

XÂY DỰNG QUY TRÌNH ĐỊNH LƯỢNG ĐỒNG THỜI G-RG₁, G-RB₁ VÀ M-R2 TRONG CAO KHÔ SÂM VIỆT NAM BẰNG KỸ THUẬT HPLC/DAD

• TRẦN THỊ THU VÂN

TÓM TẮT:

Nghiên cứu nhằm xây dựng quy trình định lượng, đồng thời ginsenosid-Rg₁, ginsenosid-Rb₁ và majonosid-R2 trong cao khô sâm Việt Nam (SVN) bằng kỹ thuật HPLC/DAD. Điều kiện sắc ký: cột Zorbax Eclipse Plus-C18 (150 × 4,6 mm; 5 μm), thể tích tiêm mẫu 20 μl, tốc độ dòng 1 ml/phút, nhiệt độ cột 30°C, bước sóng phát hiện 196 nm, chương trình rửa giải gradient gồm acetonitril và nước. Quy trình đã được thẩm định và đạt các yêu cầu của ICH, bao gồm tính tương thích hệ thống, tính tuyến tính, độ đặc hiệu, độ lặp lại, độ chính xác trung gian, độ đúng, giới hạn phát hiện và giới hạn định lượng. Kết quả nghiên cứu cho thấy có thể ứng dụng quy trình này để kiểm tra chất lượng cao khô SVN tại cơ sở.

Từ khóa: sâm Việt Nam, định lượng đồng thời, HPLC.

1. Đặt vấn đề

Sâm là cây thuốc quý và đặc hữu của Việt Nam. Cho đến nay, rất nhiều công trình nghiên cứu của các nhà khoa học Việt Nam và Nhật Bản đã cho thấy Sâm Việt Nam (SVN) là một loài sâm quý có thể so sánh với Nhân sâm, Sâm Hoa Kỳ và Tam thất về thành phần hóa học và tác dụng dược lý. Thành phần hóa học của SVN rất đa dạng, trong đó các hợp chất saponin được xem là thành phần quan trọng, tiêu biểu nhất đưa đến các tác dụng dược lý của SVN như tác dụng bồi bổ, gia tăng chuyển hóa, tăng lực chống nhược sức, sinh thích nghi, chống khối u, giảm stress,... [1-6]

Hiện nay, các sản phẩm từ SVN trên thị trường hết sức đa dạng như cao lỏng, cao khô, viên ngậm, viên nang mềm, rượu sâm, hồng sâm Việt Nam,... Trong đó, cao khô SVN có thể xem là thành phẩm hoặc bán thành phẩm để sản xuất các chế phẩm khác. Tuy nhiên, Dược điển Việt Nam 5 vẫn chưa có chuyên luận về cao khô SVN nói chung cũng như phương pháp định lượng cho cao khô SVN nói riêng. Do vậy, đề tài hướng đến xây dựng và thẩm định quy trình định lượng đồng thời ginsenosid-Rg₁ (G-Rg₁), ginsenosid-Rb₁ (G-Rb₁) và majonosid-R2 (M-R2) trong cao khô SVN bằng sắc ký lỏng, hiệu năng cao. Qua đó, giúp kiểm soát chất lượng của cao khô SVN.

2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

2.1. Đối tượng và dung môi, hóa chất

Cao khô SVN được chiết xuất theo các quy trình chiết chuyên biệt đã được công bố [7,8].

Chất đối chiếu M-R2 (hàm lượng 98,86%, số lô Majo.Ref.012012), G-Rg₁ (hàm lượng 96,43%, số lô GRg1.Ref.012011), G-Rb₁ (hàm lượng 99,17%, số lô GRb1.Ref.012011).

Methanol, acetonitril loại dùng cho HPLC của Merck.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Trên cơ sở các nghiên cứu trước đây [5,6,9] và thực hiện một số điều chỉnh trong chương trình rửa giải gradient nhằm tách được đồng thời các saponin quan trọng (G-Rg₁, M-R2, G-Rb₁) và rút ngắn thời gian phân tích bằng HPLC.

Chuẩn bị mẫu

- Mẫu thử: Cân chính xác khoảng 40 mg cao khô SVN, cho vào bình định mức 10 ml, thêm khoảng 5 ml methanol 70%, siêu âm 10 phút, để yên trong 10 phút, thêm dung môi vừa đủ 10 ml, lắc đều, lọc qua màng lọc 0,45 μ m.

