

SỬ DỤNG HPLC ĐỂ PHÂN LẬP VÀ ĐỊNH LƯỢNG HỢP CHẤT SAPONIN CHÍNH GINSENOSIDE RE TRONG RỄ TÓC CỦA CÂY SÂM VIỆT NAM NUÔI CẤY

Vũ Văn Tuấn¹, Lê Thùy Trang¹, Lê Thị Ngân¹, Nguyễn Thị Thu Hương¹, Nguyễn Thị Mỹ Lan¹,
Trịnh Thị Ánh Tuyết¹, Nguyễn Thị Quỳnh Trúc¹, Phạm Hà Thanh Tùng¹, Nguyễn Hữu Tùng¹,
Khuất Thị Mai Lương², Lê Hùng Linh², Nguyễn Ngọc Hiếu^{1*}

¹ Khoa Dược, Trường Đại học Phenikaa, Hà Nội, Việt Nam

² Bộ môn Sinh học phân tử, Viện Di truyền Nông nghiệp, Hà Nội, Việt Nam

* Tác giả liên hệ Nguyễn Ngọc Hiếu <hie.u.nguyenngoc@phenikaa-uni.edu.vn>

(Ngày nhận bài: 28-04-2024; Hoàn thành phản biện: 20-06-2024; Ngày chấp nhận đăng: 08-07-2024)

Tóm tắt. Từ cao chiết ethanol 80% của mẫu rễ tóc cây Sâm Việt Nam nuôi cấy, hợp chất saponin với khung dammaran đã được phân lập bằng phương pháp sắc ký cột. Hợp chất này được xác định là ginsenoside Re (1) dựa trên các phương pháp phổ bao gồm cộng hưởng từ hạt nhân (NMR) và phổ khối (MS), kết hợp so sánh với dữ liệu phổ thực nghiệm đã công bố. Phương pháp định lượng ginsenoside Re trong mẫu rễ tóc cây Sâm Việt Nam nuôi cấy bằng phương pháp HPLC-UV đã được xây dựng và thẩm định theo hướng dẫn của ICH (theo các tiêu chí về độ đúng, độ lặp lại, độ tuyến tính và độ chọn lọc). Quá trình định lượng được thực hiện trên cột pha đảo C₁₈ Shimadzu Shim-pack GIST (4,6 × 250 mm; 5 μm); hệ dung môi được sử dụng là gradient hỗn hợp acetonitril – nước; tốc độ dòng là 1 mL/phút; bước sóng phát hiện UV λ = 196 nm. Đây là nghiên cứu đầu tiên về phân lập và định lượng ginsenoside Re trong mẫu rễ tóc cây Sâm Việt Nam nuôi cấy.

Từ khóa: Sâm Việt Nam, rễ tóc, HPLC, ginsenoside Re

Isolation and quantification of major saponin ginsenoside Re from hairy root cultures of *Panax vietnamensis* Ha et Grushv by HPLC

Vu Van Tuan¹, Le Thuy Trang¹, Le Thi Ngan¹, Nguyen Thi Thu Huong¹, Nguyen Thi My Lan¹, Trinh
Thi Anh Tuyet¹, Nguyen Thi Quynh Truc¹, Pham Ha Thanh Tung¹, Nguyen Huu Tung¹, Khuat Thi
Mai Luong², Le Hung Linh², Nguyen Ngoc Hieu^{1*}

¹ Faculty of Pharmacy, Phenikaa University, Hanoi, Vietnam

² Molecular Biology Department, Agricultural Genetics Institute, Ha Noi, Vietnam

* Correspondence to Nguyen Ngoc Hieu <hie.u.nguyenngoc@phenikaa-uni.edu.vn>

(Received: 28 April 2024; Revised: 20 June 2024; Accepted: 08 July 2024)

Abstract. From the 80% ethanol extract of the hairy root cultures of *Panax vietnamensis*, a main dammarane-type saponin was isolated by using the chromatographic method. The isolate was identified as ginsenoside Re (1) via an extensive analysis by using NMR and MS, as well as comparison with published data. A quantitative procedure using HPLC with a UV detector has been developed to determine the ginsenoside Re content from the hairy roots of cultured *P. vietnamensis*, and the

procedure was also validated according to the ICH guidelines in terms of accuracy, repeatability, linearity, and selectivity. The determination was carried out by using a C18 Shimadzu Shim-pack GIST (4.6 × 250 mm; 5 μm) column as a stationary phase with a gradient solvent system of acetonitrile-water as eluant. The flow rate was set at 1.0 mL/min and UV detection at 196 nm. This is the first report on the isolation and quantitative analysis of ginsenoside Re in the samples of *P. vietnamensis* hairy roots.

Keywords: *Panax vietnamensis*, hairy root, HPLC, ginsenoside Re

1 Mở đầu

Sâm Việt Nam hay còn được gọi là sâm Ngọc Linh, có tên khoa học là *Panax vietnamensis* (họ Nhân sâm – Araliaceae), là một loài sâm đặc hữu của Việt Nam, sinh trưởng tập trung ở chân núi Ngọc Linh (Quảng Nam và Kon Tum). Ngoài ra, một số thứ dưới loài của cây sâm Việt Nam còn được phát hiện ở Lai Châu và Langbiang [1, 2]. Trong y học cổ truyền, sâm Việt Nam được sử dụng với tác dụng chính là tăng cường sức khỏe và phục hồi sinh lực. Các nghiên cứu được lý đã chứng minh sâm Việt Nam có tác dụng giảm căng thẳng, bảo vệ gan và kích thích miễn dịch [3, 4].

