



(12) **BẢN MÔ TẢ GIẢI PHÁP HỮU ÍCH THUỘC BẰNG ĐỘC QUYỀN
GIẢI PHÁP HỮU ÍCH**

(19) **Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN)**
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ

(11) 
2-0002205

(51)⁷ **G01N 33/00**

(13) **Y**

(21) 2-2019-00350

(22) 19.09.2014

(67) 1-2014-03117

(45) 25.12.2019 381

(43) 25.04.2016 337

(73) **ĐẠI HỌC Y DƯỢC THÀNH PHỐ HỒ CHÍ MINH (VN)**
217 Hồng Bàng, phường 11, quận 5, thành phố Hồ Chí Minh

(72) Nguyễn Minh Đức (VN), Jeong Hill Park (KR), Sung Won Kwon (KR), Gwang Jin Lee (KR), Nguyễn Trường Huy (VN), Lê Thị Hồng Vân (VN), Vũ Huỳnh Kim Long (VN)

(74) Công ty TNHH Sở hữu trí tuệ Thảo Thọ Quyến (INVENCO.,LTD)

(54) **QUY TRÌNH ĐỊNH LƯỢNG CÁC SAPONIN CHÍNH TRONG SÂM VIỆT NAM**

(57) Giải pháp hữu ích đề cập đến quy trình định lượng các saponin chính trong dược liệu thuộc chi Panax. Quy trình này bao gồm việc chiết mẫu một lần bằng metanol 70% bằng phương pháp siêu âm, lọc dịch chiết và phân tích bằng sắc ký lỏng hiệu năng cao với đầu dò UV, ELSD. Quy trình này hiệu quả trong việc phát hiện và định lượng các saponin, cụ thể là các saponin nhóm ocotillol không có liên kết đôi. Quy trình đã được chứng minh là cho kết quả định lượng đáng tin cậy.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Giải pháp hữu ích đề cập đến quy trình định lượng các saponin chính trong sâm Việt Nam (tên khoa học *Panax vietnamensis* Ha et Grushv. – Họ Araliaceae) bằng sắc ký lỏng hiệu năng cao với đầu dò quang phổ tử ngoại (UV) và đầu dò tán xạ ánh sáng bay hơi (ELSD).

Tình trạng kỹ thuật của giải pháp hữu ích

Việc xác định các saponin chính trong sâm Việt Nam trước đây đã được thực hiện bằng nhiều phương pháp, tuy nhiên các phương pháp xác định trên không hoàn chỉnh, chẳng hạn chỉ dừng lại ở mức độ định tính, không định lượng, hoặc chỉ định lượng từng nhóm saponin một, không định lượng đồng thời các saponin chính nên rất phiền toái, tốn thời gian và chi phí..

Dược điển Việt Nam IV đã mô tả phương pháp định tính các saponin chính trong sâm Việt Nam bằng sắc ký lớp mỏng, với chất chuẩn là majonosid-R2. Tuy nhiên, phương pháp này chưa định lượng được các saponin chính trong sâm Việt Nam.

Nguyễn Minh Đức và cộng sự đã mô tả phương pháp xác định hàm lượng các saponin chính trong sâm Việt Nam trồng ở Quảng Nam bằng cách sử dụng sắc ký lỏng hiệu năng cao (High Performance Liquid Chromatography - HPLC) (xem tài liệu: Nguyen Minh Duc, Nguyen Minh Cang, Nguyen Duc Dieu Trang (2001) "Quantitative determination of major saponin contents of cultivated vietnamese ginseng – *Panax vietnamensis* Ha et Grushv.-Araliaceae- by HPLC". *Pharma Indochina*, II (20-23), 247-251). Phương pháp này bao gồm việc chiết mẫu bằng soxhlet, loại tạp và tách phân đoạn saponin bằng Diaion HP-20. Phương pháp này đã định lượng được các saponin chính trong sâm Việt Nam là G-Rg₁, G-Re, G-Rb₁, G-Rd và M-R2 nhưng có vài hạn chế như sau: việc chiết mẫu bằng Soxhlet và loại tạp bằng cột Diaion cần nhiều dung môi; thời

gian chiết và loại tạp kéo dài, điều kiện chạy HPLC sử dụng 3 hệ dung môi khác nhau cùng với 2 loại đầu dò PDA và RI tiêu tốn nhiều thời gian, và chỉ định lượng trong phân đoạn saponin chứ chưa định lượng được trong dược liệu. Ngoài ra, đầu dò RI có độ nhạy thấp nên cần nồng độ mẫu cao, ngoài ra phương pháp này không thể áp dụng cho chương trình gradient pha động.