- Mẫu chuẩn: Pha hỗn hợp các chuẩn G-Rg₁, M-R2, G-Rb₁ trong methanol 70% để được dung dịch chuẩn có nồng độ lần lượt 0,3 mg/ml; 0,5 mg/ml; 0,1 mg/ml.

- Mẫu trắng: Hỗn hợp dung môi methanol - nước (70:30).

Điều kiện sắc ký:

Hệ thống sắc ký lỏng hiệu năng cao Agilent Infinity 1260 (Mỹ) với đầu dò DAD; cột Zorbax Eclipse Plus-C18 (150 $\times$ 4,6 mm; 5 μ m); thể tích tiêm mẫu: 20 μ l; tốc độ dòng: 1 ml/phút; nhiệt độ cột: 30°C; bước sóng phát hiện: 196 nm.

Pha động: Acetonitril - nước (Chương trình Gradient)

Thời gian phút	Acetonitril (%)	Nước (%)
0 – 15	19,5 $\rightarrow$ 30	80,5 $\rightarrow$ 70
15 – 35	30 $\rightarrow$ 40	70 $\rightarrow$ 60
35 – 40	40 $\rightarrow$ 95	60 $\rightarrow$ 5
40 – 55	95	5
55 – 56	95 $\rightarrow$ 19,5	5 $\rightarrow$ 80,5
56 – 66	19,5	80,5

Hàm lượng G-Rg₁, M-R2, G-Rb₁ được tính theo công thức:

$$\text{Hàm lượng (\%)} = \frac{S_t \times C_c \times a \times 1000}{S_c \times M \times (1-h)} \quad (1)$$

Trong đó:

S_t: Diện tích đỉnh của mẫu thử (mAU $\times$ s).

S_c: Diện tích đỉnh của mẫu chuẩn (mAU $\times$ s).

C_c: Nồng độ chất chuẩn (mg/ml).

a: Độ tinh khiết chất chuẩn.

m: Khối lượng mẫu thử (mg).

h: Độ ẩm của cao.

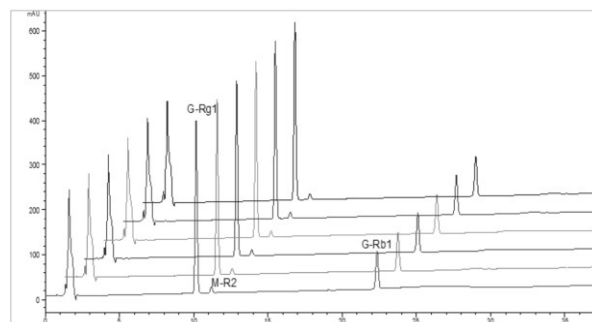
Tiến hành thẩm định quy trình định lượng theo hướng dẫn của ICH với các chỉ tiêu: Tính thích hợp của hệ thống, độ đặc hiệu, tính tuyến tính, độ chính xác, độ đúng, giới hạn phát hiện và giới hạn định lượng [10].

3. Kết quả nghiên cứu

3.1. Tính thích hợp của hệ thống

Tiến hành sắc ký mẫu chuẩn 6 lần liên tiếp. Kết quả được thể hiện trong Bảng 1 và Hình 1, cho thấy giá trị RSD của các thông số sắc ký (thời gian lưu, diện tích đỉnh, số đĩa lý thuyết) đều $\leq$ 2,0%, hệ số bất đối (As) nằm trong khoảng 0,8-1,5, nên quy trình định lượng đạt tính thích hợp của hệ thống.

Hình 1. Sắc ký đồ mẫu chuẩn với 6 lần tiêm liên tiếp



Bảng 1. Kết quả xác định tính thích hợp của hệ thống phương pháp định lượng

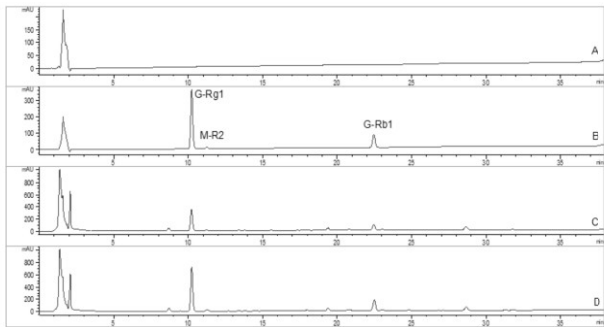
Saponin	tR (phút)	S	(mAU $\times$ s)	As	N
G-Rg ₁	TB	10,288	3540,08	0,898	27909
	RSD (%)	0,38	1,12	1,85	1,91
M-R2	TB	11,313	128,40	0,895	29481
	RSD (%)	0,33	0,87	1,84	1,79
G-Rb ₁	TB	22,556	978,44	1,072	83715
	RSD (%)	0,18	1,73	1,36	1,99