Các kết quả nghiên cứu về hóa thực vật của cây sâm Việt Nam tập trung chủ yếu vào bộ phận được sử dụng chính là phần dưới mặt đất (rễ và thân rễ) [1, 3]. Thành phần hóa học chính của loài *P. vietnamensis* là các saponin khung dammaran. Các saponin này được chia làm 3 phân nhóm, bao gồm protopanaxadiol, protopanaxatriol và ocotillol. Các hợp chất saponin chính trong loài *P. vietnamensis* là ginsenoside Rb1, ginsenoside Rd, ginsenoside Rg1, majonoside R2, v.v. [1, 4]. Các hợp chất saponin từ loài *P. vietnamensis* đã được chứng minh có tác dụng chống ung thư, giảm lo âu, chống viêm, giảm đau và bảo vệ tế bào thần kinh [3, 4].

Tương tự như các loài sâm khác trên thế giới, cây sâm Việt Nam cũng có thời gian sinh trưởng trung bình 5–7 năm trước khi có thể đạt hàm lượng hoạt chất cao nhất. Trong khi đó, hiện nay nguồn cung cấp sâm chủ yếu cho thị trường đến từ tự nhiên hoặc canh tác bán tự nhiên nên dẫn đến hiện tượng giá bán rất cao trên thị trường

[1, 5, 6]. Trong những năm gần đây, nuôi cấy mô bằng công nghệ sinh học là một hướng nghiên cứu mới với mục đích tạo ra nguồn nguyên liệu sinh khối lớn nhằm tối ưu hóa hàm lượng các hoạt chất sinh học cũng như giúp phần nào thay thế cho dược liệu tự nhiên trong công nghiệp dược [7, 8]. Trong số các kỹ thuật nuôi cấy sâm, rễ tóc là bộ phận được nghiên cứu nhiều do có những ưu điểm như có khả năng sinh trưởng mạnh, bền vững về mặt di truyền, không phụ thuộc vào chất điều hòa sinh trưởng ngoại sinh, đồng thời có thể sinh tổng hợp các hoạt chất sinh học với hàm lượng cao [5, 9, 10]. Ở Việt Nam đã có một số nghiên cứu đưa ra các phương pháp tạo rễ tóc nuôi cấy từ cây sâm Việt Nam, nhưng chưa có nghiên cứu phân lập và xác định hàm lượng hoạt chất chính trong các mẫu rễ tóc nuôi cấy [4–8]. Do đó, xác định các thành phần chính trong mẫu rễ tóc của cây sâm Việt Nam nuôi cấy trên các hệ thống bioreactor, từ đó cung cấp những cơ sở khoa học cho việc nghiên cứu, ứng dụng trong sản xuất là hết sức cần thiết. Nghiên cứu này mô tả quy trình phân lập và xác định cấu trúc hợp chất saponin khung dammaran chính (1) là ginsenoside Re, đồng thời xây dựng phương pháp định lượng hợp chất này trong mẫu rễ tóc của cây sâm Việt Nam nuôi cấy.

2 Đối tượng và phương pháp

2.1 Nguyên vật liệu và hóa chất

Nguyên liệu được sử dụng trong nghiên cứu là mẫu rễ tóc của cây sâm Việt Nam nuôi cấy do Viện Di truyền Nông nghiệp, Viện Khoa học Nông nghiệp Việt Nam, cung cấp. Rễ tóc được

nuôi cấy trên bioreactor 20 L trong 90 ngày tại phòng nuôi cấy khép kín; ánh sáng được chủ động điều chỉnh 80–100 lux; nhiệt độ 21 ± 2 °C; độ ẩm được cố định ở mức $57 \pm 5\%$; môi trường nuôi cấy khoáng cơ bản SH, bổ sung 50 g đường/L.



Hình 1. Mẫu rễ tóc Sâm Việt Nam nuôi cấy được sử dụng trong nghiên cứu

Các thí nghiệm sắc ký lớp mỏng được thực hiện trên bản mỏng tráng sẵn pha thường silica gel F₂₅₄ (Merck), pha đảo RP-C18 F_{254s} (Merck). Sắc ký cột được thực hiện trên pha tĩnh silica gel pha thuận (63–200 μm , Merck), pha đảo RP-C18 (30–50 μm , Merck). Chất đối chiếu ginsenoside Re phân lập từ mẫu rễ tóc của cây sâm Việt Nam nuôi cấy có độ tinh khiết 96% tính theo tỷ lệ phần trăm diện tích pic HPLC (bước sóng $\lambda = 196$ nm). Các dung môi, hóa chất dùng cho HPLC của hãng Merck và đạt tiêu chuẩn sử dụng trong HPLC; các dung môi, hoá chất dùng để xử lý mẫu đều đạt tiêu chuẩn tinh khiết phân tích (P.A.).

2.2 Thiết bị

Phổ cộng hưởng từ hạt nhân (NMR) của các hợp chất phân lập được ghi trên máy Bruker AM500 FT-NMR. Phổ khối MS được đo tại hệ thống LC-MS (Shimadzu, Nhật Bản). Các thí nghiệm phân tích và định lượng được thực hiện trên hệ thống HPLC Agilent 1260 Infinity II (Agilent, Mỹ), cột pha đảo C₁₈ Shimadzu Shim-pack GIST (4,6 $\times$ 250 mm, 5 μm), kết nối với máy tính có cài đặt phần mềm Control panel để truy xuất kết quả.

