	1,206	11765

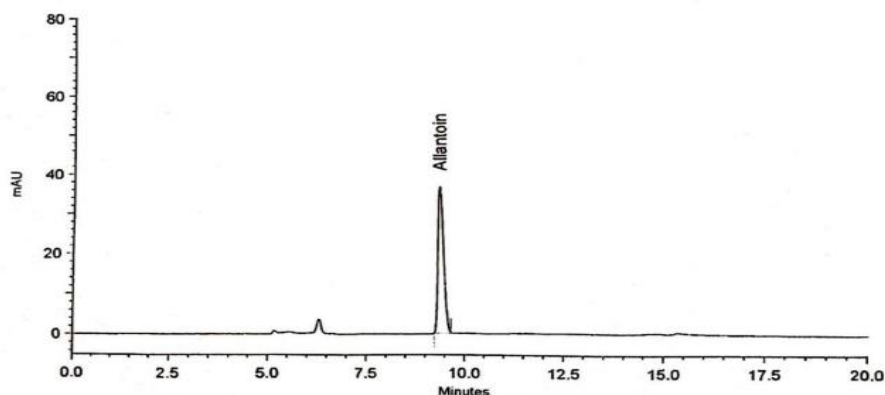
STT	Thời gian lưu (phút)	Diện tích pic ( $\mu V \cdot s$ )	Hệ số bất đối	Số đĩa lý thuyết (N)
5	9,460	1.484.282, 69	1,254	11876
6	9,400	1.417.509,76	1,219	11555
$\bar{X} \pm SD$	$9,429 \pm 0,023$	$1.461.093,59 \pm 23291,43$	$1,235 \pm 0,019$	$11761 \pm 152,0$
RSD (%)	0,243	1,738	1,514	1,292

Nhận xét: Các thông số: Thời gian lưu ( $0,243\% < 1\%$ ), RSD (%) diện tích pic của allantoin ( $1,738\%$ ), hệ số bất đối từ  $1,514\%$  ( $< 2\%$ ), số đĩa lý thuyết ( $1,292\%$ ) đều nằm trong giới hạn qui định về tính tương thích hệ thống sắc ký. Hệ thống được sử dụng là phù hợp và đảm bảo ổn định cho phép phân tích định lượng allantoin.