Lê Thị Hồng Vân và cộng sự đã mô tả phương pháp định lượng đồng thời G-Rg-1, G-Rb1, G-Rd và M-R2 trong saponin toàn phần trong sâm Việt Nam bằng HPLC sử dụng đầu dò PDA cài đặt ở bước sóng phát hiện là 203 nm (đối với G-Rg₁, G-Rb₁, G-Rd) và 196 nm (M-R2), nhiệt độ cột 40°C, tốc độ dòng 1,5 ml/phút, với chương trình rửa giải gradient tuyến tính (xem tài liệu: Le Thi Hong Van, Nguyen Thi Minh Thao, Nguyen Ngoc Khoi, Nguyen Duc Tuan, Nguyen Minh Duc (2012) "Simultaneous Quantitative Analysis of Major Saponins in Vietnamese Ginseng by HPLC". *Journal of Medicinal Materials*, 17 (2), 35). Mặc dù phương pháp này xác định được M-R2, một saponin thuộc nhóm ocotillol có hàm lượng cao nhất trong mẫu, nhưng do hợp chất này có bước sóng hấp thụ 196 nm nhưng mức độ hấp thụ kém nên sắc ký đồ không thể hiện được tỷ lệ của saponin này trong mẫu. Ngoài ra, phương pháp này phải dùng tới hai bước sóng là 203 nm và 196 nm mới định lượng được, đồng thời chưa định lượng được các saponin khác thuộc nhóm ocotillol có hàm lượng thấp. Phương pháp này cũng chỉ định lượng các saponin toàn phần mà chưa định lượng được tỷ lệ của thể của chúng trong mẫu.

Lê Thị Hồng Vân và cộng sự đã mô tả phương pháp theo dõi sự thay đổi thành phần các saponin trong sâm Việt Nam sau khi hấp ở 120°C trong thời gian từ 2 đến 20 giờ bằng cách sử dụng HPLC-ELSD (xem tài liệu: Le Thi Hong Van, Nguyen Thi Minh Thao, Nguyen Ngoc Khoi, Nguyen Duc Tuan, Nguyen Minh Duc (2012) "Simultaneous Quantitative Analysis of Major Saponins in Vietnamese Ginseng by HPLC". *Journal of Medicinal Materials*, 17 (2), 35). Tuy quy trình đã áp dụng đầu dò ELSD trong phân tích song quy trình này chỉ nêu ra sự thay đổi các thành phần saponin chứ chưa định lượng được hàm lượng các saponin chính trong sâm.

Bản chất kỹ thuật của giải pháp hữu ích

Tác giả giải pháp hữu ích đã ngạc nhiên phát hiện ra rằng, bằng cách sử dụng hệ thống HPLC với đầu dò ELSD và đầu dò UV có thể định lượng được các saponin chính trong sâm Việt Nam một cách chính xác và nhanh chóng. Đặc biệt hơn, khi cài đặt hệ thống này trong một số điều kiện nhất định có thể định lượng được các saponin nhóm ocotillol không chứa liên kết đôi có mặt với hàm lượng thấp trong mẫu. Điều này là đáng ngạc nhiên và chưa từng được biết đến trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Do đó, mục đích của giải pháp hữu ích là đề xuất quy trình định lượng các saponin chính trong sâm Việt Nam bao gồm các bước sau:

- (a) chuẩn bị mẫu;
- (b) chiết saponin từ mẫu;
- (c) lọc;
- (d) định lượng các saponin bằng sắc ký HPLC;
- (e) tính toán kết quả,

khác biệt ở chỗ, bước định lượng bằng sắc ký HPLC được thực hiện với đầu dò ELSD cài đặt ở áp suất nitơ là 3,8 bar (3800 kPa) và đầu dò UV cài đặt ở bước sóng 196 nm.

Giải pháp hữu ích cũng đề xuất quy trình định lượng các saponin chính trong sâm Việt Nam nêu trên, khác biệt ở chỗ, bước chiết saponin từ mẫu được thực hiện một lần bằng cách sử dụng metanol 70% và siêu âm trong 40 phút.

Ngoài ra, giải pháp hữu ích cũng đề xuất quy trình định lượng các saponin chính trong sâm Việt Nam như nêu trên, khác biệt ở chỗ, mẫu sau bước lọc được sử dụng để định lượng ngay mà không cần qua bước loại tạp chất.