2.3 Phương pháp

Chiết xuất và phân lập

Rễ tóc của cây sâm Việt Nam (*Panax vietnamensis*) nuôi cấy (109 g) được ngâm chiết với ethanol 80% (2 L $\times$ 3 ngày $\times$ 3 lần). Dịch chiết sau đó được gộp lại và cất thu hồi dung môi bằng máy cô quay áp suất giảm và thu được cặn chiết màu vàng nâu (25,6 g). Cặn chiết được phân tán vào nước cất (0,5 L) và chiết phân đoạn lần lượt với ethyl acetat (0,5 L $\times$ 3 lần) và n-butanol (0,5 L $\times$ 3 lần). Các dịch chiết ở pha dung môi hữu cơ được tách riêng và cất thu hồi dung môi dưới áp suất giảm, thu được cặn phân đoạn ethyl acetat (4,9 g) và cặn phân đoạn n-butanol (6,8 g). Cặn phân đoạn n-butanol được nạp lên cột sắc ký silica gel pha thuận, rửa giải bằng hệ dung môi EtOAc/MeOH với tỷ lệ MeOH tăng dần từ 10/1 đến 1/1 thu được 10 phân đoạn chính, ký hiệu PĐB1–PĐB10. Phân đoạn PĐB8 (0,95 g) được tiếp tục tinh chế trên cột silica gel pha đảo RP-C18 với hệ dung môi rửa giải là MeOH 60% trong nước, thu được hợp chất 1 (32,0 mg).

Xác định cấu trúc

Cấu trúc của chất phân lập được xác định bằng việc phân tích phổ cộng hưởng từ hạt nhân (¹H-NMR và ¹³C-NMR) kết hợp với phổ khối (MS), đồng thời so sánh với các dữ liệu đã công bố trên các tập san khoa học.

Khảo sát điều kiện sắc ký

Lựa chọn bước sóng phát hiện $\lambda = 196$ nm dựa trên điều kiện phân tích các saponin khung dammaran trong rễ của cây sâm Việt Nam bằng phương pháp HPLC-UV đã được quy định trong chuyên luận ‘Sâm Việt Nam’ trong Dược điển Việt Nam V.

Khảo sát các chương trình rửa giải với pha động gồm acetonitril (ACN), MeOH (kênh B) và nước (kênh A) với các tỷ lệ khác nhau để tìm ra

điều kiện tối ưu để phân tách hợp chất cần định lượng.

Khảo sát quy trình xử lý mẫu

Tiến hành sử dụng phương pháp chiết siêu âm mẫu dược liệu với các dung môi khảo sát bao gồm MeOH, EtOH, MeOH 70% và MeOH 50%. Thông số để đánh giá lựa chọn dung môi chiết xuất tối ưu là hàm lượng ginsenoside Re thu được trong các mẫu tương ứng.

Chuẩn bị mẫu chuẩn ginsenoside Re

Cân chính xác khoảng 3,0 mg chất đối chiếu ginsenoside Re (độ tinh khiết 96%, tính theo diện tích pic); hòa tan trong 0,8 mL MeOH rồi cho vào bình định mức 1 mL. Sau đó thêm MeOH đến vạch mức và thu được dung dịch chuẩn gốc với nồng độ khoảng 3,0 mg/mL. Từ dung dịch chuẩn gốc, các dung dịch chuẩn làm việc có nồng độ nhỏ hơn được điều chế bằng cách pha loãng dung dịch chuẩn gốc với MeOH. Các mẫu dung dịch đều được lọc qua màng lọc 0,45 µm trước khi phân tích trên máy HPLC.

Đánh giá phương pháp phân tích

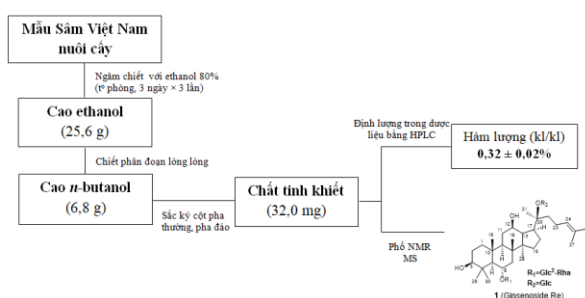
Phương pháp phân tích được đánh giá theo hướng dẫn của ICH, cụ thể là các tiêu chí về tính thích hợp của hệ thống, độ tuyến tính, độ đặc hiệu, độ lặp lại, độ chính xác (biểu thị bằng độ thu hồi), giới hạn phát hiện (LOD) và giới hạn định lượng (LOQ) [11, 12].

Xử lý số liệu

Số liệu được xử lý bằng phần mềm Microsoft Excel Office 2010. Các thí nghiệm phân tích đều được lặp lại ba lần. Hàm lượng ginsenoside Re trong mẫu phân tích được tính theo công thức (1):

$$X\% = \frac{(C \times 2 \times 100 \times 100 \times P)}{[m \times 106 \times (100 - B) \times 100]} \quad (1)$$

trong đó C là nồng độ chất cần phân tích trong dung dịch thử tính theo phương trình đường chuẩn (mg/mL); m là khối lượng dược liệu (gam); B (%) là độ ẩm của mẫu phân tích; P (%) là độ tinh khiết của chất đối chiếu tính theo % diện tích pic.

