

antioxidant activity, *Separation and Purification Technology*, 102, 26-33. 6. Trường Đại học Dược Hà Nội, Bộ môn Công nghiệp Dược (2018), Kỹ thuật chiết xuất dược liệu, Nhà xuất bản Y học, 51-54. 7. Wang H., Helliwell K., You X. (2000), Isocratic elution system for the determination of catechins, caffeine and gallic acid in green tea using HPLC, *Food Chemistry*, 68(1), 115-121. 8. Phùng Minh Dũng (2005), *Nghiên cứu chiết xuất catechin từ Chè xanh Việt Nam*, Luận văn Thạc sỹ, trường Đại học Dược Hà Nội. 9. Hoàng Văn Hoan (2014), *Xây dựng và thử nghiệm quy trình công nghệ sản xuất nguyên liệu dược phẩm epigallocatechin gallat (EGCG) từ chè xanh*, Bộ công thương, mã số CNHD.ĐT.028/11-12. 10. Lin L., Zhang Y. Y., Chen R., Yang L., Ni H., Li. H. H. (2019), Highly simplified preparation of tea flavonoids from surplus tea leaves by the novel three-phase extraction and purification, *Separation Science and Technology*, 54(5), 741-746.

Tạp chí Dược liệu, tập 27, số 3/2022 (Trang 157 - 166)

ỨNG DỤNG CHIẾT XUẤT PHA RẮN (SPE) VÀO PHÂN TÍCH SAPONIN TRONG CÁC CHẾ PHẨM SÂM VIỆT NAM

**Nguyễn Trường Huy¹, Vũ Huỳnh Kim Long¹, Ngô Thị Mỹ Duyên¹,
Trần Mộng Kha¹, Nguyễn Minh Đức^{1,2,*}**

¹Khoa Dược, Đại học Tôn Đức Thắng;

²Trung tâm Khoa học và Công nghệ Dược Sài Gòn

*Email: nguyenminhduc@tdtu.edu.vn

(Nhận bài ngày 31 tháng 3 năm 2022)

Tóm tắt

Sâm Việt Nam, còn gọi sâm Ngọc Linh, tên khoa học *Panax vietnamensis* Ha et Grushv. - Araliaceae, là một loài sâm quý đặc hữu của Việt Nam với thành phần hóa học saponin đặc trưng và tác dụng dược lý đã được chứng minh. Gần đây, để đáp ứng nhu cầu thị trường, sâm Việt Nam được chế biến dưới nhiều dạng chế phẩm khác nhau để làm thuốc hoặc thực phẩm bảo vệ sức khỏe. Để định tính và định lượng saponin trong sâm Việt Nam, Dược điển Việt Nam V (2017) quy định dùng phương pháp sắc ký lớp mỏng và sắc ký lỏng hiệu năng cao HPLC-UV. Tuy nhiên, đối với các sản phẩm phối hợp sâm Việt Nam với các thành phần dược liệu hay tá dược khác, việc phân tích trở nên khó khăn hơn do ngoài saponin các chế phẩm còn chứa một hỗn hợp các chất gồm nhiều thành phần phức tạp với độ hòa tan khác nhau. Phương pháp chiết xuất pha rắn (Solid-Phase Extraction - SPE) đã được giới thiệu như là một giải pháp hiệu quả trong xử lý mẫu giúp làm giàu hợp chất đích và loại tạp để mang lại kết quả phân tích tốt hơn. Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã áp dụng SPE C18 xử lý mẫu thử các chế phẩm để định tính các saponin đặc trưng của sâm Việt Nam gồm ginsenosid-Rb₁, ginsenosid-Rd, ginsenosid-Rg₁ và majonosid-R2 bằng phương pháp SKLM và định lượng chúng bằng phương pháp HPLC-UV. Quy trình định lượng saponin trong sâm Việt Nam áp dụng xử lý mẫu bằng SPE đã được thẩm định đạt yêu cầu theo các hướng dẫn của ICH. Tổng hàm lượng 4 saponin ginsenosid-Rb₁ (G-Rb₁), ginsenosid-Rd (G-Rd), ginsenosid-Rg₁ (G-Rg₁) và majonosid-R2 (M-R2) trong chế phẩm bột cao sâm Việt Nam 20% và trà hòa tan sâm Việt Nam lần lượt là 1,86% và 2,01% tính theo khối lượng chế phẩm khan. Kết quả đã chứng minh việc áp dụng SPE vào xử lý mẫu thử không chỉ giúp giải quyết các trở ngại trong quá trình sắc ký do thành phần tá dược trong các chế phẩm gây ra mà còn mang lại tính hiệu quả và ổn định cho quy trình phân tích.

Từ khóa: Kỹ thuật chiết xuất pha rắn (SPE), Sâm Việt Nam, *Panax vietnamensis*, Saponin, HPLC.

Summary

Application of Solid Phase Extraction for Analysis of Saponins in Vietnamese Ginseng Products

Vietnamese ginseng (*Panax vietnamensis* Ha et Grushv., Araliaceae) is a precious endemic *Panax* species of Vietnam. As a result, it is processed to form various preparations as pharmaceuticals or health foods in order to meet the market demand. According to Vietnamese Pharmacopoeia V (2017), TLC and HPLC-UV, respectively, are used for qualitative and quantitative analysis of saponins in Vietnamese ginseng crude drug. However, most of product formular containing Vietnamese ginseng is commonly combined with other excipients or herbals. These combination leads to peak distortion and overlaps as well as negatively influences to HPLC systems. Due to long-term repeated analyses, the accumulation of contamination onto HPLC columns causing clogging, delay of the retention time, unstable HPLC process, etc. Solid-phase extraction (SPE) is an effective sample preparation method which is applied in this study to purify samples of Vietnamese ginseng products for TLC and HPLC analysis of characteristic saponins, including ginsenoside-Rb₁ (G-Rb₁), ginsenoside-Rd (G-Rd), ginsenoside-Rg₁ (G-Rg₁), and majonoside-R2 (M-R2). The result showed that SPE C18 helps exclude the influence of excipients in the product formulation, enrich and purify the target compounds, which makes the HPLC process stable and reliable.

Keywords: Solid Phase Extraction, Vietnamese ginseng, *Panax vietnamensis*, Saponin, HPLC.

1. Đặt vấn đề

Sâm Việt Nam là loài dược liệu quý hiếm thuộc chi *Panax*, được phát hiện lần đầu tiên tại Việt Nam năm 1973. Thành phần chính trong sâm Việt Nam là các saponin có cấu trúc dammaran, gồm các hợp chất có khung protopanaxadiol (G-Rb₁, G-Rd...) và protopanaxatriol (G-Rg₁, G-Re...) tương tự như các loài *Panax* nổi tiếng trên thế giới như Nhân sâm, sâm Hoa Kỳ, và Tam thất. Ngoài ra, sâm Việt Nam còn chứa hàm lượng cao các saponin đặc trưng khung ocotillol, trong đó chủ yếu là majonosid-R2 [1],[2],[3]. Sâm Việt Nam được chứng minh là có tác dụng tăng sức đề kháng, chống suy nhược, điều hòa các rối loạn chuyển hóa trong cơ thể và đặc biệt là tác động ức chế các mô hình ung thư trên thực nghiệm [4],[5]. Vì vậy, sâm Việt Nam đã được đưa vào danh mục sản phẩm quốc gia Việt Nam và được mệnh danh là cây sâm "quốc bảo".