Giải pháp hữu ích cũng đề xuất quy trình định lượng các saponin chính trong sâm Việt Nam như nêu trên, khác biệt ở chỗ, bước chạy HPLC với chương trình dung môi rửa giải với thời gian chạy từ 0-11, 11-25, 25-35 phút tương ứng với tỷ lệ dung môi ACN (A): H₂O (B) là 21:21, 21-32:79-68, 32-40:68-60 dùng để tách các saponin.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig.1 thể hiện sắc ký đồ HPLC của mẫu chuẩn được phát hiện bằng ELSD (A), mẫu thử được phát hiện bằng ELSD (B) và bằng UV (C). Chú thích các đỉnh tương ứng với

các hợp chất quan tâm: 1, NR1; 2, MR1; 3, G-Rg₁; 4, G-Re; 5, M-R2; 6, p-RT₄; 7, V-R11; 8, V-R2; 9, G-Rb₁; 10, G-Rd.

Mô tả chi tiết giải pháp hữu ích

Giải pháp hữu ích đề cập đến quy trình định lượng các saponin chính trong sâm Việt Nam nhanh và chính xác. Quy trình định lượng theo giải pháp hữu ích chủ yếu bao gồm các bước sau:

- (a) chuẩn bị mẫu;
- (b) chiết saponin từ mẫu;
- (c) lọc;
- (d) định lượng các saponin bằng sắc ký HPLC với đầu dò ELSD và đầu dò UV.
- (e) tính toán kết quả.

Các saponin chính được định lượng trong sâm là ginsenosid-Rg₁, -Re, -Rb₁, -Rd, majonosid-R2, vinaginsenosit-R2, -R11, pseudoginsenosid-RT4.

Theo phương án được ưu tiên, các saponin này bao gồm các saponin nhóm 20(S)-protopanaxadiol (G-Rb₁, -Rd), 20(S)-protopanaxatriol (G-Rg₁) có chứa liên kết đôi và nhóm ocotillol (M-R2, V-R2, -R11, p-RT₄) không chứa liên kết đôi.

Theo phương án được ưu tiên khác, các saponin được định lượng thuộc nhóm ocotillol (M-R2, V-R2, -R11, p-RT₄) không chứa liên kết đôi.

Nhóm ocotillol này đặc trưng cho sâm Việt Nam. Do chúng không chứa liên kết đôi nên khả năng hấp thụ ánh sáng tử ngoại kém nên các đầu dò thông dụng như đầu dò UV thường ít phát hiện và định lượng được nhóm này. Do đó, việc sử dụng đầu dò ELSD là phù hợp cho việc phát hiện và định lượng nhóm ocotillol này.

Quy trình theo giải pháp hữu ích bao gồm bước chuẩn bị mẫu. Các công đoạn chuẩn bị mẫu là đã được biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Ví dụ, theo giải pháp hữu ích, được liệu sẽ được làm sạch bằng nước, sấy ở chu trình nhiệt 40-60-40°C để đạt độ ẩm an toàn dưới 13%, cắt nhỏ, xay và rây để thu được bột có cỡ hạt nhỏ hơn 355 µm.

Bước chiết các saponin cũng được tiến hành theo nhiều phương pháp đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật như phương pháp chiết nóng, ngâm kiệt, phương pháp dựa vào áp suất (áp suất khí quyển, áp suất chân không), phương pháp vi sóng, tạo dòng xoáy, mạch nhịp,

v.v.. Theo giải pháp hữu ích, bước chiết các saponin được thực hiện bằng cách sử dụng metanol 70-100%, đồng hóa và siêu âm. Công đoạn đồng hóa có thể thực hiện được bằng cách sử dụng máy lắc xoáy, ví dụ, máy Vortex-Genie 2 (USA) trong 3 giây. Để tránh hiện tượng mẫu chỉ tập trung ở đáy ống, ảnh hưởng đến hiệu quả chiết, cứ 10 phút lại tiến hành đồng hóa bằng máy lắc xoáy.

Theo phương án được ưu tiên, bước chiết saponin được thực hiện sử dụng metanol 70% và điều kiện siêu âm là 30°C trong 40 phút. Các điều kiện chiết này giúp chiết kiệt được lượng saponin khỏi mẫu đồng thời giúp rút ngắn được thời gian chiết.

Mẫu sau khi chiết được lọc qua màng lọc 0,45 μm trước khi định lượng bằng HPLC. Lượng mẫu dùng để định lượng có thể vào khoảng 100mg.

Theo phương án được ưu tiên khác, mẫu thu được sau khi lọc được sử dụng trực tiếp cho bước định lượng mà không cần thêm bước loại tạp. Điều này giúp tiết kiệm được thời gian, đảm bảo độ chính xác và độ đúng của phương pháp.