3.2. Độ đặc hiệu/chọn lọc

Tiến hành sắc ký mẫu thử, mẫu chuẩn và mẫu thử thêm chuẩn. Kết quả cho thấy, sắc ký đồ mẫu trắng không xuất hiện pic ở khoảng thời gian lưu tương ứng với thời gian lưu của chất chuẩn, sắc ký đồ mẫu thử cho các pic có thời gian lưu tương tự với các pic

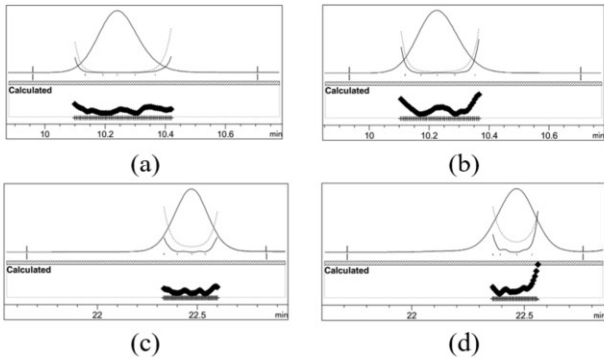
của chất chuẩn trong sắc ký đồ mẫu chuẩn, chiều cao và diện tích pic của các chất cần định lượng trong mẫu thử thêm chuẩn cao hơn trong mẫu thử, pic của hoạt chất cần phân tích trong sắc ký đồ mẫu chuẩn và mẫu thử đều tinh khiết (Hình 2, 3 và Bảng 2). Như vậy, quy trình có tính chọn lọc.

Hình 2: Sắc ký đồ HPLC thể hiện độ đặc hiệu



A. Mẫu trắng; B. Mẫu chuẩn; C. Mẫu thử; D. Mẫu thử thêm chuẩn

Hình 3. Biểu đồ minh họa độ tinh khiết pic G-Rg₁ và G-Rb₁ trong mẫu chuẩn (a), (c) và mẫu thử (b), (d)



Bảng 2. Thông số sắc ký của mẫu chuẩn, mẫu thử và mẫu thử thêm chuẩn

Saponin	Mẫu	Thời gian lưu (phút)	Diện tích pic (mAU×s)
G-Rg ₁	Chuẩn	10,243	3575,9
	Thử	10,228	3344,1
	Thử thêm chuẩn	10,244	7032,7
M-R2	Chuẩn	11,256	126,8
	Thử	11,250	111,0
	Thử thêm chuẩn	11,268	250,8
G-Rb ₁	Chuẩn	22,472	992,2
	Thử	22,465	1171,6
	Thử thêm chuẩn	22,503	2192,4