Dược điển Việt Nam V (2017) quy định dùng lần lượt phương pháp SKLM và HPLC-UV để định tính và định lượng các saponin trong sâm Việt Nam [6]. Gần đây, để góp phần đa dạng hóa các sản phẩm nhằm mang đến sự tiện dụng và đáp ứng nhu cầu chăm sóc sức khỏe, sâm Việt Nam được bào chế với nhiều dạng chế phẩm khác nhau. Các chế phẩm trên ngoài nguyên liệu sâm Việt Nam còn chứa nhiều thành phần tá dược như glucose, lactose, maltodextrin, magnesi stearat... hoặc/và dược liệu khác. Các thành phần dược liệu hoặc tá dược trong công thức bào chế chế phẩm tạo ra các hỗn hợp phức tạp với độ phân cực khác nhau, gây cản trở cho quá trình sắc ký và ảnh hưởng việc tách các chất do các vết/pic quan tâm có thể bị các vết/pic tạp che lấp trên sắc ký đồ. Ngoài ra, khi tiến hành phân tích HPLC liên tục nhiều mẫu, các tạp chất còn có thể tích lũy trên hệ thống cột sắc ký gây tắc nghẽn cột, dẫn đến tăng áp suất dòng cột, thay đổi thời gian lưu, làm biến dạng đỉnh, lâu dần sẽ làm giảm khả năng phân tách và giảm tuổi thọ cột sắc ký...

Kỹ thuật chiết xuất pha rắn (Solid-Phase Extraction - SPE) đã được nghiên cứu và phát triển từ những năm 1960 nhằm tinh chế và làm giàu mẫu sắc ký, đặc biệt được ứng dụng nhiều trong lĩnh vực sinh hóa và môi trường để phân tích mẫu nước tiểu, máu, nước, đất, mô động vật... Trên thế giới, SPE cũng đã sớm được áp

dụng và cho thấy hiệu quả trong việc xử lý các mẫu dược liệu đặc biệt là các chế phẩm từ dược liệu, thường chứa hỗn hợp chất phức tạp với tính chất lý hóa trong đó có độ tan khác nhau. Tuy vậy, hiện nay ở nước ta việc ứng dụng SPE trong lĩnh vực phân tích dược liệu và chế phẩm dược liệu còn hạn chế, do những quan ngại về chi phí, tính hiệu quả, sự phiền toái trong xây dựng, thẩm định và áp dụng phương pháp ...

Bài báo này trình bày việc nghiên cứu ứng dụng kỹ thuật SPE vào xử lý mẫu phân tích định tính và định lượng saponin trong một số chế phẩm sâm Việt Nam qua đó chứng minh tính khả thi và hiệu quả của phương pháp này.

2. Nguyên vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Nguyên vật liệu

Bột chiết chứa cao lỏng sâm Việt Nam 20% (gọi tắt là bột sâm Việt Nam 20%) và trà hòa tan sâm Việt Nam được nghiên cứu bào chế bởi Khoa Dược, Trường Đại học Tôn Đức Thắng. Thành phần bột sâm Việt Nam 20%, trong đó ngoài cao lỏng sâm Việt Nam chiếm 20%, phần tá dược còn lại gồm lactose và maltodextrin. Trà hòa tan sâm Việt Nam chứa 15% cao lỏng sâm Việt Nam và các tá dược gồm lactose và glucose.

Mẫu bột sâm Việt Nam 20% và trà hòa tan sâm Việt Nam được lưu tại Khoa Dược, Trường Đại học Tôn Đức Thắng với mã số lần lượt là BSVN01-0121 và TSVN01-0621.

2.2. Thiết bị - hóa chất

Chất đối chiếu là các chất chuẩn gốc (p), gồm ginsenosid-Rb₁ (G-Rb₁, độ tinh khiết 99,17%), ginsenosid-Rd (G-Rd, độ tinh khiết 94,48%), ginsenosid-Rg₁ (G-Rg₁, độ tinh khiết 96,43%), majonosid-R2 (M-R2, độ tinh khiết 98,86%), và vina-ginsenosid-R2 (V-R2, chuẩn làm việc dùng để định tính SKLM) được cung cấp bởi Đại học Y Dược thành phố Hồ Chí Minh.

Cột SPE Agilent Bond Elut C18, 500 mg, 6 ml.

Hệ thống sắc ký Shimadzu HPLC Prominence-i LC-2030C 3D Plus; cột Kya-Tech C18 (150 mm × 4,6 mm; 5 μm); đầu dò PDA Shimadzu được cài đặt ở bước sóng 196 nm. Cân phân tích 5 số lẻ Sartorius 225D-1S, bể siêu âm Grant XUB12, bộ dụng cụ chiết pha rắn đa kênh chân không 20 vị trí Waters. Các dung môi đạt tiêu chuẩn HPLC gồm acetonitril, methanol, nước. Các dung môi đạt tiêu chuẩn phân tích (AR) bao gồm ethanol, cloroform, acid sulfuric, acid formic và nước cất.

2.3. Phương pháp nghiên cứu

2.3.1. Phương pháp sắc ký lớp mỏng:

Phương pháp sắc ký lớp mỏng được sử dụng để khảo sát quá trình loại tạp và chiết kiệt saponin trong các mẫu thử khi áp dụng SPE để xử lý mẫu định lượng với điều kiện như sau:

Bản mỏng: *Silica gel GF₂₅₄*.

Dung môi triển khai: Cloroform - Methanol - Nước (65:35:10, lớp dưới).

Dung dịch hỗn hợp chuẩn: Hòa tan 1 mg mỗi chất chuẩn G-Rb₁, G-Rd, G-Rg₁, M-R2 và V-R2 vào 1 ml methanol 100%.

Các dung dịch thử được sử dụng trong nghiên cứu bao gồm:

- Dịch chiết MeOH của bột sâm Việt Nam 20% và trà hòa tan sâm Việt Nam đã xử lý bằng SPE.

- Dịch chiết MeOH của bột sâm Việt Nam 20% và trà hòa tan sâm Việt Nam không qua xử lý SPE: Thêm 5 ml methanol 100% vào lần lượt 500 mg bột sâm Việt Nam 20% và 700 mg trà hòa tan sâm Việt Nam, siêu âm 15 phút, ly tâm với tốc độ 3.500 vòng/phút trong 5 phút. Gạn lấy dịch chiết làm dung dịch thử.

- Các mẫu thử định lượng đã xử lý qua SPE.