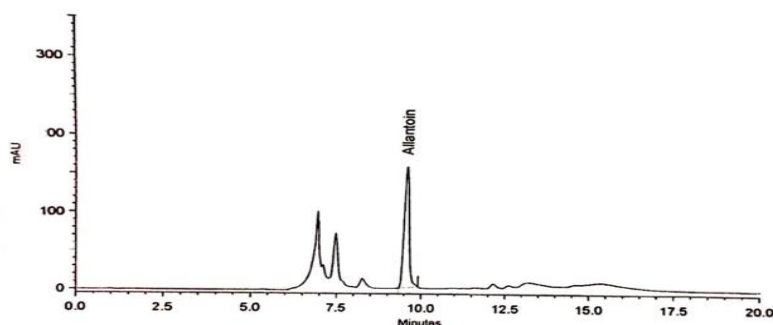
### 3.1.2. Độ đặc hiệu chọn lọc



Hình 1. Sắc ký đồ mẫu trắng



Hình 2. Sắc ký đồ mẫu chuẩn allantoin



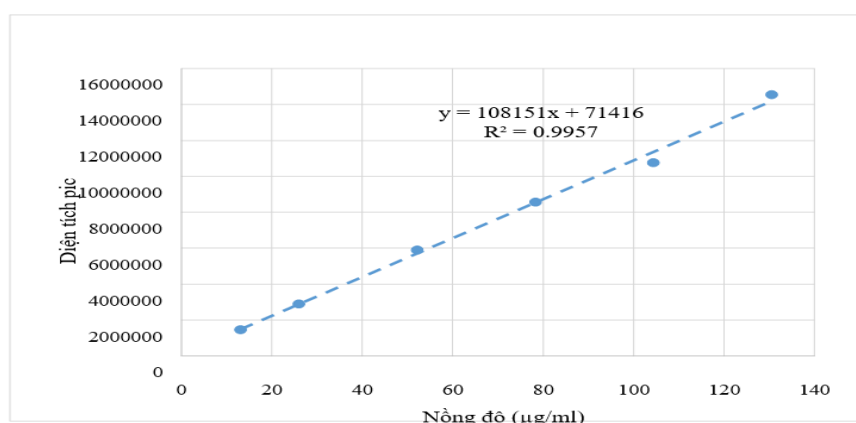
Hình 3. Sắc ký đồ mẫu thử allantoin

Nhận xét: Trên sắc ký đồ mẫu trắng không xuất hiện pic, trong khi đó trên sắc ký đồ của DD chuẩn và DD thử chứa allantoin đều cho 1 pic ở khoảng thời gian 9,4 phút và trong khoảng thời gian tương ứng với mẫu thử và mẫu chuẩn. Phương pháp (PP) lựa chọn là đặc hiệu cho phân tích định lượng allantoin.

### 3.1.3. Khoảng tuyến tính

Bảng 2. Sự tương quan giữa diện tích pic và nồng độ allantoin

STT	Nồng độ (µg/mL)	Diện tích pic (µV*s)	Nồng độ theo đường chuẩn (µg/mL)	Độ lệch ΔI (%)
1	13,05	1.460.869	12,85	-1,55
2	26,01	2.899.382	26,15	0,53
3	52,21	5.910.281	53,99	3,41
4	78,31	8.566.229	78,55	0,30
5	104,41	10.774.083	98,96	-5,22
6	130,51	14.564.589	134,01	2,68



Hình 4. Đồ thị biểu diễn sự phụ thuộc tuyến tính giữa nồng độ và diện tích pic của allantoin

Nhận xét: Có sự phụ thuộc tuyến tính chặt chẽ giữa diện tích pic và nồng độ allantoin khảo sát (12,5 - 125,0 µg/mL). Phương trình hồi quy là  $y = 108151x + 71416$ ,  $R^2 = 0,9957$ . Độ lệch các điểm nồng độ xây dựng đường chuẩn không vượt quá  $\pm 15\%$ . Đường chuẩn đã xây dựng đáp ứng yêu cầu của phép phân tích định lượng allantoin bằng HPLC.

### 3.1.4. Độ lặp lại

Bảng 3. Kết quả khảo sát độ lặp lại (n=3)

STT	Khối lượng dược liệu (g)	Diện tích pic (µV*s)	Hàm lượng allantoin (mg/g)
1	1,0008	6.475.745 ± 58612,68	6,73
2	1,0014	6.608.649 ± 64470,42	6,86
3	1,0007	6.601.122 ± 58612,68	6,86
4	1,0003	6.550.150 ± 52519,21	6,81
5	1,0011	6.494.867 ± 57419,11	6,74
6	1,0005	6.501.450 ± 61409,62	6,76
— X ± SD		6.538.210 ± 56244,68	6,79 ± 0,06
RSD (%)			0,86%

Nhận xét: Với khối lượng dược liệu từ 1,0005 (g) - 1,0014 (g), diện tích pic từ 6.475.745 - 6.608.649, hàm lượng allantoin từ 6,73 - 6,86 (mg/g), với giá trị của độ lặp lại

trong ngày là  $0,86\% < 2\%$ . PP đã chọn đảm bảo độ lặp lại của các thử nghiệm được thực hiện trong cùng một điều kiện và trong khoảng thời gian ngắn.

