

Phương pháp định tính, định lượng dược liệu Mạch môn (*Ophiopogon japonicus* (L.F.) Ker-gawl) trồng ở Việt Nam

QUANLITAVE, QUANTITATIVE METHODS FOR *OPHIOPOGON JAPONICUS* (L.F.)
KER-GAWL HERBAL GROWN IN VIETNAM

Nguyễn Thị Hà Ly, Nguyễn Văn Tài, Đặng Viết Hậu, Vũ Thị Diệp
Phan Văn Trường, Nguyễn Thị Thu Trang
Viện Dược liệu

TÓM TẮT

Mục tiêu: Xây dựng phương pháp định tính bằng sắc ký bản mỏng (TLC) và định lượng bằng đo quang (UV-Vis) cho dược liệu Mạch môn.

Đối tượng và phương pháp nghiên cứu: 10 mẫu rễ củ mạch môn được thu thập ở nhiều nơi khác nhau. Áp dụng các phương pháp TLC, HPLC-ELSD để định tính xác định sự có mặt của *Ophiopogonin D*, *Ruscogenin* và phương pháp UV-Vis để định lượng saponin tổng số tính theo *Ruscogenin*.

Kết quả: Nhiều mẫu không có sự xuất hiện của *Ophiopogonin D* trên sắc ký bản mỏng TLC cũng như sắc ký đồ HPLC-ELSD. Trong khi đó tất cả các mẫu sau khi thủy phân đều xuất hiện pic trùng với pic của chất chuẩn *Ruscogenin*. Định lượng theo phương pháp UV-Vis cho hàm lượng saponin tổng số nằm trong khoảng 0,51-2,19% tính theo *Ruscogenin*.

Kết luận: Phương pháp định tính bằng TLC so sánh mẫu sau thủy phân trong môi trường acid với *Ruscogenin* và phương pháp định lượng saponin tổng số tính theo *Ruscogenin* bằng UV-Vis đơn giản, chi phí thấp, nhanh chóng phù hợp để đánh giá chất lượng Mạch môn.

Từ khóa: Mạch môn, TLC, UV-Vis, *Ruscogenin*, *Ophiopogonin D*.

ABSTRACT

Objective: To establish a qualitative thin-layer chromatography (TLC) method and a quantitative UV-Vis spectrophotometric method for *Ophiopogon japonicus*.

Subjects and methods: Ten samples of *Ophiopogon japonicus* tuber roots were collected from different regions. TLC and HPLC-ELSD methods were applied to qualitatively determine the presence of *Ophiopogonin D* and *Ruscogenin*, while the UV-Vis spectrophotometric method was used to quantify the total saponin content, expressed as *Ruscogenin* equivalents.

Results: Several samples showed no detectable *Ophiopogonin D* spots on TLC or HPLC-ELSD chromatograms. However, after acid hydrolysis, all samples exhibited peaks corresponding to the *Ruscogenin* reference standard. Quantification by UV-Vis revealed total saponin contents ranging from 0.51% to 2.19% (as *Ruscogenin* equivalents).

Conclusions: The TLC method comparing acid-hydrolyzed samples with *Ruscogenin*, together with the UV-Vis spectrophotometric quantification of total saponins expressed as *Ruscogenin* equivalents, provides a simple, cost-effective, and rapid approach suitable for quality evaluation of *Ophiopogon japonicus* raw materials.

Keywords: *Ophiopogon japonicus*, TLC, UV-Vis, *Ruscogenin*, *Ophiopogonin D*.

ĐẶT VẤN ĐỀ

Cây Mạch môn (Tóc tiên, Lan tiên, Xà thảo, Duyên giới thảo, Mạch môn đông...) có tên khoa học *Ophiopogon japonicus* (L.f.) Ker-Gawl họ Mạch môn đông (Convallariaceae) là cây thảo lâu năm. Ở Việt Nam từ lâu đời nay, Mạch môn mọc hoang hoặc được trồng để làm thuốc. Bộ phận sử dụng là rễ củ của cây 2-3 năm tuổi thu hái vào tháng 6-7 [1]. Trong y học cổ truyền, rễ củ Mạch môn được dùng để chữa ho, viêm họng, lao phổi, táo bón,

sốt cao, hen phế quản, lợi tiểu, lợi sữa, điều trị các bệnh tim mạch, cao huyết áp ...