Cách tiến hành: Chấm riêng biệt lên bản mỏng sắc ký 10 μ l dung dịch thử và dung dịch chuẩn. Triển khai sắc ký cho đến dung môi đi được khoảng 10 cm, lấy bản mỏng ra, để khô ở nhiệt độ phòng, phun thuốc thử acid sulfuric 10% trong ethanol, sấy ở 105°C đến khi hiện rõ các vết. Quan sát dưới ánh sáng thường. Theo dõi sự xuất hiện của các vết cùng màu sắc và giá trị R_f với các vết tương ứng với các chất chuẩn của dung dịch chuẩn.

2.3.2. Xây dựng và thẩm định phương pháp định lượng các saponin trong bột sâm Việt Nam 20% và trà hòa tan sâm Việt Nam:

Điều kiện sắc ký: Thực hiện dựa theo chuyên luận Sâm Việt Nam (Thân rễ và rễ) của Dược điển Việt Nam V, tập 2 [6], có điều chỉnh để phù hợp với mẫu phân tích với phương pháp HPLC sử dụng cột Kya Tech C18 (150 mm $\times$ 4,6 mm; 5 μ m); đầu dò PDA được cài đặt ở bước sóng 196 nm; nhiệt độ cột: 30°C; thể tích mẫu tiêm: 25 μ L; pha động sử dụng hỗn hợp acetonitril (A) và nước (B); chương trình rửa giải đối với bột sâm Việt Nam 20% ở tốc độ dòng 1 mL/phút: 0-15 phút: A 22%, 15 - 25 phút: A 22 - 30%, 25 - 32 phút: A 30%, 32 - 45 phút: A 30 - 40%, 45-50 phút: A 40 - 80%, 50 -

64 phút: A 80%, 64 - 65 phút: A 80 - 22%, 65 - 78 phút: A 22%; chương trình rửa giải với trà hòa tan sâm Việt Nam ở tốc độ dòng 0,7 ml/phút như sau: 0 - 25 phút: A 21%, 25 - 35 phút: A 21 - 32%, 35 - 50 phút: A 32%, 50-68 phút: A 32 - 35%, 68 - 75 phút: A 35 - 95%, 75 - 76 phút: A 95 - 21%, 76 - 86 phút: A 21%.

Dung dịch chuẩn: Hòa tan các chất chuẩn G-Rb₁, G-Rd, G-Rg₁ và M-R2 trong methanol 100% để thu được dung dịch chuẩn hỗn hợp đối với quy trình định lượng mẫu bột sâm Việt Nam 20% có nồng độ chất chuẩn lần lượt là 0,23 mg/mL; 0,10 mg/mL; 0,58 mg/mL và 0,93 mg/mL. Quy trình định lượng mẫu trà hòa tan sâm Việt Nam có nồng độ chất chuẩn lần lượt là 0,42 mg/mL; 0,13 mg/mL; 0,88 mg/mL và 1,23 mg/mL.

Dung dịch thử

Đối với bột sâm Việt Nam 20%: Cân chính xác 500 mg bột sâm Việt Nam 20% chiết bằng siêu âm 3 lần mỗi lần 10 phút, lần lượt với 6, 6, 4 mL nước, ly tâm lấy dịch. Đối với trà hòa tan sâm Việt Nam: Cân chính xác 700 mg trà hòa tan sâm Việt Nam chiết bằng siêu âm 3 lần mỗi lần 20 phút, lần lượt với 5, 4, 2 mL nước, ly tâm lấy dịch. Dịch nước được nạp lên cột SPE-C18 đã được hoạt hóa với 6 mL methanol 100%, sau đó ổn định cột với 12 mL nước. Mẫu trên cột SPE được loại tạp lần lượt với 6 mL nước, 4 mL methanol 10%. Rửa giải cột SPE với 4,8 mL methanol chứa 1% acid formic vào bình định mức 5 mL, thêm methanol 100% đến vạch, lắc đều.

Mẫu trắng: Methanol 100%.

Hàm lượng saponin trong chế phẩm tính theo khối lượng khan % (kl/kl) được xác định dựa vào diện tích của đỉnh tương ứng với hợp chất cần định lượng sử dụng phương trình hồi quy tuyến tính đã xây dựng.

Phương pháp định lượng được thẩm định theo các tiêu chí: tính đặc hiệu, tính tương thích hệ thống, tính tuyến tính, độ lặp lại, độ đúng, giới hạn phát hiện và giới hạn định lượng [7],[8].

2.3.3. Thẩm định phương pháp định lượng:

Phương pháp định lượng được thẩm định theo các tiêu chí của ICH[7] và Sổ tay đăng ký thuốc[8].

Tính tương thích hệ thống: Tiến hành tiêm 6 lần liên tiếp cùng một dung dịch thử đã chuẩn bị. Giá trị độ lệch chuẩn tương đối (%RSD) của

thời gian lưu (t_R) và diện tích đỉnh (S) của các saponin chính phải không được vượt quá 2,0%. Hệ số đối xứng (A_s) phải có giá trị nằm trong khoảng 0,8 ~ 1,5, độ phân giải $R_s \geq 1,25$, số đĩa lý thuyết $N \geq 1000$.

Tính đặc hiệu: Tiến hành sắc ký lần lượt mẫu trắng, mẫu chuẩn, mẫu thử và mẫu thử thêm chuẩn. Yêu cầu: Sắc ký đồ của mẫu trắng phải không xuất hiện tín hiệu tại thời gian lưu tương ứng với thời gian lưu của các saponin quan tâm. Sắc ký đồ của mẫu thử phải có đỉnh có thời gian lưu tương ứng với các saponin trong mẫu chuẩn. Trong sắc ký đồ của mẫu thử thêm chuẩn, chiều cao và diện tích đang khảo sát phải tăng lên so với trước khi thêm chuẩn.

Tính tuyến tính và khoảng xác định: Dung dịch chuẩn xây dựng đường tuyến tính định lượng bột sâm Việt Nam 20%: Cân chính xác 4,15 mg G-Rb₁; 1,52 mg G-Rd; 10,47 mg G-Rg₁

và 16,90 mg M-R2 vào bình định mức 5 mL, thêm methanol 100% đến vạch, lắc đều thu hỗn hợp chuẩn C1. Từ C1 pha loãng với methanol 100% để thu được các dung dịch chuẩn có nồng độ C2-C6 như Bảng 1.

Dung dịch chuẩn xây dựng đường tuyến tính định lượng trà hòa tan sâm Việt Nam: Cân chính xác 3,04 mg G-Rb₁, 1,15 mg G-Rd, 6,93 mg G-Rg₁ và 8,63 mg M-R2 vào bình định mức 5 mL, thêm methanol 100% đến vạch, lắc đều thu hỗn hợp chuẩn C1. Từ C1 pha loãng với methanol 100% để thu được các dung dịch chuẩn có nồng độ C2-C6 như Bảng 1.

Tiến hành tiêm vào hệ thống sắc ký. Ghi nhận diện tích đỉnh (G-Rb₁, G-Rd, G-Rg₁, M-R2 và V-R2) ở mỗi nồng độ. Xác định sự tương quan giữa nồng độ và diện tích đỉnh bằng cách lập phương trình hồi quy tuyến tính và xác định hệ số tương quan tuyến tính R.