### 3.2. Kết quả định lượng allantoin trong Hoài sơn

Bảng 4. Kết quả định lượng allantoin trong rễ củ Hoài sơn ( $n = 5$ )

STT	Khối lượng cân (g)	Diện tích pic thử ( $\mu V \cdot s$ )	Hàm lượng (mg/g)
1	$1,0008 \pm 0,01$	$6.475.745,12 \pm 324,64$	$6,73 \pm 0,05$
2	$1,0014 \pm 0,03$	$6.605.923,67 \pm 459,09$	$6,87 \pm 0,21$
3	$1,0007 \pm 0,09$	$6.601.122,09 \pm 673,21$	$6,86 \pm 0,31$
4	$1,0010 \pm 0,10$	$6.822.442,50 \pm 586,50$	$7,09 \pm 0,17$
5	$1,0012 \pm 0,04$	$6.312.443,28 \pm 831,11$	$6,56 \pm 0,09$
$\bar{X} \pm SD$	$1,0010 \pm 0,01$	$6.563.535,33 \pm 721,09$	$6,82 \pm 0,19$

Nhận xét: Hàm lượng allantoin trong rễ củ Hoài sơn khoảng  $6,82 \text{ mg/g}$  ( $0,068\%$ ) tính theo dược liệu khô kiệt.

## IV. BÀN LUẬN

### 4.1. Về thẩm định phương pháp định lượng

#### 4.1.1. Tính tương thích hệ thống

Hệ thống được sử dụng là phù hợp và đảm bảo ổn định cho phép phân tích định lượng allantoin. Các kết quả này cũng phù hợp với các công bố của Nguyễn Thị Thanh Mai (2023), Trần Thị Oanh, Nguyễn Thị Vân Anh (2014) và Yoon K.D.et al (2008) [3], [4], [8].

#### 4.1.2. Độ đặc hiệu chọn lọc

PP lựa chọn là đặc hiệu cho phân tích định lượng allantoin, khi sắc ký đồ cho thấy trong mẫu trắng không có allantoin, mẫu chuẩn và mẫu thử có allantoin. Mẫu thử chỉ có allantoin, không có chất khác. Các kết quả này cũng phù hợp với các công bố của Nguyễn Thị Thanh Mai (2023), Trần Thị Oanh, Nguyễn Thị Vân Anh (2014) và Yoon K.D.et al (2008) [4], [5], [9].

#### 4.1.3. Khoảng tuyến tính

Có sự phụ thuộc tuyến tính chặt chẽ giữa diện tích pic và nồng độ allantoin cần định lượng. Phương trình hồi quy là  $y = 108151x + 71416$  với hệ số  $R^2 = 0,9957$ . Độ chệch các điểm nồng độ dùng xây dựng đường chuẩn không vượt quá  $\pm 15\%$ . Đường chuẩn đã xây dựng đáp ứng yêu cầu của phép phân tích định lượng allantoin bằng HPLC.

Kết quả này không có sự sai lệch so với các công bố của Nguyễn Thị Thanh Mai (2023), Trần Thị Oanh, Nguyễn Thị Vân Anh (2014) và Yoon K.D.et al (2008) [4], [5], [9].

#### 4.1.4. Độ lặp lại

Phương pháp đã chọn đảm bảo độ lặp lại của các thử nghiệm được thực hiện trong cùng một điều kiện và trong khoảng thời gian ngắn. Kết quả này không có sự sai lệch so với các công bố của Nguyễn Thị Thanh Mai (2023), Trần Thị Oanh, Nguyễn Thị Vân Anh (2014) và Yoon K.D.et al (2008) [4], [5], [9].