Các nghiên cứu trên thế giới chỉ ra thành phần hóa học Mạch môn gồm các saponin steroidal, homoisoflavonoid, polysaccharid và các hợp chất khác. Trong đó các saponin steroid và homoisoflavonoid được coi là thành phần hoạt chất chính [2],[3]. Các saponin steroid đã phân lập thuộc các nhóm saponin spirostanol, saponin furostanol [3],[4]. Saponin spirostanol đặc biệt là *Ophiopogonin B*,



Ophiopogonin D và Ophiopogonin D' được quan tâm nhiều nhất [2],[3]. Đã có nhiều nghiên cứu sử dụng phương pháp HPLC-ELSD để xác định hàm lượng Ophiopogonin B, Ophiopogonin D và Ophiopogonin D' trong một số vùng trồng khác nhau của Trung Quốc; tuy nhiên hàm lượng Ophiopogonin D giao động rất lớn, có mẫu không có và có mẫu lên đến 325,0 µg/g [5],[6],[7],[8]. Một số nghiên cứu cũng đã đánh giá giá hàm lượng Ruscogenin trước và sau thủy phân bằng phương pháp HPLC-ELSD [3],[9]. Nghiên cứu của Feiyi Lei và cộng sự công bố năm 2024 đã sử dụng phương pháp HPTLC sử dụng Ophiopogonin D làm chất chuẩn để đánh giá chất lượng, phân biệt các mẫu Mạch môn với *Liriope spicata* [10].

Dược liệu Mạch môn (phần rễ củ của cây Mạch môn) đã được đưa vào Dược điển Việt Nam V với các tiêu chí cơ bản trong đó có chỉ tiêu định tính, nhưng lại chưa đề cập đến chỉ tiêu định lượng [11]. Trong chỉ tiêu định tính bằng sắc ký lớp mỏng có sử dụng hợp chất Ophiopogonin D là một saponin steroid được phân lập từ Mạch môn Trung Quốc làm chất đối chiếu.

Các nghiên cứu trong nước chưa có nhiều công bố về thành phần hóa học, tác dụng dược lý đặc biệt là thành phần saponin. Các nghiên cứu chủ yếu phân lập các

flavonoid và các nhóm chất khác, có duy nhất 1 saponin đã được phân lập từ Mạch môn ở Việt Nam là (25R)-ruscogenin 1-O-(4-O-sulfo)-β-D-fucopyranosid, đây cũng là hợp chất lần đầu tiên phân lập được từ loài Mạch môn [14]. Chưa có nghiên cứu nào công bố về việc phân lập Ophiopogonin D từ Mạch môn Việt Nam; cũng như công bố về kết quả định tính và định lượng hàm lượng saponin trong Mạch môn trồng ở Việt Nam. Vì vậy, chúng tôi tiến hành nghiên cứu này với mục tiêu: Xây dựng phương pháp định tính bằng sắc ký bản mỏng (TLC) và định lượng bằng đo quang (UV-Vis) cho dược liệu Mạch môn.

ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Đối tượng nghiên cứu

Phần rễ củ các mẫu Mạch môn thu tại một số tỉnh ở Việt Nam và mua từ Trung Quốc.

Mẫu nghiên cứu được giám định tên khoa học bởi ThS. Phan Văn Trường và ThS. Nguyễn Quỳnh Nga, Trung tâm Tài nguyên Dược liệu – Viện Dược liệu. Mẫu tươi được lựa chọn theo yêu cầu trong chuyên luận Mạch môn của Dược điển Việt Nam V [11], rửa sạch, sấy khô ở nhiệt độ 50°C, xay nhỏ rây qua rây số 355. Dữ liệu các mẫu thu thập được thống kê trong bảng sau:

Ký hiệu các mẫu nghiên cứu

STT	Kí hiệu	Địa điểm lấy	Ngày lấy
1	HN	Thanh Trì, Hà Nội	11/2022
2	TĐ	Tam Đảo, Vĩnh Phúc	11/2022
3	TS	Lục Nam, Bắc Giang	3/2023
4	TQ	Nhập từ Trung Quốc bán ở Việt Nam	1/2023
5	TQ1	Mua tại Trung Quốc	1/2023
6	PS	Lục Nam, Bắc Giang	4/2023
7	TT	Thạch Thành, Thanh Hóa	3/2023
8	PT	Thanh Sơn, Phú Thọ	7/2023
9	HY1	Khoái Châu, Hưng Yên	3/2023
10	TL	Tân Lạc, Hòa Bình	7/2023

Dung môi, hóa chất

Các chất chuẩn: Ophiopogonin D có độ tinh khiết 99,7%, số lô CFS202102 và Ruscogenin độ tinh khiết 98,8%, số lô CFS202102 được cung cấp bởi hãng Chemface. Dung môi dùng cho phân tích: Acetonitril (Merck), methanol (Merck), nước cất hai lần deion hóa dùng cho phân tích HPLC.