Bước định lượng trong quy trình theo giải pháp hữu ích được thực hiện trên hệ thống HPLC sử dụng kết hợp đầu dò ELSD và đầu dò UV. Ví dụ, hệ thống sắc ký Perkin Elmer Series 200 (USA). Các thiết bị HPLC khác từ các nhà cung cấp khác cũng có thể được sử dụng.

Theo giải pháp hữu ích, pha động là hỗn hợp của axetonitril (ACN) và nước và chương trình rửa giải với tỉ lệ dung môi theo Bảng 1.

Bảng 1. Chương trình pha động rửa giải

Thứ tự	Thời gian (Phút)	ACN (A)	H ₂ O (B)
1	0-11	21	21
2	11-25	21→32	79→68
3	25-35	32→40	68→60
4	35-40	40-95	60-5
5	40-60	95	5

6	60-61	95→21	5→79
7	61-71	21	79

Trong bảng này, điều kiện cho thứ tự 1-3 dùng để tách các hợp chất quan tâm, điều kiện cho thứ tự từ 4-7 dùng để rửa cột và làm ổn định lại cột bằng hệ dung môi ban đầu. Với chương trình pha động nêu trên, các saponin quan tâm, cụ thể là ginsenosid-Rg1 và – Re và các saponin có độ phân cực khác nhau sẽ tách được trong thời gian ngắn (35 phút). Cột sắc ký được sử dụng là C18 (150 mm × 4,6 mm, 5 µm) làm bằng thép không gỉ nhồi pha tĩnh silicagel. Việc lựa chọn cột có kích thước ngắn hơn cột thông thường (250 mm) sẽ làm giảm thời gian phân tích đồng thời vẫn đạt được độ phân giải mong muốn.

Đầu dò UV (quang phổ hấp thụ tử ngoại) được cài đặt ở bước sóng 196 nm và điều kiện hoạt động của đầu dò tán xạ ánh sáng bay hơi như sau: áp lực nitơ 3,8 bar, nhiệt độ ống hóa hơi 50°C. Áp lực nitơ được cài đặt ở 3,8 bar giúp toàn bộ các phân tử nhỏ đi vào bộ phận phát hiện, giúp tăng độ lặp lại của việc định lượng.

Các đầu dò bất kỳ thích hợp có thể được sử dụng, ví dụ đầu dò UV Perkin Elmer Series 200 (Mỹ), đầu dò ELSD Sedex LT80 (Pháp).

Điều kiện chạy sắc ký:

- Tốc độ dòng: 1 ml/phút
- Thể tích tiêm: 20 µl.
- Cột thép không gỉ nhồi silicagel C18 (150 mm × 4,6 mm, 5 µm).

Tính toán kết quả

A - Xây dựng đường tuyến tính

Để xây dựng đường tuyến tính, mẫu chuẩn được pha chế với các nồng độ như trong Bảng 2.

Bảng 2. Nồng độ của mẫu chuẩn dùng để xây dựng đường tuyến tính (mg/ml)

	NR1	G-Rg ₁	G-Re	MR2	p-RT4	VR11	VR2	G-Rb ₁	G-Rd
1	0,1	4	0,1	5	2	2	0,1	2	2
2	0,05	2	0,05	2,5	1	1	0,05	1	1

3	0,025	1	0,025	1,25	0,5	0,5	0,025	0,5	0,5
4	0,0125	0,5	0,0125	0,625	0,25	0,25	0,0125	0,25	0,25
5	0,00625	0,25	0,00625	0,373	0,125	0,125	0,00625	0,125	0,125
6	0,00373	0,125	0,00373	0,186	0,0625	0,0625	0,00373	0,0625	0,0625

Phương trình hồi quy thu được có dạng:

Đối với đầu dò ELSD: $\log_{10}y = b \times \log_{10}x + b_0$

Đối với đầu dò UV: $y = b \times x + b_0$

trong đó:

y: diện tích đỉnh thu được trên sắc ký đồ

x: nồng độ của chuẩn tương ứng

Yêu cầu: hệ số tương quan R^2 của phương trình tuyến tính phải lớn hơn 0,99.