### 4.2. Về hàm lượng allantoin trong củ Hoài sơn

Trong chuyên luận Củ Mài (Củ Hoài sơn) (*Tuber Dioscoreae persimilis*) – Dược Điển Việt Nam V không có chỉ tiêu về định lượng allantoin. Tuy nhiên, hàm lượng allantoin trong củ Hoài sơn trồng tại Nho Quan, Ninh Bình trong nghiên cứu này cao hơn công bố của các tác giả Trần Thị Oanh, Nguyễn Thị Vân Anh (2014); Nguyễn Thị Thanh Mai, Nguyễn

Viết Toan, Nguyễn Thị Hồng Hạnh và Yoon K.D.et al (2008) về hàm lượng allantoin trong củ Hoài sơn lần lượt là 0,0459% [4]; 0,012-0,062% [5], và 0,041-0,071%, [9]. Cây Hoài sơn trồng ở Ninh Bình phù hợp về thổ nhưỡng, điều kiện chăm sóc, cho hàm lượng allantoin (0,068%) cao hơn một số nơi khác ở Việt Nam. Tuy nhiên cần tiếp tục có những nghiên cứu tiếp theo để khẳng định chất lượng củ Hoài sơn được trồng tại khu vực này. Từ đó phát triển vùng nguyên liệu, chủ động nguồn dược liệu, tạo công ăn việc làm và thu nhập cho nông dân.

## **V. KẾT LUẬN**

Đã tiến hành thẩm định phương pháp và định lượng được allantoin trong củ Hoài sơn trồng tại Nho Quan, Ninh Bình bằng kỹ thuật HPLC: Thẩm định về tính tương thích hệ thống bao gồm các thông số thời gian lưu, diện tích pic, hệ số bất đối và số đĩa lý thuyết, đã cho thấy các giá trị RSD < 2%. Quy trình thẩm định đạt các chỉ tiêu về độ đặc hiệu, tính tuyến tính và độ lặp lại theo hướng dẫn của ICH. Hàm lượng allantoin trong củ Hoài sơn trồng tại Nho Quan, Ninh Bình được định lượng theo phương pháp đã thẩm định là 0,068% tính theo dược liệu khô kiệt.

## **TÀI LIỆU THAM KHẢO**

1. Bộ Y tế, Dược điển Việt Nam V, NXB Y học, Hà Nội. 2017.
  2. Đỗ Huy Bích và cộng sự, Cây thuốc và động vật làm thuốc ở Việt Nam, tập I (xuất bản lần thứ 2). NXB Khoa học và Kỹ thuật, Hà Nội, 557-560. 2006.
  3. Nguyễn Thị Hiền và cộng sự, Thành phần hóa học của Củ mài thu tại Mê Linh, Vĩnh Phúc. Tạp chí dược liệu 2015, số 01, 3-7.
  4. Nguyễn Thị Thanh Mai và cộng sự, Nghiên cứu bào chế trà hòa tan từ Hoài sơn, Lược vàng, Mộc đàn nhằm hỗ trợ giảm đường huyết ở người bị đái tháo đường tuýp 2, Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn, Bộ NN&PTNT. 2023. 51-56.
  5. Trần Thị Oanh, Nguyễn Thị Vân Anh. Xác định hàm lượng Allantoin trong củ mài (*Dioscorea persimilis*, Dioscoreaceae) bằng sắc ký lỏng hiệu năng cao. Tạp chí Nghiên cứu dược & Thông tin thuốc (3), Trường Đại học Dược Hà Nội. 2014. 82-87.
  6. Nguyễn Việt Thân. Cây thuốc Việt Nam, NXB Y học, tập II. 2020. 302-303.
  7. Guangxi University of Chinese Medicine. Preparation method and application of effective part of *dioscorea persimilis* for decreasing blood sugar. Publication of CN103520425A, 22/01/2014. 2014.
  8. The International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use. Validation of analytical procedures: text and methodology. Q2 (R2). 2022.
  9. Yoon K.D.et al. Determination of allantoin in *Dioscorea Rhizoma* by high performance liquid chromatography (HPLC) using cyano columns. *Natural Product Sciences*. 2008. 14 (4), 254-259.
  10. Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam, Viện Sinh thái và Tài nguyên sinh vật, Phiếu kết quả giám định mẫu tiêu bản “Hoài sơn”, Hà Nội, ngày 10/02/2020. 2020.
-