Các dung môi, hóa chất dùng để xử lý mẫu: Methanol, ethanol, dichloromethan, ethyl acetat, n-butanol ... (Trung Quốc), đạt tiêu chuẩn phân tích (PA). Acid perchloric của Ấn Độ, acid sulfuric của Merck. Bản mỏng tráng sẵn: DC-Alufolien 60 GF254 (Merck).

Thiết bị, dụng cụ

Máy sắc ký lỏng hiệu năng cao gắn với detector tán xạ bay hơi (HPLC-ELSD) của hãng Shimadzu. Cột sắc ký

Zobax eclips XDB C18 (250 x 4,6 mm, 5 µm) của Agilent. Máy đo UV-Vis (UV-1800 của hãng Shimadzu). Bếp cách thủy (Memmert, WB-14 LO); cân phân tích (Precisa XT 220A), độ chính xác 0,0001 g; cân kỹ thuật Sartorius TE612 độ chính xác 0,01 g. Tủ sấy (Memmert, ULM 500). Cân xác định độ ẩm (Sartorius, MA-45). Máy cắt quay (Buchi, Rotavapor R-200). Các dụng cụ thông thường ở phòng thí nghiệm.

Thời gian và địa điểm nghiên cứu

Các thí nghiệm được thực hiện tại khoa Hóa Thực vật và khoa Hóa phân tích-Tiêu chuẩn, Viện Dược liệu trong thời gian 11/2022 – 4/2024.

Phương pháp nghiên cứu

Tiến hành xây dựng phương pháp định tính và định lượng cho Mạch môn theo phương pháp được quy định

trong Dược điển Việt Nam, có tham khảo Dược điển Trung Quốc 2020 và Dược điển Hồng Kông [11],[12],[13].

Định tính:

Thử theo Dược điển Việt Nam V, phụ lục 5.4. Phương pháp sắc ký lớp mỏng [11].

Bản mỏng: Silica gel GF₂₅₄.

a) *Định tính so sánh với chất đối chiếu Ophiopogonin D:*

Dung môi khai triển: Dichloromethan - methanol - nước (8:2:0,3;v/v/v).

Dung dịch thử: Cân khoảng 5,0 g bột dược liệu vào bình cầu 250 ml, thêm 100 ml methanol, đun hồi lưu cách thủy 60 phút. Để nguội, lọc, rửa bã dược liệu bằng 10 ml methanol. Gộp dịch lọc và dịch rửa, cất thu hồi dung môi tới cạn. Hòa cần bằng 25 ml nước và chuyển hỗn hợp thu được vào bình chiết dung tích 100 ml, thêm 25 ml *n*-butanol bão hòa nước, lắc kỹ. Thu pha *n*-butanol, bay hơi trên bếp cách thủy đến cạn. Hòa tan cần trong 3 ml methanol được dung dịch chấm sắc ký [11].

Dung dịch chất đối chiếu: Hòa tan Ophiopogonin D chuẩn trong methanol để được dung dịch có nồng độ 1 mg/ml.

Cách tiến hành: Chấm riêng biệt lên bản mỏng 4 μ l mỗi dung dịch trên. Sau khi triển khai sắc ký lấy bản mỏng ra, để khô trong không khí ở nhiệt độ phòng, phun dung dịch acid sulfuric 10% trong ethanol, sấy ở 120°C cho đến khi các vết hiện rõ. Quan sát dưới ánh sáng thường hoặc dưới ánh sáng tử ngoại ở bước sóng 366 nm.

Yêu cầu: Trên sắc ký đồ của dung dịch thử phải có vết cùng giá trị R_f và màu sắc với vết của Ophiopogonin D trên sắc ký đồ của dung dịch chất đối chiếu.

b) *Định tính so sánh mẫu trước thủy phân với chất đối chiếu Ruscogenin:*

Dung môi khai triển: Dichloromethan - methanol - ethylacetat - nước (17:2:1:0,2;v/v/v/v).

Dung dịch thử: Như mục a.

Dung dịch chất đối chiếu: Hòa tan Ruscogenin chuẩn trong methanol để được dung dịch có nồng độ 1 mg/ml.

Cách thực hiện: Như mục a.

Yêu cầu: Trên sắc ký đồ của dung dịch thử phải có vết cùng giá trị R_f và màu sắc với vết của Ruscogenin trên sắc ký đồ của dung dịch chất đối chiếu.

c) *Định tính so sánh mẫu sau thủy phân với chất đối chiếu Ruscogenin:*

Dung môi khai triển: Như mục b.