Bảng 1. Nồng độ các giai mẫu của đường tuyến tính trong xây dựng quy trình định lượng các saponin chính trong chế phẩm sâm Việt Nam bằng HPLC-UV

Dung dịch chuẩn	Nồng độ (mg/mL)							
	Bột sâm Việt Nam 20%				Trà hòa tan sâm Việt Nam			
	G-Rb ₁	G-Rd	G-Rg ₁	M-R2	G-Rb ₁	G-Rd	G-Rg ₁	M-R2
1	0,829	0,304	2,093	3,379	0,608	0,229	1,385	1,725
2	0,691	0,253	1,744	2,816	0,456	0,172	1,039	1,294
3	0,470	0,172	1,186	1,915	0,342	0,129	0,779	0,970
4	0,346	0,127	0,872	1,408	0,256	0,097	0,584	0,728
5	0,235	0,086	0,593	0,957	0,192	0,072	0,438	0,546
6	0,173	0,063	0,436	0,704	0,144	0,054	0,329	0,409

Độ lặp lại

Phương pháp: Chuẩn bị 6 mẫu thử theo quy trình chuẩn bị mẫu đã xây dựng. Tiến hành sắc ký từng mẫu, ghi nhận diện tích đỉnh và xác định kết quả hàm lượng các saponin quan tâm có trong các mẫu thử tính trên mẫu khô kiệt.

Yêu cầu: Giá trị độ lệch chuẩn tương đối (%RSD) của hàm lượng không được vượt quá 2,0%.

Độ đúng

Từ lượng mẫu thử (Bảng 4) xác định lượng chất chuẩn dự kiến cần thêm vào ứng với mức

80%, 100% và 120% lượng chất có sẵn trong mẫu thử. Dựa trên số liệu được trình bày tại Bảng 4, xác định tổng lượng chuẩn (mg) cần sử dụng cho 9 mẫu độ đúng để pha dung dịch mẹ. Sau đó thêm một thể tích chính xác dung dịch mẹ đã biết trước nồng độ vào mẫu thử sao cho phù hợp với lượng chuẩn dự kiến thêm vào.

Tại mỗi mức, thực hiện 3 mẫu độc lập, tổng cộng có 9 mẫu được tiêm vào hệ thống sắc ký trong cùng một điều kiện. Độ đúng (hay tỷ lệ phục hồi) được tính theo công thức:

$$\text{Tỷ lệ phục hồi (\%)} = \frac{\text{Lượng chất chuẩn tìm lại (mg)}}{\text{Lượng chất chuẩn thêm vào (mg)}} \times 100$$

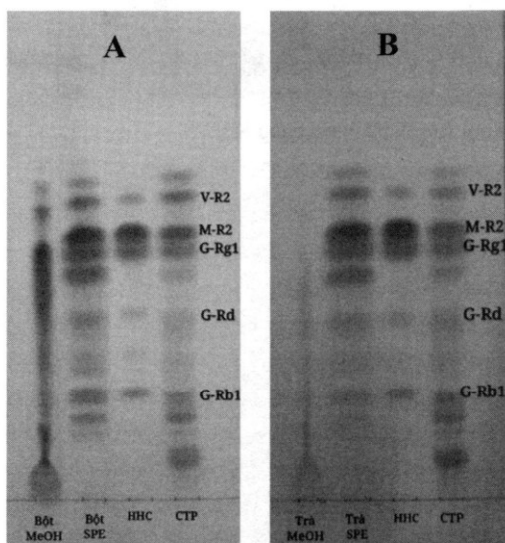
Yêu cầu: Tỷ lệ phục hồi nằm trong khoảng 98,0 - 102,0%.

Giới hạn phát hiện (LOD), giới hạn định lượng (LOQ)

Phương pháp: Xác định tỷ lệ tín hiệu trên nhiễu (S/N) được thực hiện bằng hệ thống HPLC. Xác định LOD là nồng độ tương ứng với S/N là 2-3, LOQ là nồng độ tương ứng với S/N là 10.

3. Kết quả

3.1. Áp dụng SPE trong định tính saponin bằng sắc ký lớp mỏng



Hình 1. Sắc ký đồ lớp mỏng so sánh dịch chiết MeOH của bột sâm Việt Nam 20% (A) và trà hòa tan sâm Việt Nam

(B) có qua xử lý và không qua xử lý SPE C18

A: Bột sâm Việt Nam 20%, B: Trà hòa tan sâm Việt Nam

Chú thích: HHC: hỗn hợp chuẩn V-R2, M-R2, G-Rg1, G-Rd, G-Rb1; CTP: cao toàn phần Sâm Việt Nam; Bột/ Trà MeOH: mẫu bột sâm Việt Nam 20% và trà hòa tan sâm Việt Nam được chiết bằng MeOH 100%; Bột/ Trà SPE: mẫu bột sâm Việt Nam 20% và trà hòa tan sâm Việt Nam được xử lý bằng SPE.

Kết quả SKLM đã chứng tỏ mẫu bột sâm Việt Nam 20% và mẫu trà hòa tan sâm Việt Nam được chiết bằng MeOH 100% không xử lý bằng SPE chứa nhiều tạp chất phân cực khiến mẫu bị kéo vệt trong quá trình sắc ký, không tách các vết nên không phát hiện được các saponin bằng SKLM trong điều kiện thực nghiệm. Ngược lại, các mẫu được xử lý bằng SPE đã loại được hầu hết các tạp phân cực, giữ lại toàn bộ saponin chính đặc trưng trong Sâm Việt Nam nên các vết saponin được

phân tách và phát hiện tốt hơn. Vì vậy, SPE rất hiệu quả và cần thiết cho việc xử lý mẫu định tính bằng SKLM.

3.2. Áp dụng SPE vào phân tích định lượng saponin trong các chế phẩm chứa sâm Việt Nam bằng HPLC-UV

3.2.1. Khảo sát điều kiện xử lý mẫu thử:

Bột sâm Việt Nam 20%

Bột sâm Việt Nam 20% (500 mg) được chiết xuất nhiều lần bằng siêu âm với nước, lần lượt chiết với 6, 6, 4 mL nước, mỗi lần siêu âm trong 20 phút, thu dịch chiết. Dịch thu được ở các lần chiết được triển khai SKLM, kết quả cho thấy dịch chiết lần 3 không còn vết saponin trên sắc ký đồ (Hình 2.A). Do đó, đến lần chiết thứ 3 với 4 mL nước đã chiết kiệt được saponin trong mẫu thử Bột sâm Việt Nam 20%.