B – Tính toán hàm lượng các saponin chính

Hàm lượng của majonosid R2, các ginsenosid Rg₁, Rb₁ và Rd trong mẫu được liệu được tính dựa trên diện tích pic (đỉnh) thu được đối với dung dịch thử, dung dịch chuẩn và hàm lượng trong dung dịch chuẩn theo công thức dưới đây. Kết quả được thể hiện dưới dạng mg saponin trong 1 gam mẫu (mg/g)

Đầu dò ELSD

$$\text{Hàm lượng (mg/g)} = \frac{10^{\frac{\log_{10}(S) - b_0}{b}} \times 100}{m} \quad (1)$$

trong đó

S: diện tích đỉnh thu được

b₀, b: hệ số của phương trình hồi quy nồng độ theo diện tích đỉnh.

m: khối lượng mẫu đã trừ độ ẩm.

Đầu dò UV

$$\text{Hàm lượng (mg/g)} = \frac{(S - b_0) \times 100}{b \cdot m} \quad (2)$$

trong đó:

S: diện tích đỉnh thu được

b_0, b : hệ số của phương trình hồi quy nồng độ theo diện tích đỉnh.

m: khối lượng dược liệu đã trừ độ ẩm.

Để đánh giá tính chính xác và độ tin cậy của phương pháp, các thông số về tính tuyến tính, giới hạn phát hiện, giới hạn định lượng được đánh giá.

Các thông số này của quy trình định lượng theo giải pháp hữu ích được thể hiện trong bảng 3, 4, 5 dưới đây.

Bảng 3. Phương trình hồi quy và LOD, LOQ của phương pháp

Saponin	ELSD					UV				
	Phương trình tuyến tính	R ²	Khoảng định lượng (mg/mL)	LOQ (mg/mL)	LOD (mg/mL)	Phương trình tuyến tính	R ²	Khoảng định lượng (mg/mL)	LOQ (mg/mL)	LOD (mg/mL)
NR1	y = 16,095,158x ^{1,6081}	0,9985	0,013-1,04	0,022	0,006	y=8,225,894x - 12,872	1	0,0004-1,04	0,002	0,0004
Rg1	y = 14,505,168x ^{1,5687}	0,9983	0,007-0,955	0,022	0,007	y=9,069,242x + 12,434	0,9997	0,0019-1,91	0,0018	0,0004
MR2	y = 20,958,157x ^{1,6685}	0,9984	0,019-0,61	0,019	0,004	y=188,174,90x - 166,66	1	0,009-2,44	0,04	0,001
P-RT4	y = 20,123,608x ^{1,6351}	0,9990	0,009-0,56	0,016	0,0065	ND	ND	ND	ND	ND
VR11	y = 4,707,057x ^{1,6007}	0,9994	0,05-1,69	0,055	0,026	ND	ND	ND	ND	ND
VR2	y = 22,774,081x ^{1,6510}	0,9994	0,007-0,56	0,013	0,0035	ND	ND	ND	ND	ND
Rb1	y = 30,016,270x ^{1,6916}	0,9991	0,007-0,495	0,013	0,0038	y=6,675,167x - 221	0,9999	0,00097-0,99	0,001	0,0002
Rd	y = 28,974,603x ^{1,7116}	0,9993	0,007-0,495	0,012	0,0039	y=7,278,735x + 1,457	1	0,00098-1	0,001	0,0002

*ND: không phát hiện

Như thấy trong bảng 3, phương trình tuyến tính có hệ số tương quan (R²) lớn hơn 0,99. Điều này thể hiện mối tương quan tốt giữa nồng độ và diện tích đỉnh trên sắc ký đồ.

Bảng 4. Độ chính xác của phương pháp

Saponin	ELSD			UV		
	Độ chính xác trong ngày		Độ chính xác giữa các ngày	Độ chính xác trong ngày		Độ chính xác giữa các ngày
	Hàm lượng (mg/g)	%R,S,D	Hàm lượng (mg/g)	%R.S.D	Hàm lượng (mg/g)	%R.S.D
NR1	ND	ND	ND	ND	1,5 ± 0,03	2,01
Rg1	35,8 ± 0,2	0,75	36,6 ± 1,1	3,03	37,3 ± 0,1	0,27
MR2	62,8 ± 0,3	0,51	64,1 ± 1,5	2,43	65,1 ± 1,3	1,99
p-RT4	16,8 ± 0,2	1,4	17,6 ± 0,6	3,78	ND	ND
VR11	6,7 ± 0,2	3,03	7,7 ± 0,18	2,37	ND	ND
VR2	1,5 ± 0,05	3,77	1,7 ± 0,06	3,87	ND	ND
Rb1	10,1 ± 0,00	0,09	10,5 ± 0,3	2,96	10,1 ± 0,02	0,2
Rd	5,6 ± 0,06	1,14	5,6 ± 0,12	2,26	5,6 ± 0,01	0,27

*ND: không phát hiện *%R.S.D: độ lệch chuẩn tương đối.