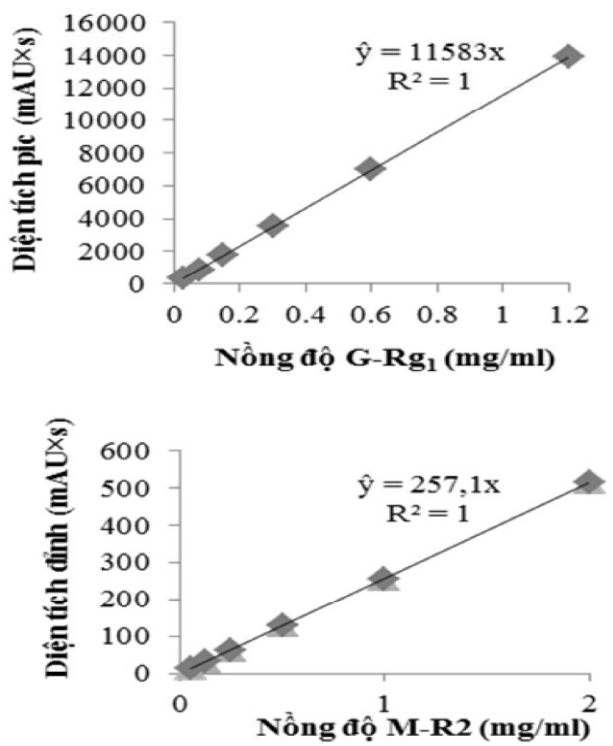
3.3. Tính tuyến tính - khoảng xác định

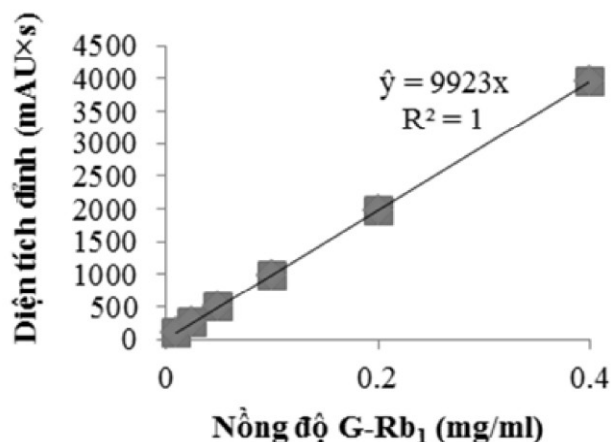
Kết quả sau khi tiến hành sắc ký các dung dịch hỗn hợp chuẩn (G-Rg₁, M-R2 và G-Rb₁) với các nồng độ khác nhau được trình bày trong Bảng 3. Kiểm tra tính thích hợp của các phương trình hồi quy bằng trắc nghiệm F đều cho giá trị $F > F_{0,05}$, chứng tỏ có sự tương quan tuyến tính giữa nồng độ các chất chuẩn và diện tích pic thu được trên sắc ký đồ ($R^2 = 1$). Trắc nghiệm T cho thấy, các hệ số a có ý nghĩa, các hệ số b đều không có ý nghĩa thống kê.

Bảng 3. Diện tích đỉnh tương ứng với các nồng độ dung dịch chuẩn khác nhau.

G-Rg ₁		M-R ₂		G-Rb ₁	
Nồng độ (mg/ml)	Diện tích đỉnh	Nồng độ (mg/ml)	Diện tích đỉnh	Nồng độ (mg/ml)	Diện tích đỉnh
0,030	352,0	0,050	13,3	0,010	97,6
0,075	880,1	0,125	31,4	0,025	243,7
0,150	1748,9	0,250	62,1	0,050	486,9
0,300	3507,0	0,500	126,6	0,100	976,6
0,600	7022,8	1,000	255,6	0,200	1958,4
1,200	13894,3	2,000	513,7	0,400	3969,1

Hình 4. Đường biểu diễn mối tương quan tuyến tính giữa nồng độ và diện tích pic của G-Rg₁, M-R2, G-Rb₁





Bảng 4. Phương trình hồi quy và hệ số tương quan giữa nồng độ và diện tích đỉnh

Saponin	Phương trình hồi quy	R ²	Khoảng xác định (mg/ml)
G-Rg1	$\hat{y} = 11583x$	1	0,03-1,20
M-R2	$\hat{y} = 257,1x$	1	0,05-2,00
G-Rb1	$\hat{y} = 9923x$	1	0,01-0,40

3.4. Độ lặp lại và độ chính xác trung gian

Thực hiện quy trình định lượng với 2 kiểm nghiệm viên khác nhau và ở 2 ngày làm việc khác nhau, mỗi người chuẩn bị 6 mẫu thử riêng biệt. Kết quả xác định độ lặp lại và độ chính xác trung gian của phương pháp định lượng được trình bày ở Bảng 5.