Trà hòa tan sâm Việt Nam

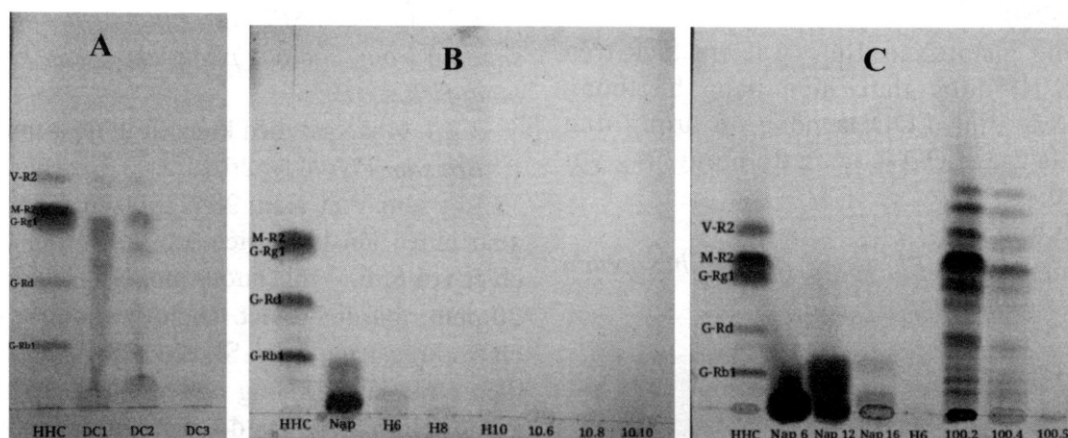
Trà hòa tan sâm Việt Nam (700 mg) được chiết xuất nhiều lần bằng siêu âm với nước, lần lượt chiết với 5, 4, 2 mL nước, mỗi lần siêu âm trong 20 phút, thu dịch chiết. Dịch thu được ở các lần chiết được triển khai SKLM, kết quả cho thấy dịch chiết lần 3 không còn vết saponin trên sắc ký đồ (Hình 3A). Do đó, đến lần chiết thứ 3 với 2 mL nước đã chiết kiệt được saponin trong mẫu thử trà hòa tan sâm Việt Nam.

3.2.2. Khảo sát điều kiện xử lý mẫu thử bằng phương pháp SPE của bột sâm Việt Nam 20% và trà hòa tan sâm Việt Nam:

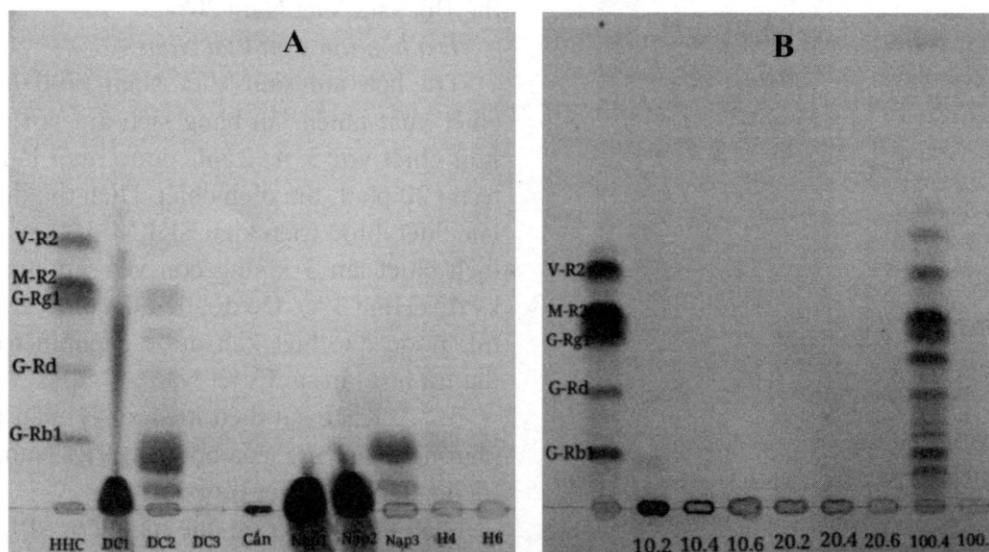
Mẫu thử được tinh chế bằng cột SPE pha đảo C18 để loại bỏ các tạp chất với tốc độ của quá trình nạp mẫu và rửa giải là 1 mL/phút. Các dịch chiết nước được nạp lên cột SPE đã được hoạt hóa bằng MeOH và cân bằng với nước. Quá trình loại tạp bằng SPE được khảo sát bằng SKLM. Cột được loại tạp lần lượt với nước cất, MeOH 10% và MeOH 20%, lần lượt từng 2 mL. Sau đó mẫu được rửa giải ra khỏi cột SPE 5 lần, mỗi lần với 1 mL MeOH chứa 1% acid formic. Dịch loại tạp và rửa giải được triển khai SKLM. Kết quả kiểm tra bằng SKLM (Hình 2B, Hình 3A và Hình 3B) cho thấy đối với mẫu bột sâm Việt Nam 20%, 6 mL nước cất loại tạp hiệu quả, còn mẫu trà hòa tan sâm Việt Nam được loại tạp với 6 mL nước cất và 4 mL MeOH 10% thì không còn xuất hiện vết tạp trên bản mỏng. Cột SPE tiếp đó được rửa giải 5 lần, mỗi lần với 1

mL MeOH chứa 1% acid formic, kết quả cho thấy ở cả mẫu bột sâm Việt Nam 20% và trà hòa tan sâm Việt Nam ở 5 mL MeOH không còn

xuất hiện vết saponin nữa (Hình 2C, Hình 3B), nên 4,8 mL MeOH đã được chọn để rửa giải các saponin.



Hình 2. Kết quả khảo sát quy trình xử lý mẫu bột sâm Việt Nam bằng SPE



Hình 3. Kết quả khảo sát quy trình xử lý mẫu trà hòa tan sâm Việt Nam bằng SPE

Chú thích: HHC: hỗn hợp chuẩn V-R2, M-R2, G-Rg1, G-Rd, G-Rb1; DC1-3: dịch chiết lần 1-3; Nap 1-3: dịch thu được sau quá trình nạp cột lần lượt của dịch chiết lần 1-3, H.4-H.10: 4-10 mL nước loại tạp, 10.2-10.10: 2-10 mL MeOH 10% loại tạp, 20.2-20.10: 2-10 mL MeOH 20% loại tạp, 100.1-100.5: 1-5 mL MeOH chứa 1% acid formic rửa giải.

Kết quả khảo sát SKLM đã chứng tỏ việc sử dụng SPE trong quá trình xử lý mẫu thử đã loại bỏ hữu hiệu tạp chất không phải saponin trong bột sâm Việt Nam 20% và trà hòa tan sâm Việt Nam. Điều này giúp loại bỏ ảnh hưởng của các tạp chất lên quá trình tách các chất và hạn chế sự tích tụ các tạp chất trên cột dẫn đến việc tăng áp suất khi phân tích liên tục nhiều mẫu thử trong thời gian dài. Tóm lại, phương pháp SPE khảo sát có ưu điểm rõ rệt trong việc loại tạp chất có trong nền mẫu phức tạp, làm sạch và làm giàu các

saponin quan tâm, giúp quá trình phân tích HPLC sau đó thuận lợi.