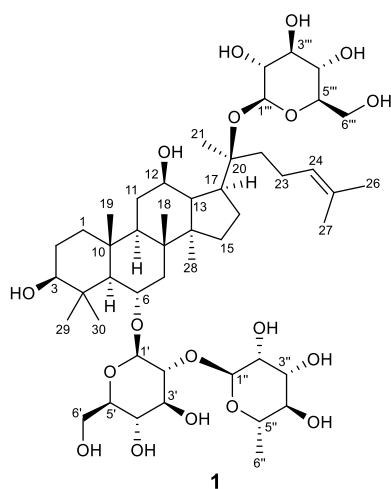


Sơ đồ 1. Tóm tắt các bước tiến hành và kết quả nghiên cứu

3 Kết quả và thảo luận

3.1 Dữ liệu phổ và xác định cấu trúc của hợp chất đã phân lập

Chất số 1: Bột màu trắng ngà. **Phổ $^1\text{H-NMR}$** ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$; 600 MHz): 3,42 (1H, br d, $J = 11,4$ Hz H-3); 1,14 (3H, s, H-18); 0,92 (3H, s, H-19); 1,55 (3H, s, H-21); 5,22 (1H, t, $J = 6,0$ Hz, H-24); 1,59 (3H, s, H-26); 1,60 (3H, s, H-27); 2,04 (3H, s, H-28); 1,32 (3H, s, H-29); 0,92 (3H, s, H-30); 5,12 (1H, d, $J = 8,4$ Hz, H-1'); 6,41 (1H, br s, H-1''); 1,73 (1H, d, $J = 6,6$ Hz, H-6''); 5,07 (1H, d, $J = 8,4$ Hz, H-1'''). **Phổ $^{13}\text{C-NMR}$** ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$; 150 MHz): 39,4 (C-1); 27,7 (C-2); 78,3 (C-3); 40,0 (C-4); 60,9 (C-5); 78,5 (C-6); 46,0 (C-7); 41,3 (C-8); 49,6 (C-9); 39,7 (C-10); 30,8 (C-11); 70,4 (C-12); 49,0 (C-13); 52,0 (C-14); 30,9 (C-15); 26,7 (C-16); 51,5 (C-17); 17,7 (C-18); 17,9 (C-19); 83,5 (C-20); 22,6 (C-21); 36,0 (C-22), 23,5 (C-23); 126,0 (C-24); 131,1 (C-25); 25,9 (C-26); 17,9 (C-27); 32,2 (C-28); 17,3 (C-29); 17,6 (C-30); 101,9 (C-1'); 79,2 (C-2'); 78,5 (C-3'); 72,2 (C-4'); 78,3 (C-5'); 63,0 (C-6'); 101,9 (C-1''); 72,3 (C-2''); 72,5 (C-3''); 74,1 (C-4''); 69,6 (C-5''); 18,8 (C-6''); 98,3 (C-1'''); 75,2 (C-2'''); 78,9 (C-3'''); 71,3 (C-4'''); 78,8 (C-5'''); 62,6 (C-6'''). **Phổ ESI-MS** (m/z): 991 $[\text{M} + \text{HCOO}]^-$.



Hình 2. Cấu trúc hóa học của hợp chất 1

Hợp chất 1 phân lập được dưới dạng bột màu trắng ngà từ phân đoạn n-butanol của mẫu rễ tóc của cây sâm Việt Nam nuôi cấy. Trên phổ ^1H NMR xuất hiện tín hiệu của tám nhóm methyl dưới dạng singlet ở δ_{H} 0,92, 1,14, 1,32, 1,55, 1,59, 1,60, 2,04, một nhóm methyl dưới dạng doublet δ_{H} 1,73 với hằng số ghép cặp $J = 6,6$ Hz, một proton loại olefin ở δ_{H} 5,22 (1H, t, $J = 6,0$ Hz). Phổ ^{13}C -NMR của hợp chất số 1 cho tín hiệu của 48 carbon, trong đó có hai carbon của liên kết đôi C=C bao gồm một carbon bậc bốn và một nhóm CH ở độ chuyển dịch lần lượt là δ_{C} 131,1 và 126,0. Các dữ liệu phổ NMR cho thấy hợp chất 1 là một saponin triterpenoid mang khung dammaran, một nhóm hợp chất chính có trong thành phần của các loài thuộc chi *Panax* [1–3]. Sự xuất hiện của 48 carbon trên phổ ^{13}C -NMR kết hợp với phổ ^1H -NMR cho phép xác định hợp chất số 1 có 3 gốc đường; mỗi gốc đường có sáu carbon (do khung aglycon có 30 carbon). Ba gốc đường trong cấu trúc của 1 được nhận định là hai gốc đường có cấu hình β [δ_{H} 5,12 (1H, d, $J = 8,4$ Hz, H-1') 5,07 (1H, d, $J = 8,4$ Hz, H-1'')] và một gốc đường với cấu hình α [6,41 (1H, br s, H-1'')] dựa trên hằng số ghép cặp của các proton loại anomer. Một nhóm methyl xuất hiện dưới dạng doublet với hằng số ghép cặp $J = 6,6$ Hz, cộng hưởng tại δ_{H} 1,73 được

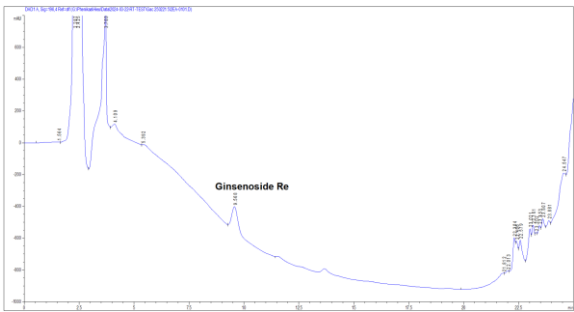
xác định là proton ở vị trí C-6 của đường α -rhamnopyranose [13]. So sánh dữ liệu phổ ^1H và ^{13}C -NMR của 1 với các hợp chất ginsenoside từ các loài thuộc chi *Panax* thấy rằng hợp chất 1 có các đặc điểm phổ giống với hợp chất 6-O-[α -L-rhamnopyranosyl(1 $\rightarrow$ 2)- β -D-glucopyranosyl]-20-O-(β -D-glucopyranosyl)-3 β ,12 β , 20(S)-trihydroxydammar-24-en, tên thường gọi ginsenoside Re [13]. Phổ ESI-MS có đỉnh ion tại m/z 991 [$\text{M} + \text{HCOO}$] $^-$. Kết hợp với các dữ liệu đã phân tích từ phổ NMR cho phép dự đoán công thức phân tử của hợp chất 1 là $\text{C}_{48}\text{H}_{82}\text{O}_{18}$ ($M = 946$), phù hợp với công thức phân tử của hợp chất ginsenoside Re. So sánh dữ liệu phổ NMR của 1 và ginsenoside Re trong các tài liệu tham khảo cho thấy sự trùng khớp hoàn toàn [14], nên có thể khẳng định hợp chất số 1 là hợp chất ginsenoside Re.