Bảng 5. Kết quả xác định độ lặp lại và độ chính xác trung gian của phương pháp định lượng

Hàm lượng G-Rg ₁ trong 1 mg cao (%)			
STT	Người 1, ngày 1	Người 2, ngày 2	Kết quả thống kê
1	7,47	7,56	Trung bình: 7,47% RSD: 0,66% ANOVA 1 yếu tố: p = 0,12
2	7,41	7,53	
3	7,48	7,51	
4	7,50	7,41	
5	7,45	7,50	
6	7,40	7,47	
Trung bình	7,45	7,50	
RSD (%)	0,53	0,70	

Hàm lượng M-R2 trong 1 mg cao (%)			
1	11,56	11,55	Trung bình: 11,57% RSD: 1,36% ANOVA 1 yếu tố: p = 0,09
2	11,61	11,77	
3	11,61	11,66	
4	11,57	11,52	
5	11,42	11,74	
6	11,27	11,58	
Trung bình	11,51	11,64	
RSD (%)	1,18	0,89	
Hàm lượng G-Rb ₁ trong 1 mg cao (%)			
1	3,12	3,15	Trung bình: 3,12% RSD: 1,03% ANOVA 1 yếu tố: p = 0,68
2	3,10	3,20	
3	3,13	3,12	
4	3,13	3,07	
5	3,13	3,11	
6	3,09	3,10	
Trung bình	3,12	3,13	
RSD (%)	0,60	1,39	

Giá trị RSD (%) kết quả định lượng hàm lượng các hoạt chất có trong các mẫu $\leq 2,0\%$. Bên cạnh đó, kết quả phân tích ANOVA cho thấy, hàm lượng của các chất phân tích thu được từ 2 kiểm nghiệm viên khác nhau không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$). Vậy, quy trình định lượng đạt yêu cầu về độ lặp lại và độ chính xác trung gian.

3.5. Độ đúng

Tiến hành sắc ký 9 mẫu thử thêm chuẩn ở 3 mức nồng độ 80%, 100% và 120% so với mức nồng độ định lượng của G-Rg₁, M-R2 và G-Rb₁ trong cao SVN. Mỗi mức nồng độ chuẩn bị 3 mẫu. Mỗi mẫu tiến hành sắc ký 1 lần. Kết quả xác định độ đúng của phương pháp định lượng được trình bày trong Bảng 6.

Tỷ lệ thu hồi trong khoảng 97,34-102,83%, $RSD \leq 2\%$. Vậy, quy trình định lượng đạt yêu cầu về độ đúng.

3.6. Giới hạn định lượng - giới hạn phát hiện

Giới hạn định lượng và giới hạn phát hiện của G-Rg₁, M-R2 và G-Rb₁ được trình bày trong Bảng 7.

Kết luận: Quy trình định lượng đạt các yêu cầu về tính tương thích hệ thống, tính đặc hiệu, tính tuyến tính, độ lặp lại và độ đúng. Do đó, có thể áp dụng quy trình này để định lượng đồng thời G-Rg₁, M-R2 và G-Rb₁ trong cao SVN.

Bảng 6. Kết quả xác định độ đúng của phương pháp định lượng

Mẫu	STT	Tỷ lệ phục hồi G-Rg ₁ (%)	Kết quả thống kê	Tỷ lệ phục hồi M-R2 (%)	Kết quả thống kê	Tỷ lệ phục hồi G-Rb ₁ (%)	Kết quả thống kê
80%	1	100,02	TB =	97,34	TB =	98,52	TB =
	2	101,97	101,53%	102,36	100,84%	100,09	100,44%
	3	102,60	RSD = 1,32%	102,83	RSD = 3,02%	102,71	RSD = 2,11%
100%	1	101,18	TB =	99,70	TB =	100,00	TB = 99,53% RSD = 0,70%
	2	98,73	100,34%	100,22	100,75%	98,72	
	3	101,10	RSD = 1,39%	102,32	RSD = 1,39%	99,86	
120%	1	101,96	TB =	101,67	TB =	100,26	TB =
	2	101,62	101,76%	102,48	102,04%	100,54	100,37%
	3	101,70	RSD = 0,17%	101,98	RSD = 0,40%	100,30	RSD = 0,15%
		Tỷ lệ thu hồi TB: 101,21% RSD: 1,62%		Tỷ lệ thu hồi TB: 101,21% RSD: 1,77%		Tỷ lệ thu hồi TB: 100,11% RSD: 1,20%	

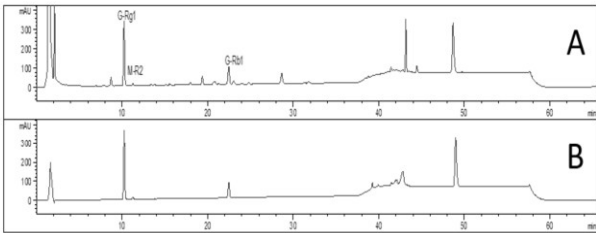
Bảng 7. Giới hạn định lượng - giới hạn phát hiện của phương pháp