Như thấy trên bảng 4, quy trình định lượng có độ lệch tương đối (%R.S.D) nhỏ hơn 2,2% đối với đầu dò UV và nhỏ hơn 4% đối với đầu dò ELSD, điều này chứng tỏ quy trình định lượng có độ lặp lại tốt trong ngày và giữa các ngày.

Bảng 5. Độ đúng của phương pháp

	Có sẵn (mg)	Thêm vào (mg)	Tìm thấy (mg)	Độ phục hồi (%)	R,S,D (%)	Có sẵn (mg)	Thêm vào (mg)	Tìm thấy (mg)	Độ phục hồi (%)	R,S,D (%)
NR1	ND					0,15	0,09	0,24	98	6,9
							0,11	0,26	97,8	5,7
Rg1	3,66	2,4	5,95	94,8	3,27	3,72	2,4	6,11	99,5	1,66
		3,02	6,69	100,2	1,18		3,02	6,83	100,2	1,14
MR2	6,41	3,98	10,17	94,3	4,15	6,42	3,98	10,33	99,3	3,01
		4,98	11,21	96,5	0,4		4,98	11,7	106,3	1,08
p-RT4	1,71	1,02	2,72	98,5	4,49	ND				
		1,23	2,81	89,4	0,9					
VR11	0,67	0,52	1,17	111,5	4,06	ND				
		0,62	1,31	102,3	0,42					
VR2	0,17	0,08	0,25	103,7	5,4	ND				
		0,1	0,28	101	6,36					
Rb1	1,01	1,0	1,98	97	2,3	1,01	1,0	2,01	101	1,62
		1,2	2,12	92	7,63		1,2	2,15	96	5,75
Rd	0,56	0,52	1,05	95	0,96	0,56	0,52	1,1	106,3	2,86
		0,63	1,13	90	3,07		0,63	1,19	98	6,45

*ND: không phát hiện; *%R.S.D: độ lệch chuẩn tương đối.

Các kết quả nêu trong bảng 5 cho thấy quy trình định lượng theo giải pháp hữu ích có độ phục hồi 98-106% đối với đầu dò UV và độ phục hồi 89-111% đối với đầu dò ELSD, điều này chứng tỏ quy trình đạt độ tin cậy tốt.

Ví dụ thực hiện giải pháp hữu ích

Giải pháp hữu ích được mô tả chi tiết hơn trong phần mô tả việc thực hiện các bước của quy trình sau đây.

Xử lý mẫu thô: Các củ sâm tươi từ 4-7 tuổi thu hái tại trạm Dược liệu Trà Linh, Quảng Nam được rửa sạch đất cát, rửa bằng nước, để ráo, sau đó sấy khô ở 40°C trong 4 giờ, 50°C trong 1,5 ngày và 60°C đến khi củ khô hẳn, sau đó sấy ở 40°C trong 4 giờ. Củ sâm sau khi sấy được cắt nhỏ, xay bằng máy xay gia dụng và rây qua rây có cỡ mắt lưới 355 μm để thu được bột có cỡ hạt dưới 355 μm .

Chuẩn bị mẫu: Cân chính xác 100 mg bột vào ống nghiệm có nắp, thêm chính xác 10 mL metanol 70%, vặn chặt nắp và dán kín nắp ống bằng màng parafilm. Màng này đảm bảo dung môi không bay hơi trong suốt quá trình chiết, tạo ra sự ổn định nồng độ mẫu. Đặt ống nghiệm vào máy vortex trong 3 giây, sau đó đặt vào bể siêu âm đã cài đặt nhiệt độ chiết ở 30°C, chiết trong 40 phút. Mỗi 10 phút, ống nghiệm được vortex trong 3 giây để trộn đều mẫu. Sau khi chiết, mẫu được vortex trong 3 giây. Để mẫu lắng xuống, dịch chiết được lọc qua màng lọc 0,45 μm trước khi đưa vào phân tích bằng HPLC.