3.2 Xây dựng phương pháp định lượng ginsenoside Re trong mẫu rễ tóc của cây sâm Việt Nam nuôi cấy

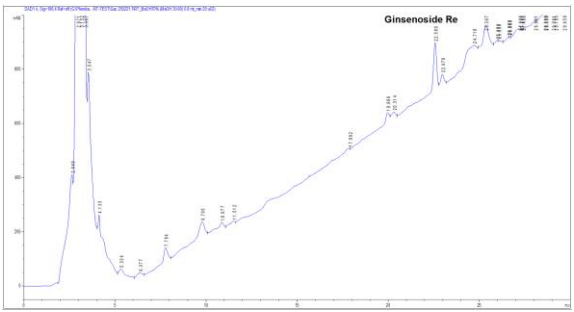
Khảo sát thành phần pha động

Tiến hành khảo sát dung môi pha động gồm acetonitril (ACN), MeOH (kênh B) và nước (kênh A) với 3 chương trình rửa giải khác nhau. Hiệu quả phân tách của pha động được đánh giá là độ dốc của đường nền, thời gian lưu (t_{R}) phù hợp, độ phân giải (R_s) tốt và hệ số đối xứng pic (A_s) tốt.

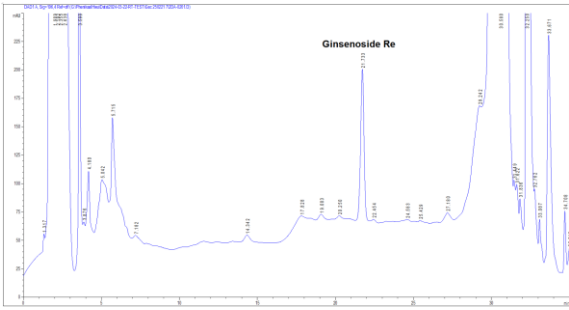
Kết quả khảo sát điều kiện dung môi pha động cho thấy trong điều kiện 1 và điều kiện 2, đường nền không cân bằng, pic ginsenoside Re không đối xứng (điều kiện 1) và không tách được pic bên cạnh (độ phân giải $R_s = 0,5$; điều kiện 2). Đối với điều kiện 3, đường nền cân bằng; pic ginsenoside Re có các hệ số A_s và R_s đạt yêu cầu; thời gian phân tích có độ dài phù hợp. Do đó, điều kiện 3 được lựa chọn cho các thí nghiệm tiếp theo.



A-Điều kiện 1 (MeOH-H₂O; $v = 1$ mL/phút);
0–15 phút (25% ACN); 15–25 phút (25–100% ACN)



B-Điều kiện 2 (MeOH-H₂O; $v = 1$ mL/phút);
0–25 phút (30–80% MeOH); 25–30 phút (80–100%
MeOH)



C-Điều kiện 3 (ACN-H₂O, $v = 1$ mL/phút); 0–11 phút (21% ACN); 11–25 phút (21–32% ACN); 26–35 phút (100% ACN)

Hình 3. Sắc ký đồ HPLC khảo sát một số điều kiện phân tích

Bảng 1. Các thông số sắc ký của ginsenoside Re ứng với các điều kiện khảo sát

Thông số	Thời gian lưu (t_R , phút)	Hệ số đối xứng (A_s). Yêu cầu $0,8 < A_s < 1,5$	Độ phân giải. (R_s) Yêu cầu $>1,5$
Điều kiện 1	9,57	0,834	2,91
Điều kiện 2	22,58	1,118	0,50
Điều kiện 3	21,73	1,091	2,85

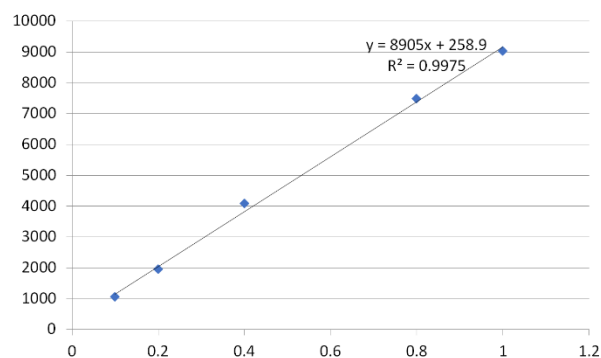
Như vậy, điều kiện phân tích như sau: Cột C₁₈ Shimadzu Shim-pack GIST (4,6 × 250 mm; 5 μ m); nhiệt độ cột: 40 °C; detector UV-VIS ($\lambda = 196$ nm); tốc độ dòng: 1,0 mL/phút; thể tích tiêm mẫu: 20 μ L; pha động nước-acetonitril (ACN): 0–11 phút (21% ACN); 11–25 phút (21–32% ACN); 26–35 phút (100% ACN).

Xây dựng đường chuẩn

Đường chuẩn của ginsenoside Re trong điều kiện phân tích được xây dựng bằng cách phân tích mẫu chuẩn ở năm nồng độ khác nhau. Mỗi dung dịch chuẩn được tiêm trên hệ sắc ký ba

lần, diện tích pic trung bình thu được sẽ là số liệu để xây dựng đường chuẩn. Kết quả được trình bày trên Hình 4.

Phương trình đường chuẩn biểu diễn sự phụ thuộc giữa diện tích pic vào nồng độ (khoảng nồng độ 0,1–1,0 mg/mL) có hệ số tương quan $R^2 = 0,9975$ ($R^2 > 0,99$), cho thấy giữa nồng độ ginsenoside Re và giá trị diện tích pic có tương quan tuyến tính tốt. Do đó phương pháp xây dựng có thể áp dụng để phân tích và định lượng ginsenoside Re.