Saponin	Giới hạn phát hiện (mg/ml)	Giới hạn định lượng (mg/ml)
G-Rg ₁	0,0006	0,0018
M-R2	0,013	0,04
G-Rb ₁	0,0002	0,0008

3.7. Ứng dụng quy trình phân tích trên các mẫu cao khô SVN

Áp dụng quy trình định lượng đã xây dựng và thẩm định để định lượng một số mẫu cao SVN được chiết xuất theo các quy trình chiết chuyên biệt: Cao A được chiết theo phương pháp ngâm kiệt [8] và cao B được chiết theo phương pháp hồi lưu có khuấy [7]. Kết quả hàm lượng phần trăm G-Rg₁, M-R2, G-Rb₁ trong cao SVN được tóm tắt trong Bảng 8.

Hình 5. Sắc ký đồ HPLC cao Sâm Việt Nam
A. Cao SVN; B. Mẫu chuẩn



4. Thảo luận

Cho đến nay, các công trình nghiên cứu đã chứng minh trong thân rễ và rễ củ SVN có 52 hợp chất saponin. Hầu hết các saponin chính trong SVN thuộc nhóm dammaran với 3 cấu trúc chính: Các

saponin dẫn chất của 20(S)-protopanaxadiol (G-Rb₁, G-Rb₃, G-Rd,...), các saponin dẫn chất của 20(S)-protopanaxatriol (G-Re, G-Rg₁,...) và các saponin có cấu trúc ocotillol (M-R1, M-R2,...) [1-3]. Do vậy, nghiên cứu này hướng đến mục tiêu có thể định lượng đồng thời các saponin quan trọng có hàm lượng cao nhất trong cao SVN với nhiều tác dụng được lý đã được ghi nhận, đại diện cho 3 nhóm cấu trúc trên là G-Rb₁, G-Rg₁, M-R2. Quy trình định lượng bằng HPLC với đầu dò DAD với tính khả thi cao, phù hợp với điều kiện trang thiết bị hiện có của các cơ sở sản xuất và các phòng thí nghiệm tại Việt Nam. Do cấu trúc của M-R2 không có các nối đôi liên hợp nên khả năng hấp thụ UV kém. Do vậy, cường độ hấp thụ tại bước sóng 196 nm không tương quan với hàm lượng vốn có của hợp chất này trong cao chiết. Tuy nhiên, việc lựa chọn bước sóng 196 nm giúp phát hiện đồng thời các saponin trong cao SVN mà không cần phải sử dụng cùng lúc nhiều đầu dò khác nhau. Ngoài ra, khi xét về thời gian phân tích, quy trình định lượng các saponin trong SVN do Bùi Thế Vinh và cộng sự xây dựng cần thời gian phân tích là 100 phút [9]; còn ở nghiên cứu này, quy trình phân tích đã được rút ngắn chỉ còn 66 phút.

Bảng 8. Hàm lượng G-Rg1, M-R2, G-Rb1 trong các mẫu cao Sâm Việt Nam

Mẫu	Lô	Hàm lượng (%) của các saponin		
		G-Rg1	M-R2	G-Rb1
Cao A	1	7,45	11,47	3,12
	2	7,50	11,29	2,09
	3	7,73	10,82	2,11
	TB	7,61±0,21	11,18±0,49	2,43±0,6
Cao B	1	6,67	10,96	2,01
	2	6,86	11,10	2,10
	3	6,88	10,96	2,05
	TB	6,8±0,12	11,01±0,08	2,05±0,05

5. Kết luận

Quy trình định lượng đồng thời 3 saponin chính trong cao khô SVN là G-Rb₁, G-Rg₁ và M-R2 cũng là 3 saponin đại diện cho 3 nhóm protopanaxadiol, protopanaxatriol và ocotillol, bằng HPLC ở bước sóng 196 nm với thời gian lưu của G-Rg₁, M-R2 và