Định lượng bằng HPLC: Máy HPLC Perkin Elmer Series 200 kèm đầu dò UV Perkin Elmer Series 200 được cài đặt ở bước sóng 196 nm và đầu dò ELSD được cài đặt áp lực khí nitơ hóa hơi ở 3,8 bar và nhiệt độ hóa hơi là 50°C. Cột sắc ký Phenomenex Gemini C18 (150 $\times$ 4,6 mm, 5 μm) được sử dụng để tách các hợp chất quan tâm. Pha động gồm kênh A là axetonitril và kênh B là nước. Chương trình pha động được cài đặt như Bảng 1. Tốc độ dòng cài đặt ở 1 mL/phút và thể tích tiêm mẫu là 20 μL . Tiến hành bơm lần lượt các chuẩn có nồng độ như trong Bảng 2 và xây dựng đường tuyến tính tương quan giữa nồng độ và diện tích đỉnh kèm phương trình hồi quy. Bơm mẫu thử 3 lần để lấy kết quả trung bình về diện tích đỉnh.

Tính toán kết quả: Sử dụng công thức (1) và (2) để tính toán kết quả hàm lượng các saponin chính trong mẫu Sâm Việt Nam. Kết quả được trình bày trong Bảng 6.

Bảng 6. Kết quả hàm lượng các saponin trong các củ sâm Việt Nam từ 4-7 tuổi.

Mẫu	Hàm lượng (mg/g)								
	NR1	G-Rg ₁	G-Re	M-R2	p-RT ₄	V-R11	V-R2	G-Rb ₁	G-Rd
7.1	1,33	53,25	1,84	73,80	9,02	7,15	1,66	19,85	22,34
7.2	2,48	55,75	3,16	53,40	2,32	4,40	1,60	29,84	20,36
7.3	2,20	46,53	2,08	63,95	1,96	5,13	1,57	27,56	14,98
6.1	0,88	53,14	1,28	59,04	9,59	5,94	1,82	23,50	44,49
6.2	0,95	33,05	0,81	22,90	5,85	1,74	0,90	6,46	4,98
6.3	1,63	29,77	1,31	52,38	4,69	3,69	1,43	12,90	11,61
5.1	1,28	31,94	1,97	50,99	3,83	4,19	1,47	12,40	9,73
5.2	3,00	36,14	1,27	51,81	3,25	4,40	1,38	18,49	13,39
5.3	1,62	75,89	0,94	65,47	13,35	5,03	1,53	24,83	36,97
4.1	1,26	63,56	1,41	49,42	9,64	3,75	1,75	13,68	23,48
4.2	1,01	41,52	1,75	53,05	6,50	4,47	1,49	14,83	17,80
4.3	1,52	27,14	1,43	44,51	3,38	3,13	1,21	9,87	8,05

Ứng dụng của quy trình

Quy trình trên có thể được sử dụng để:

- Kiểm nghiệm, đánh giá chất lượng sâm Việt Nam và các dược liệu thuộc chi *Panax* (Nhân sâm, Tam thất, Sâm Hoa Kỳ, v.v.).

- Dựa vào kết quả định lượng bằng phương pháp theo giải pháp hữu ích, có thể xây dựng tiêu chuẩn cho sâm Việt Nam và lựa chọn điều kiện trồng trọt, chế biến, bảo quản, nhằm tối ưu hóa hàm lượng saponin trong mẫu.

- Khảo sát sự thay đổi hàm lượng saponin trong rễ sâm Việt Nam qua các độ tuổi, sự khác nhau về hàm lượng saponin giữa thân rễ và rễ củ.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Quy trình định lượng các saponin chính trong sâm Việt Nam (*Panax vietnamensis*) bao gồm các bước sau:

- (a) chuẩn bị mẫu: Sâm Việt Nam tươi được sấy ở nhiệt độ dưới 60°C, sau đó được xay thành bột có kích thước dưới 1 mm.
- (b) chiết saponin từ mẫu: bột Sâm Việt Nam được chiết một lần với hỗn hợp metanol nước hoặc cồn nước với tỉ lệ 1:5-1:20 trong khoảng thời gian 30-120 phút bằng phương pháp siêu âm.
- (c) lọc dịch chiết: dịch chiết được lọc qua màng lọc nylon hoặc PTFE có kích thước lỗ lọc 0,45 µm hoặc 0,2 µm;
- (d) định lượng các saponin trong dịch chiết sau khi lọc bằng sắc ký HPLC: định lượng đồng thời các saponin chính trong Sâm Việt nam bao gồm các saponin có chứa liên kết đôi trong cấu trúc thuộc nhóm 20(*S*)-protopanaxadiol (ginsenoside-Rb₁, ginsenoside-Rd), 20(*S*)-protopanaxatriol (ginsenoside-Rg₁) và saponin không chứa liên kết đôi trong cấu trúc thuộc nhóm ocotillol (majonoside-R2, vinaginsenoside-R2, vinaginsenoside-R11, pseudoginsenoside-RT₄) bằng hệ thống HPLC với pha động với thời gian chạy từ 0-11, 11-25, 25-35 phút tương ứng với tỷ lệ phần trăm (%) dung môi axetonitril (A): nước (B) là 21:79, 21-32:79-68, 32-40:68-60, phát hiện bằng đầu dò ELSD với áp lực nitơ 3,6-4,2 bar.
- (e) tính toán kết quả dựa theo đường chuẩn với tuyến tính logarit.