3.2.3. Thẩm định phương pháp định lượng các saponin trong bột sâm Việt Nam 20% và trà hòa tan sâm Việt Nam bằng HPLC-UV:

Tính tương thích hệ thống

Kết quả khảo sát tính tương thích hệ thống của phương pháp định lượng các saponin trong chế phẩm bột sâm Việt Nam 20% và trà hòa tan sâm Việt Nam bằng HPLC-UV được trình bày tại Bảng 2.

Bảng 2. Thông số sắc ký của các đỉnh tương ứng với G-Rb₁, G-Rd, G-Rg₁ và M-R2 trong phương pháp HPLC-UV

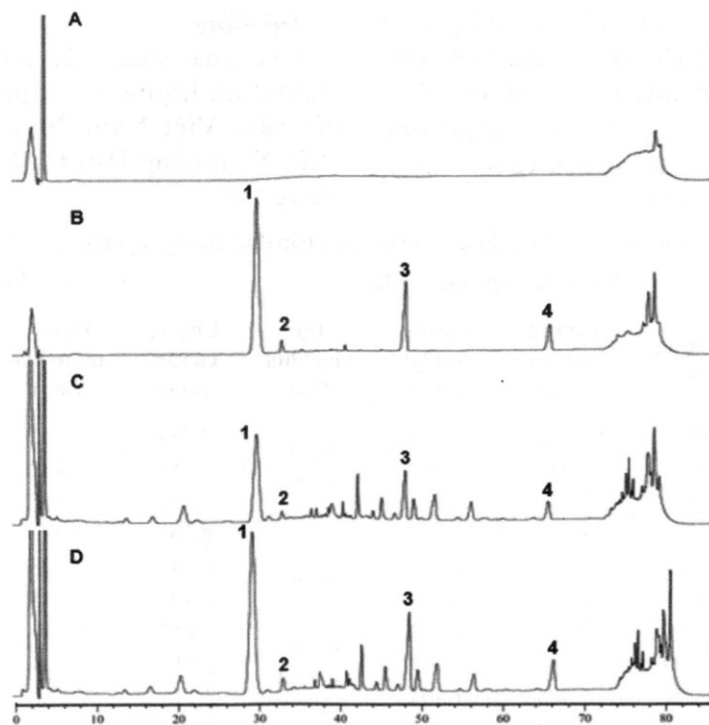
Saponin	Tóm tắt	t _R	S	N	A _s	R _s
Bột sâm Việt Nam 20%						
G-Rg ₁	TB	15,104	6641527	7643	0,963	3,318
	%RSD	0,83	0,62			
M-R2	TB	18,537	393183	6479	1,085	4,252
	%RSD	0,65	1,89			
G-Rb ₁	TB	37,994	1906435	189387	0,838	2,466
	%RSD	0,07	1,75			
G-Rd	TB	44,020	957546	385241	0,930	2,325
	%RSD	0,08	1,36			
Trà hòa tan sâm Việt Nam						
G-Rg ₁	TB	29,214	16154728	9931	0,976	2,501
	%RSD	1,34	0,43			
M-R2	TB	32,722	581637	63931	1,002	2,155
	%RSD	0,47	1,65			
G-Rb ₁	TB	47,759	4773677	89519	0,730	1,937
	%RSD	0,33	0,98			
G-Rd	TB	65,020	2132116	115895	0,842	2,151
	%RSD	0,34	0,38			

Kết quả: Các thông số về thời gian lưu, diện tích đỉnh của các đỉnh tương ứng với các saponin chính có %RSD của thời gian lưu (t_R) và diện tích đỉnh (S) ≤ 2%, hệ số kéo đuôi (A_s) 0,73-1,5, độ phân giải (R_s) ≥ 1,25, số đĩa lý thuyết (N) > 1000. Hệ thống HPLC-UV được sử dụng phù hợp để thực hiện quy trình định

lượng các saponin trong các chế phẩm sâm Việt Nam.

Tính đặc hiệu

Kết quả khảo sát tính đặc hiệu của phương pháp định lượng các saponin trong các chế phẩm bằng HPLC-UV được trình bày đại diện tại Hình 4.



Hình 4. Sắc ký đồ thể hiện tính đặc hiệu của phương pháp định lượng saponin trong trà hòa tan Sâm Việt Nam bằng HPLC-UV

A: mẫu trắng, B: mẫu chuẩn, C: mẫu thử, D: mẫu thử thêm chuẩn.

1: G-Rg₁, 2: M-R2, 3: G-Rb₁, 4: G-Rd

Kết quả: Thời gian lưu của các đỉnh ứng với các saponin trong mẫu chuẩn và mẫu thử tương đương nhau. Sắc ký đồ mẫu trắng không có tín hiệu trùng với thời gian lưu của các đỉnh quan tâm. Khi thêm chuẩn vào dung dịch thử, diện tích đỉnh của mẫu thử tăng lên so với trước khi thêm chuẩn. Do đó, phương pháp định lượng các saponin trong chế phẩm

bột sâm Việt Nam 20% và trà hòa tan sâm Việt Nam đạt tính đặc hiệu.

Tính tuyến tính, độ lặp lại, LOD, LOQ

Kết quả khảo sát tính tuyến tính, độ lặp lại, LOD, LOQ của phương pháp định lượng các saponin trong chế phẩm bột sâm Việt Nam 20% và trà hòa tan sâm Việt Nam bằng HPLC-UV được trình bày tại Bảng 3.

Bảng 3. Kết quả thẩm định tính tuyến tính, độ lặp lại, LOD và LOQ của phương pháp định lượng saponin bằng HPLC-UV

Saponin	Chỉ tiêu thẩm định				
	Phương trình hồi quy	Khoảng tuyến tính (mg/mL)	LOD (mg/mL)	LOQ (mg/mL)	Độ lặp lại (%RSD, n=6)
Bột sâm Việt Nam 20%					
G-Rg ₁	$y = 9904885 \times x + 953088$ $R^2 = 0,9982$	0,436 - 2,093	0,0057	0,0115	1,66%
M-R2	$y = 200308 \times x + 209304$ $R^2 = 0,9975$	0,704 - 3,379	0,3520	0,4787	1,45%
G-Rb ₁	$y = 8369058 \times x + 91784$ $R^2 = 0,9999$	0,173 - 0,829	0,0056	0,0113	1,29%
G-Rd	$y = 10142979 \times x + 43014$ $R^2 = 0,9997$	0,063 - 0,304	0,0049	0,0098	1,21%
Trà hòa tan sâm Việt Nam					
G-Rg ₁	$y = 16695541 \times x + 1065777$ $R^2 = 0,9984$	0,329-1,385	0,0004	0,0009	0,38%
M-R2	$y = 445268 \times x + 22741$ $R^2 = 0,9995$	0,409-1,725	0,0151	0,0315	0,64%
G-Rb ₁	$y = 10476334 \times x + 149315$ $R^2 = 0,9998$	0,144-0,608	0,0001	0,0003	0,30%
G-Rd	$y = 15623055 \times x + 82451$ $R^2 = 0,9998$	0,054-0,229	0,0003	0,0012	0,99%

Kết quả khảo sát cho thấy, phương pháp định lượng saponin trong các chế phẩm sâm Việt Nam bằng HPLC-UV có độ tuyến tính tốt với $R^2 > 0,995$, độ lặp lại với $RSD \leq 2\%$. Vì vậy phương pháp HPLC-UV đều đạt các chỉ tiêu về tính tuyến tính, độ lặp lại, LOD và LOQ.