Hình 4. Đường chuẩn của hợp chất ginsenoside Re

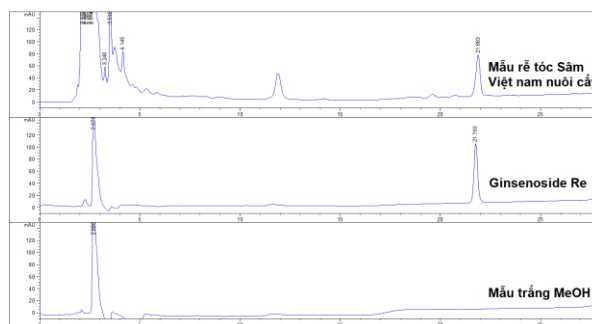
Nghiên cứu quy trình xử lý mẫu

Trong nghiên cứu này, phương pháp chiết siêu âm với 3 lần chiết lặp lại (mỗi lần 30 phút) đã được sử dụng để chiết xuất ginsenoside Re. Do ginsenoside Re tan tốt trong MeOH và khá tốt trong ethanol (EtOH), nên để lựa chọn dung môi có hiệu suất chiết cao nhất, tiến hành khảo sát các dung môi EtOH, MeOH và hỗn hợp MeOH và nước (MeOH 70%, MeOH 50%). Hiệu quả chiết của từng dung môi được đánh giá thông qua hàm lượng ginsenoside Re. Kết quả phân tích cho thấy hàm lượng ginsenoside Re trong mẫu khi chiết bằng các dung môi EtOH, MeOH, MeOH 70% và MeOH 50% lần lượt là 0,09, 0,14, 0,34 và 0,29%. Như vậy, có thể thấy sử dụng dung môi MeOH 70% cho hiệu suất chiết cao nhất. Từ đó, quy trình xử lý mẫu rễ tóc của cây sâm Việt Nam nuôi cấy được tiến hành như sau: Cân chính xác khoảng 0,2 g dược liệu (đã xay nhỏ và xác định độ ẩm), chuyển vào ống nghiệm có nắp; thêm khoảng 0,8 mL MeOH 70%; chiết siêu âm trong 30 phút; tiến hành ly tâm. Dịch chiết được cho vào bình định mức 2 mL. Tiến hành chiết thêm hai lần tương tự như trên, gộp dịch chiết vào bình định mức ở trên. Thêm dung môi đến vạch mức và thu được dung dịch A. Dung dịch A được lọc qua màng lọc cellulose acetat 0,45 µm trước khi phân tích bằng HPLC.

Kết quả thẩm định phương pháp

Độ đặc hiệu

Tiến hành phân tích mẫu trắng methanol, mẫu thử rễ tóc của cây sâm Việt Nam nuôi cấy và mẫu đối chiếu ginsenoside Re theo phương pháp đã xây dựng. Kết quả cho thấy mẫu trắng methanol không cho pic của chất phân tích ginsenoside Re. Trên sắc ký đồ mẫu thử rễ tóc của cây sâm Việt Nam nuôi cấy xuất hiện pic có thời gian lưu trùng với thời gian lưu của mẫu đối chiếu ginsenoside Re (Hình 5).



Hình 5. Sắc ký đồ HPLC phân tích mẫu rễ tóc của cây sâm Việt Nam nuôi cấy

Tính thích hợp của hệ thống

Dung dịch chuẩn ginsenoside Re với nồng độ 0,4 mg/mL được đánh giá sáu lần liên tiếp. Giá trị độ lệch chuẩn tương đối (RSD%) của diện tích pic và thời gian lưu lần lượt là 0,38% và 0,23%, chứng tỏ hệ thống và phương pháp phân tích sử dụng ổn định và phù hợp cho quá trình phân tích ginsenoside Re trong mẫu rễ tóc của cây sâm Việt Nam nuôi cấy.

Bảng 2. Kết quả đánh giá tính thích hợp của hệ thống

	Thời gian lưu (t_R phút)	Diện tích pic
Lần 1	21,975	4083,4
Lần 2	21,928	4092,7
Lần 3	21,874	4085,1
Lần 4	21,863	4047,8
Lần 5	21,844	4076,9

	Thời gian lưu (t_R phút)	Diện tích pic
Lần 6	21,834	4095,2
Trung bình	21,886	4080,2
RSD	0,23%	0,38%

Độ lặp lại của phương pháp phân tích

Sáu mẫu thử được liệu rễ tóc của cây sâm Việt Nam nuôi cấy được xử lý và phân tích theo điều kiện ở Mục 3.2.3. Kết quả được sử dụng để đánh giá độ lặp lại trong ngày. Độ lệch chuẩn tương đối RSD(%) của hàm lượng ginsenoside Re trong các thí nghiệm là 4,57% (nhỏ hơn 5,0%), chứng tỏ phương pháp có độ lặp lại tốt.

Bảng 3. Kết quả đánh giá độ lặp lại

	Hàm lượng ginsenoside Re (%)
Lần 1	0,322
Lần 2	0,335
Lần 3	0,336
Lần 4	0,305
Lần 5	0,298
Lần 6	0,311
Trung bình	0,318
RSD (%)	4,569

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

Giới hạn phát hiện (LOD) được xác định bằng cách pha loãng các dung dịch chuẩn cho đến khi thu được tín hiệu phân tích đạt tỷ lệ tín hiệu/nhiều (S/N) trong khoảng giá trị 3–4 trong khi giá trị này của giới hạn định lượng (LOQ) là khoảng 9–10. Kết quả LOD và LOQ của hợp chất ginsenoside Re được xác định lần lượt là 0,73 $\mu\text{g/mL}$ và 2,43 $\mu\text{g/mL}$.