2. Quy trình theo điểm 1, trong đó các saponin chính bao gồm các saponin nhóm 20(*S*)-protopanaxadiol (G-Rb₁, -Rd), 20(*S*)-protopanaxatriol (G-Rg₁) có chứa liên kết đôi và nhóm ocotillol (M-R2, V-R2, -R11, p-RT₄) không chứa liên kết đôi.

3. Quy trình theo điểm 1, trong đó dịch chiết sau khi lọc được định lượng ngay mà không cần thêm bước loại tạp.

4. Quy trình theo điểm 1, trong đó bước định lượng các saponin bằng sắc ký HPLC được thực hiện với thời gian chạy sắc ký từ 0-11, 11-25, 25-35 phút tương ứng với tỷ lệ dung môi ACN (A): H₂O (B) là 21:21, 21-32:79-68, 32-40:68-60.

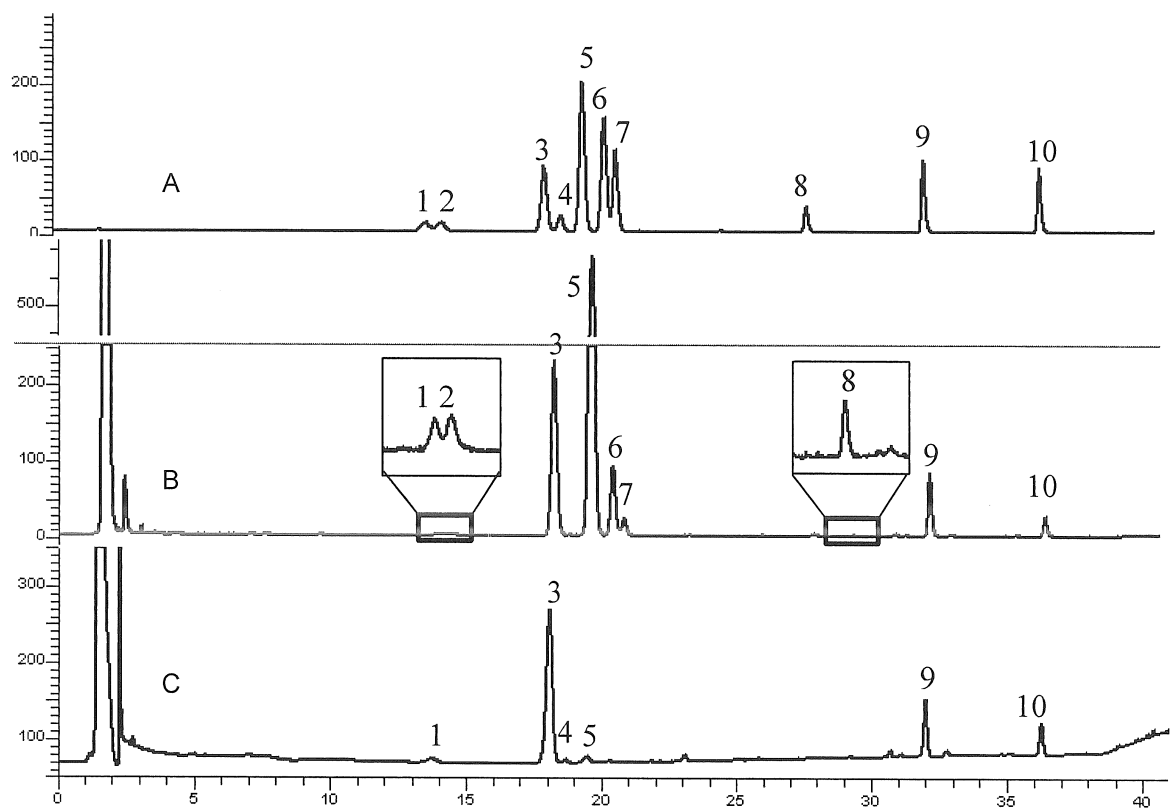


Fig.1: Sắc ký đồ HPLC của hỗn hợp chuẩn được phát hiện bằng ELSD, dịch chiết Sâm Việt Nam được phát hiện bằng ELSD và UV.