Độ đúng

Kết quả khảo sát độ đúng của phương pháp định lượng các saponin trong chế phẩm bột sâm Việt Nam 20% và trà hòa tan sâm Việt Nam bằng HPLC-UV được trình bày tại Bảng 4.

Bảng 4. Kết quả thẩm định độ đúng của phương pháp định lượng saponin bằng HPLC-UV

Sản phẩm		Bột sâm Việt Nam 20%				Trà hòa tan sâm Việt Nam			
Saponin	Mức lượng thêm vào	Lượng (mg)	Lượng thêm vào (mg)	Lượng tìm lại (mg)	Độ phục hồi (%)	Lượng có sẵn (mg)	Lượng thêm vào (mg)	Lượng tìm lại (mg)	Độ phục hồi (%)
G-Rg ₁	80%	2,912	2,372	2,420	99,51-101,98	4,381	4,362	4,421	99,83-101,70
	100%	2,912	2,982	3,002		4,381	5,482	5,530	
	120%	2,912	3,527	3,574		4,381	5,895	5,949	
M-R2	80%	4,605	3,716	3,733	98,13-101,66	6,145	5,672	5,679	99,36-101,65
	100%	4,605	4,670	4,688		6,145	7,128	7,213	
	120%	4,605	5,523	5,559		6,145	7,665	7,740	
G-Rb ₁	80%	1,099	0,945	0,938	97,89-101,14	2,115	1,644	1,645	98,50-100,63
	100%	1,099	1,188	1,169		2,115	2,066	2,046	
	120%	1,099	1,405	1,404		2,115	2,221	2,218	
G-Rd	80%	0,479	0,352	0,354	98,43-101,88	0,639	0,591	0,587	98,04-101,35
	100%	0,479	0,442	0,443		0,639	0,742	0,747	
	120%	0,479	0,523	0,527		0,639	0,798	0,796	

Kết quả khảo sát cho thấy, độ phục hồi trong khoảng 98 - 102%. Vì vậy phương pháp HPLC-UV đều đạt các chỉ tiêu đánh giá và phù hợp để định lượng các saponin chính trong chế phẩm bột sâm Việt Nam 20% và trà hòa tan sâm Việt Nam.

Kết quả định lượng các saponin trong chế phẩm bột sâm Việt Nam 20% và trà hòa tan sâm Việt Nam bằng phương pháp HPLC-UV

Hàm lượng saponin trong chế phẩm bột sâm Việt Nam 20% và trà hòa tan sâm Việt Nam tính theo khối lượng chế phẩm khan được định lượng bằng HPLC-UV thể hiện tại Bảng 5.

Bảng 5. Kết quả định lượng saponin trong chế phẩm bột sâm Việt Nam 20% và trà hòa tan sâm Việt Nam bằng phương pháp HPLC-UV

Mẫu thử	Hàm lượng % (kl/kl) tính theo khối lượng chế phẩm khan							
	Bột sâm Việt Nam 20%				Trà hòa tan sâm Việt Nam			
	G-Rb ₁	G-Rd	G-Rg ₁	M-R2	G-Rb ₁	G-Rd	G-Rg ₁	M-R2
1	0,22	0,10	0,60	0,96	0,32	0,10	0,66	0,92
2	0,22	0,10	0,59	0,94	0,32	0,10	0,66	0,93
3	0,22	0,10	0,59	0,94	0,32	0,10	0,66	0,93
TB	0,22	0,10	0,59	0,95	0,32	0,10	0,66	0,93
Hàm lượng TBTC (%)	1,86				2,01			

Chú thích: Hàm lượng TBTC (%): Hàm lượng trung bình tổng cộng % (mg/mg).
Kl/kl: khối lượng/khối lượng.

Tổng hàm lượng 4 saponin G-Rb₁, G-Rd, G-Rg₁, M-R2 trong bột sâm Việt Nam 20% và trà hòa tan sâm Việt Nam định lượng bằng phương pháp HPLC-UV lần lượt là 1,86% và 2,01% tính theo khối lượng chế phẩm khan.

4. Bàn luận

Kỹ thuật SPE được áp dụng rộng rãi gần đây để xử lý các mẫu phân tích sắc ký, nhất là các mẫu sinh hóa và môi trường. Đối với saponin, Courthout và CS [9] đã áp dụng SPE C18 để xử lý mẫu định lượng các ginsenosid trong Nhân sâm và các chế phẩm bằng phương pháp đo mật độ vết trên SKLM (TLC chromatography densitometry). B. S. Sun và cs. [10] cũng dùng cột SPE C18 để xử lý mẫu định lượng cùng lúc 19 ginsenosid trong hắc sâm (black ginseng) bằng HPLC-ELSD. Với cùng phương pháp xử lý mẫu, H. Zhang và Y. Cheng [11] đã định lượng các saponin trong một chế phẩm bản quyền Trung Quốc có công thức chứa đan sâm và tam Thất bằng HPLC-MS... Như vậy, việc dùng SPE C18 trong xử lý mẫu định lượng đã giúp mang lại hiệu quả đối với việc kiểm nghiệm saponin trong các dược liệu thuộc chi *Panax* và chế phẩm của chúng. Kết quả đề tài nghiên cứu của chúng tôi trên các chế phẩm từ sâm Việt Nam cũng cho thấy việc xử lý mẫu bằng cột SPE C18 đã loại bớt tạp chất và làm giàu mẫu, giúp phát hiện saponin bằng SKLM và định lượng bằng HPLC-UV hiệu quả và ổn định, mặc dầu ngoài các saponin đặc trưng của sâm Việt Nam, các chế phẩm còn chứa các tá dược với tỷ lệ cao và tính

phân cực khác nhau. Với tính phổ biến và giá thành của SPE C18 hiện nay, chi phí kiểm nghiệm sẽ tăng không đáng kể so với lợi ích mang lại về tính hiệu quả, ổn định của quy trình phân tích, ngoài ra việc xử lý mẫu còn giúp bảo vệ cột sắc ký và hệ thống HPLC về lâu dài.