Độ đúng

Độ đúng của phương pháp được đánh giá thông qua độ thu hồi và được xác định bằng

phương pháp thêm chuẩn. Phân tích đồng thời mẫu thêm chuẩn (tại 3 mức thêm chuẩn khác nhau 50%, 100% và 150% so với hàm lượng chất phân tích có trong mẫu thử) và mẫu không thêm chuẩn và xác định hàm lượng chất thêm vào dựa trên phương trình đường chuẩn. Từ đó xác định hiệu suất thu hồi với ginsenoside Re là 96,82–103,70%. Kết quả trên cho thấy, phương pháp định lượng có độ đúng cao.

Bảng 4. Kết quả thẩm định phương pháp phân tích

Thông số	Kết quả
Tính thích hợp của hệ thống	RSD (t_R) = 0,23% RSD (S_{pic}) = 0,38%
Độ tuyến tính	Phương trình đường chuẩn: $S = 8905 \times C + 258,9$ Hệ số tương quan: $R^2 = 0,9975$
Độ lặp lại	Hàm lượng trung bình: 0,318% RSD (%) = 4,57%
Hiệu suất thu hồi	96,82–103,70%
LOD	0,73 $\mu\text{g/mL}$
LOQ	2,43 $\mu\text{g/mL}$

3.3 Đánh giá hàm lượng ginsenoside Re trong mẫu rễ tóc của cây sâm Việt Nam nuôi cấy

Tiến hành phân tích, đánh giá hàm lượng hợp chất ginsenoside Re trong mẫu rễ tóc của cây sâm Việt Nam với các điều kiện nuôi cấy ở Mục 2.1 theo phương pháp đã xây dựng. Mẫu phân tích được lặp lại 3 lần và hàm lượng được tính theo công thức (1). Kết quả cho thấy hàm lượng ginsenoside Re trong mẫu phân tích là $0,32 \pm 0,02\%$.

Ginsenoside Re là một hợp chất protopanaxatriol saponin đã được tìm thấy trong nhiều loài thuộc chi *Panax* như *P. ginseng*, *P. quinquefolium* và *P. notoginseng* [15, 16]. Hợp chất ginsenoside Re đã được chứng minh là có nhiều tác dụng quý đối với sức khỏe con người trên các mô hình *in vivo* và *in vitro*, có thể kể đến như

chống đái tháo đường, điều hòa thần kinh, tim mạch, chống viêm, chống ung thư, kháng virus, tăng cường hệ miễn dịch, cải thiện chứng loãng xương, bảo vệ da, tăng cường hoạt động chống oxy hóa nội bào, điều chỉnh quá trình chuyển hóa cholesterol, chống dị ứng, giảm rối loạn cương dương và giảm rối loạn chức năng vận động của hệ tiêu hóa [15–17]. Hàm lượng của ginsenoside Re trong Nhân sâm (*P. ginseng*) đã được công bố là 0,15%. Các nghiên cứu cũng chỉ ra rằng ginsenoside Re có nhiều trong lá, hoa và quả Nhân sâm hơn là trong rễ. Đặc biệt, ginsenoside Re là thành phần chính trong lá Nhân sâm (*P. ginseng*) với hàm lượng chiếm 23% trong tổng số các saponin. Hàm lượng ginsenoside Re cũng đã được nghiên cứu chiếm lần lượt 4,79, 3,5 và 0,4% trong cao chiết lá, quả và rễ của cây sâm Mỹ (*P. quinquefolium*) [16]. Đối với cây sâm Việt Nam (*P. vietnamensis*), nghiên cứu của Le THV và cộng sự cho thấy hàm lượng của ginsenoside Re trong rễ và thân rễ lần lượt là 0,07 và 0,11% [18]. Trong nghiên cứu này, trong quá trình phân lập các chất, chúng tôi thấy rằng ginsenoside Re là hợp chất saponin chính trong rễ tóc của cây sâm Việt Nam ở điều kiện nuôi cấy trong Mục 2.1, với hàm lượng đạt 0,32%, có phần cao hơn so với các mẫu được liệu thuộc chi *Panax* nói chung và cây sâm Việt Nam nói riêng. Do đó, các mẫu rễ tóc được nuôi cấy với điều kiện như ở Mục 2.1 từ cây sâm Việt Nam có thể được xem xét và nghiên cứu như một nguyên liệu tiềm năng cung cấp hoạt chất ginsenoside Re.

Dược điển Việt Nam V có chuyên luận về rễ của cây sâm Việt Nam (*P. vietnamensis*). Theo đó, tiêu chí định lượng sử dụng 4 hợp chất đối chiếu saponin khung dammarane, trong đó 2 hợp chất thuộc nhóm protopanaxadiol (ginsenoside Rb1 và ginsenoside Rd), 1 hợp chất thuộc nhóm protopanaxatriol (ginsenoside Rg1) và 1 hợp chất thuộc nhóm ocotillol (majonoside R2) [19]. Trong đó, hợp chất chính majonoside R2 có nhiều tác dụng sinh học, là thành phần đặc trưng của cây

sâm Việt Nam và không có trong các loài sâm nổi tiếng khác như *P. ginseng*, *P. quinquefolium* và *P. notoginseng*. Trong quá trình phân tích và phân lập các chất, nhóm nghiên cứu không phát hiện hợp chất majonoside R2 trong mẫu rễ tóc của cây sâm Việt Nam ở điều kiện nuôi cấy như Mục 2.1. Vì vậy, cần nghiên cứu và tìm kiếm các điều kiện và kỹ thuật nuôi cấy mô khác từ cây sâm Việt Nam để có thể thu nhận được hoạt chất majonoside R2.