G-Rb₁ lần lượt khoảng 10,3 phút, 11,3 phút và 22,5 phút và tổng thời gian phân tích được rút ngắn còn 66 phút. Quy trình đạt tính tương thích hệ thống, tính đặc hiệu, tính tuyến tính, độ chính xác và độ đúng, có thể áp dụng để định lượng các mẫu cao SVN và hỗ trợ công tác kiểm tra chất lượng cao khô SVN■

TÀI LIỆU THAM KHẢO:

1. Nguyễn Thượng Dong, Trần Công Luận, Nguyễn Thị Thu Hương (2007). Sâm Việt Nam và một số cây thuốc thuộc họ Nhân sâm. Nhà Xuất bản Khoa học Kỹ thuật, Hà Nội.
2. Thanh, N. T., Van, T. T. H., Hung, L. V., et al (2023). Bioactive Compounds and Biological Activities of Vietnamese Ginseng (*Panax vietnamensis* Ha et Grushv.). Bioactive Compounds in the Storage Organs of Plants, 1-25.
3. Yamasaki, K. (2000). Bioactive saponins in Vietnamese ginseng, *Panax vietnamensis*. Pharmaceutical biology, 38(sup1), 16-24.
4. Tran Q. L., Adnyana I. K., Tezuka Y., et al (2001). Triterpene Saponins from Vietnamese ginseng (*Panax vietnamensis*) and Their Hepatocyto Protective Activity. J. Nat. Prod., 64(4), 456-461.
5. Le T. H. V., Lee G. J., Vu H. K. L., et al (2015). Ginseng Saponins in Different Parts of *Panax vietnamensis*. Chemical and Pharmaceutical Bulletin, 63(11), 950-954.
6. K. L. Vu-Huynh, H. T. Nguyen, T. H. Van Le, et al (2020). Accumulation of saponins in underground parts of *Panax vietnamensis* at different ages analyzed by HPLC-UV/ELSD. Molecules, 25 (13), 3086.
7. Trần Thị Thu Vân, Nguyễn Đức Hạnh, Đỗ Quang Dương, Nguyễn Minh Đức (2019). Tối ưu hóa điều kiện chiết xuất Sâm Việt Nam. Y học TP. Hồ Chí Minh, tập 23 (Số 2), 242 - 248.
8. Trần Thị Thu Vân, Nguyễn Minh Đức (2023). Bước đầu xây dựng tiêu chuẩn cơ sở cho cao Sâm Việt Nam trồng. Tạp chí Khoa học Lạc Hồng, 1(15), 71-77.
9. Bùi Thế Vinh và Trần Công Luận (2011). Xây dựng phương pháp định lượng G-Rb₁, G-Rg₁ và MR2 trong Sâm Việt Nam bằng kỹ thuật sắc ký lỏng hiệu năng cao. Tạp chí Dược liệu, 16(1+2), 44-50.
10. Huber L. (2007). Validation and qualification in analytical laboratories (Second edition). Informa Healthcare USA, Inc., New York, pp. 144-146.

Ngày nhận bài: 10/4/2024

Ngày phản biện đánh giá và sửa chữa: 25/4/2024

Ngày chấp nhận đăng bài: 12/5/2024

Thông tin tác giả:

TRẦN THỊ THU VÂN

Trường Đại học Lạc Hồng

DEVELOPMENT OF A HPLC/DAD METHOD FOR SIMULTANEOUS QUANTIFICATION OF G-RG₁, G-RB₁ AND M-R2 IN VIETNAMESE GINSENG DRIED EXTRACTS

● **TRAN THI THU VAN**

Lac Hong University

ABSTRACT:

This study aimed to develop a method for simultaneous determination of ginsenoside-Rg₁, ginsenoside-Rb₁, and majonoside-R2 in VG dried extracts by the high performance liquid chromatography (HPLC) with a diode array detector (DAD). The HPLC conditions: Zorbax Eclipse Plus-C18 column (150 × 4.6 mm; 5 μm), a sample injection volume of 20 μl, a flow rate of 1 ml/min, a column temperature of 30 oC, a wavelength detection of 196 nm, gradient elution of acetonitrile and water. The procedure has been validated and achieved for system compatibility, linearity, specificity, repeatability, intermediate precision, accuracy, limit of detection, and limit of quantitation, according to ICH guidelines. Further, this method can be applied to the quality inspection of VG dried extracts.

Keyword: Vietnamese ginseng, simultaneously quantify, HPLC