5. Kết luận

Đề tài đã tiến hành khảo sát và xây dựng quy trình xử lý mẫu thử bằng SPE đối với chế phẩm sâm Việt Nam gồm bột cao sâm Việt Nam chứa 20% cao lỏng và trà hòa tan sâm Việt Nam. Kết quả cho thấy, các mẫu được xử lý bằng SPE C18 đã được loại hầu hết các tạp phân cực chủ yếu là các tá dược phân cực hiện diện với tỷ lệ cao trong công thức, giúp quá trình phân tích định tính saponin bằng SKLM và định lượng saponin bằng HPLC-UV chính xác, thuận lợi, đồng thời về lâu dài giúp duy trì tuổi thọ và hiệu suất phân tích của cột sắc ký. Quy trình sử dụng SPE C18 trong định lượng 4 saponin chủ yếu trong sâm Việt Nam gồm G-Rg₁, M-R2, G-Rb₁, G-Rd trong 2 chế phẩm Sâm Việt Nam đơn giản trong áp dụng và đạt các tiêu chí yêu cầu về tính tương thích hệ thống, độ đặc hiệu, tính tuyến tính, độ lặp lại và độ đúng. Tổng hàm lượng 4 saponin trong chế phẩm bột cao sâm Việt Nam 20% và trà hòa tan sâm Việt Nam lần lượt là 1,86% và 2,01% tính theo khối lượng chế phẩm khan, giúp xây dựng chỉ tiêu định lượng trong TCCS cho các chế phẩm từ Sâm Việt Nam nói trên. Việc ứng dụng SPE C18 để xử lý mẫu thử có thể nghiên cứu mở rộng áp dụng hiệu quả vào quy trình định tính và

định lượng saponin trong các sản phẩm khác từ sâm Việt Nam nói riêng, cũng như các sản phẩm sâm thuộc chi *Panax* khác.

Lời cảm ơn: Các tác giả chân thành cảm ơn Sở Khoa học và Công nghệ thành phố Hồ Chí Minh đã tài trợ cho đề tài nghiên cứu này.

Tài liệu tham khảo

1. Nguyen Minh Duc, Nguyen Thoi Nham, Ryoji Kasai, Aiko Ito, Kazuo Yamasaki, and Osamu Tanaka (1993), Saponins from Vietnamese ginseng, *Panax vietnamensis* Ha et Grushv. Collected in central Vietnam. I. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, (Tokyo). 41(11), 2010-4.
2. Nguyen Minh Duc, Nguyen Thoi Nham, Ryoji Kasai, Aiko Ito, Kazuo Yamasaki, and Osamu Tanaka (1994), Saponins from Vietnamese Ginseng, *Panax vietnamensis* HA et Grushv. Collected in central Vietnam. II. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* (Tokyo). 42(1), 115-22.
3. Nguyen Minh Duc, Nguyen Thoi Nham, Ryoji Kasai, Aiko Ito, Kazuo Yamasaki, and Osamu Tanaka (1994), Saponins from Vietnamese ginseng, *Panax vietnamensis* Ha et Grushv. collected in central Vietnam. III. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* (Tokyo), 42(3), 634-40.
4. Konoshima T., Takasaki M., Tokuda H., Nishino H., Nguyen Minh Duc, Kasai R., Yamasaki K. (1998), Anti-tumor-promoting activity of majonoside-R2 from Vietnamese ginseng, *Panax vietnamensis* Ha et Grushv. (I). *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 21(8), 834-8.
5. Le Thi Hong Van, Seo Young Lee, Tae Ryong Kim, Jae Young Kim, Sung Won Kwon, Nguyen Ngoc Khoi, Jeong Hill Park, and Nguyen Minh Duc (2014), Processed Vietnamese ginseng: Preliminary results in chemistry and biological activity. *Journal of Ginseng Research*, 38(2), 154-9.
6. Bộ Y tế (2017), *Dược điển Việt Nam V*. Tập 2, NXB Y học, 1313-1314, PL-147.
7. *Validation of analytical procedures: Text and methodology Q2(R1)*. 2005.
8. Bộ Y tế, *Sổ tay Hướng dẫn Đăng ký thuốc*. Phụ lục 8. Các phương pháp thẩm định. 2013.
9. Corthout J., Naessens T., Apers S., Vlietinck A. J. (1999), Quantitative determination of ginsenosides from *Panax ginseng* roots and ginseng preparations by thin layer chromatography--densitometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 21(1) 187-92.
10. Sun B. S., Gu L. J., Fang Z. M., Wang C. Y., Wang Z., Lee M. R., Li Z., Li J. J., Sung C. K. (2009), Simultaneous quantification of 19 ginsenosides in black ginseng developed from *Panax ginseng* by HPLC-ELSD. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 50(1), 15-22.
11. Zhang H., Cheng Y. (2006), Solid-phase extraction and liquid chromatography-electrospray mass spectrometric analysis of saponins in a Chinese patent medicine of formulated *Salvia miltiorrhizae* and *Panax notoginseng*. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 40(2), 429-32.

Tạp chí Dược liệu, tập 27, số 3/2022 (Trang 166 - 172)

ĐẶC ĐIỂM THỰC VẬT VÀ XÂY DỰNG TIÊU CHUẨN CƠ SỞ DƯỢC LIỆU RAU ĐẮNG BIỂN TẠI VIỆT NAM

Hoàng Đức Mạnh¹*, Đào Anh Hoàng¹, Nguyễn Thị Phương¹, Phan Văn Trường¹,
Vũ Thị Diệp¹, Phan Thị Trang¹, Trần Minh Ngọc²

¹Viện Dược liệu; ²Cục Quản lý Y Dược cổ truyền - Bộ Y tế

*Email: manhhd@gmail.com

(Nhận bài ngày 17 tháng 6 năm 2022)

Tóm tắt

Cây rau đắng biển được sử dụng để điều trị nhiều bệnh khác nhau, nhưng đặc biệt được biết đến về tác dụng cải thiện trí nhớ. Dược điển Anh và Mỹ đều đã có chuyên luận về rau đắng biển, trong đó mô tả chi tiết về hình thái, vi học và các tiêu chí về độ ẩm, độ tro, định tính, định lượng nhóm hoạt chất bacosid. Áp dụng phương pháp hình thái, vi học và các dữ liệu về hình thái, đặc điểm vi học bột dược liệu rau đắng biển (*Bacopa monnieri* L.) đã được mô tả. Dựa theo các tiêu chuẩn của Dược điển Mỹ về chuyên luận rau đắng biển, đã thực hiện xây dựng tiêu chuẩn cơ sở cho dược liệu rau đắng biển thu tại Việt Nam để làm cơ sở cho việc xác định tiêu chuẩn nguyên liệu sản xuất các sản phẩm cải thiện trí nhớ.

Từ khóa: Rau đắng biển, *Bacopa monnieri*, Bacosid, Cải thiện trí nhớ.

Summary

Botanical Characteristics and Standardization Development of *Bacopa monnieri* L. in Vietnam

Bacopa monnieri L. is used to treat a variety of diseases but is especially known for its memory-improving effects. Both British Pharmacopoeia and the American Pharmacopoeia have monographs on *Bacopa monnieri* L., which describe in detail the morphology, microscopic anatomy and criteria of moisture, ash, qualitative and quantitative analysis of group of active ingredients as "bacosides". Applying morphological and microscopic anatomy methods and the morphological and microscopic anatomy data, the powder of *Bacopa monnieri* L. has been described. Based on the standards of the American Pharmacopoeia on the monograph of *Bacopa monnieri* L., a basic standard has been developed for Vietnam's *Bacopa monnieri* L. to serve as a basis for determining the quality of raw materials to produce products such as memory improvement products.

Keywords: *Bacopa monnieri*, Bacosides, Memory-improving effects.