4 Kết luận

Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã phân lập và xác định cấu trúc của một hợp chất saponin dammarane chính (1) là ginsenoside Re trong mẫu rễ tóc của cây sâm Việt Nam nuôi cấy. Chúng tôi cũng đã xây dựng được phương pháp định lượng hợp chất ginsenoside Re bằng HPLC-UV. Chúng tôi đã xây dựng được một phương pháp định lượng đáp ứng yêu cầu về các tiêu chí, bao gồm tính thích hợp hệ thống, độ tuyến tính, độ lặp lại, và độ đúng. Hàm lượng ginsenoside Re trong mẫu phân tích đạt $0,32 \pm 0,02\%$. Đây là nghiên cứu đầu tiên về phân lập và định lượng hợp chất ginsenoside Re trong các mẫu sinh khối từ cây sâm Việt Nam bằng kỹ thuật nuôi cấy mô.

Hỗ trợ tài chính

Nghiên cứu này được Trường Đại học Phenikaa tài trợ theo đề tài mã số PU2022-1-D-05.

Mâu thuẫn lợi ích

Các tác giả tuyên bố không có mâu thuẫn lợi ích nào liên quan đến việc xuất bản bài báo này.

Tài liệu tham khảo

1. Viện Dược liệu. Cây thuốc và động vật làm thuốc ở Việt Nam. Hà Nội: NXB Khoa học và kỹ thuật; 2006.
2. Lợi ĐT. Những cây thuốc và vị thuốc Việt Nam. Hà Nội: NXB Y học; 2004.
3. Le Q-U, Lay H-L, Wu M-C, Nguyen TH-H, Nguyen D-L. Phytoconstituents and Biological Activities of *Panax vietnamensis* (Vietnamese Ginseng): A Precious Ginseng and Call for Further Research-A systematic review. Nat Prod Commun. 2018; 13(10):1934578X1801301036.
4. Le TH, Lee SY, Kim TR, Kim JY, Kwon SW, Nguyen NK, et al. Processed Vietnamese ginseng: Preliminary results in chemistry and biological activity. J Ginseng Res. 2014;38(2):154-9.
5. Loan HT, Nguyễn LV, Quyên TNL, Đức HH, Xô DH. Sàng lọc và nhân nhanh sinh khối rễ tóc Sâm Ngọc Linh trên bioreactor 20 lít trong sản xuất quy mô lớn. Khoa học Công nghệ Nông nghiệp Việt Nam. 2019;11:164-70.
6. Loan HT, Xô DH, Bình NQ, Quân NH, Đào VT, Nathalie PJ, et al. Nghiên cứu tạo rễ tóc sâm Ngọc Linh *Panax vietnamensis* bằng phương pháp chuyển gen Rol nhờ vi khuẩn *Agrobacterium rhizogenes*. Tạp chí Sinh học. 2014;36(1se):293-300.
7. Liễu NT, Thành NT, Kết NV. Nghiên cứu khả năng tạo rễ bất định của sâm Ngọc Linh (*Panax vietnamensis* Ha et Grushv.) trong nuôi cấy *in vitro*. Tạp chí Khoa học ĐHQGHN: Khoa học Tự nhiên và Công nghệ. 2011;27:30-6.
8. Hương TT, Ngọc PB, Hà CH, Nhật DT. Đánh giá khả năng sinh trưởng và tích lũy saponin của rễ bất định và rễ tơ cây sâm Ngọc Linh (*Panax vietnamensis* Ha et Grushv.). Tạp chí Công nghệ Sinh học. 2016;14(2):231-6.
9. Diop MF, Hehn A, Ptak A, Chrétien F, Doerper S, Gontier E, et al. Hairy root and tissue cultures of *Leucosium aestivum* L.—relationships to galanthamine content. Phytochemistry Rev. 2007;6(1):137-41.
10. Jousse C, Vu TD, Tran Tle M, Al Balkhi MH, Molinié R, Boitel-Conti M, et al. Tropane alkaloid profiling of hydroponic *Datura innoxia* Mill. Plants inoculated with *Agrobacterium rhizogenes*. Phytochem Anal. 2010;21(1):118-27.
11. International Conference on Harmonization. Topic Q2B Validation of analytical procedures and methodology: Harmonised Tripartite Guideline; 1996.
12. Thảo TT. Giáo trình môn học thống kê trong hóa phân tích. Hà Nội: Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội; 2010.
13. Yang WZ, Hu Y, Wu WY, Ye M, Guo DA. Saponins in the genus *Panax* L. (Araliaceae): a systematic review of their chemical diversity. Phytochemistry. 2014;106:7-24.
14. Cho J-G, In S-J, Jung Y-J, Cha B-J, Lee D-Y, Kim Y-B, et al. Re-evaluation of physicochemical and NMR data of triol ginsenosides Re, Rf, Rg2, and 20-gluco-Rf from *Panax ginseng* roots. J Ginseng Res. 2014;38(2):116-22.
15. Cai J, Huang K, Han S, Chen R, Li Z, Chen Y, et al. A comprehensive system review of pharmacological effects and relative mechanisms of Ginsenoside Re: Recent advances and future perspectives. Phytomedicine. 2022;102:154119.
16. Gao X-Y, Liu G-C, Zhang J-X, Wang L-H, Xu C, Yan Z-A, et al. Pharmacological Properties of Ginsenoside Re. Front Pharmacol. 2022;13.
17. Peng D, Wang H, Qu C, Xie L, Wicks SM, Xie J. Ginsenoside Re: Its chemistry, metabolism and pharmacokinetics. Chin Med. 2012;7:2.
18. Le TH, Lee GJ, Vu HK, Kwon SW, Nguyen NK, Park JH, et al. Ginseng Saponins in Different Parts of *Panax vietnamensis*. Chem Pharm Bull. 2015;63(11):950-4.
19. Bộ Y tế. Dược điển Việt Nam V. Hà Nội: NXB Y học; 2017.