Dung dịch thử: Cân khoảng 2 g bột dược liệu vào bình cầu 100 ml, thêm 25 ml acid sulfuric 3%, đun hồi lưu cách thủy trong 2 giờ. Trung hòa dịch chiết bằng NaOH 16% đến pH 7, lọc bỏ dịch. Phần bã dược liệu được sấy khô ở 60°C, sau đó thêm vào 50 ml ete và đun hồi lưu cách thủy trong 30 phút, lọc lấy dịch chiết ete, làm khô đến cạn, hòa tan cần trong 5 ml methanol, lọc thu được

dịch chiết mẫu thử dùng để chấm sắc ký [9].

Dung dịch chất đối chiếu: Như mục b.

Cách thực hiện: Như mục a.

Yêu cầu: Trên sắc ký đồ của dung dịch thử phải có vết cùng giá trị R_f và màu sắc với vết của Ruscogenin trên sắc ký đồ của dung dịch chất đối chiếu.

d) *Định tính Ophiopogonin D trong Mạch môn bằng phương pháp HPLC-ELSD theo Dược điển Hồng Kông 2010 [13]:*

Dung dịch chuẩn: Hòa tan Ophiopogonin D chuẩn trong methanol để thu được dung dịch có nồng độ chính xác 440 μ g/ml.

Dung dịch thử: Cân chính xác khoảng 5,0 g bột dược liệu vào bình cầu 250 ml, cho vào 100 ml MeOH. Đun hồi lưu trong 60 phút. Làm lạnh về nhiệt độ phòng, lọc, rửa phần bã dược liệu với 10 ml MeOH. Gộp dịch lọc và dịch rửa, cất thu hồi dung môi tới cạn. Hòa cần bằng 25 ml nước và chuyển hỗn hợp thu được vào bình chiết dung tích 100 ml, thêm 25 ml *n*-butanol bão hòa nước, lắc kỹ. Thu pha *n*-butanol và bay hơi trên bếp cách thủy đến cạn. Hòa tan cần trong 3 ml methanol, lọc qua màng lọc 0,45 μ m PTFE trước khi đưa vào hệ thống HPLC.

Hệ thống sắc ký: Sắc ký lỏng hiệu năng cao HPLC gắn với detector ELSD, cột pha đảo C 18 (4,6 x 250 mm, 5 μ m). Tốc độ dòng 1 ml/phút, nhiệt độ lò cột 30°C. Thể tích tiêm 20 μ l. Chương trình rửa giải gradient theo tỷ lệ như sau:

Chương trình rửa giải gradient

Thời gian (phút)	Nước (% v/v)	Acetonitrile (% v/v)
0-20	75-60	25-40
20-50	60-50	40-50
50-60	50-35	50-65

Tìm riêng dung dịch chuẩn Ophiopogonin D và các dung dịch thử vào hệ thống HPLC-ELSD ghi lại sắc ký đồ của từng mẫu. Xác định thời gian lưu của Ophiopogonin D trong sắc ký đồ của dung dịch chuẩn và các dung dịch thử.

Yêu cầu: Thời gian lưu của pic Ophiopogonin D trong dung dịch chuẩn và dung dịch thử lệch nhau dưới 2%.

Định lượng:

Định lượng saponin tổng số trong Mạch môn bằng phương pháp UV-Vis theo Dược điển Trung Quốc 2020 [13]. Thẩm định phương pháp định lượng theo quy định AOAC [15] với các chỉ tiêu sau: Độ chọn lọc đặc hiệu, tính tương thích hệ thống, khoảng tuyến tính, độ lặp lại, độ đúng.

Dung dịch chuẩn: Hòa tan Ruscogenin chuẩn trong methanol để thu được dung dịch có nồng độ chính xác khoảng 200 μ g/ml.

Dung dịch thử: Cân chính xác khoảng 1,5 g bột dược liệu vào bình nón có nút mài, thêm chính xác 50 ml



methanol và cân. Đun hồi lưu trong 2h, làm lạnh và cân, bổ sung khối lượng bị mất bằng methanol, lắc đều và lọc. Lấy chính xác 25 ml dịch lọc và cô đến cạn, hòa tan cần trong 10 ml nước cất, sau đó lắc với *n*-butanol bão hòa nước 5 lần, mỗi lần 10 ml. Gộp các dịch chiết *n*-butanol, rửa bằng ammoniac 2 lần, mỗi lần 5 ml. Sau đó, cô dịch *n*-butanol đến cạn, hòa tan cần trong methanol 80 % và chuyển vào bình định mức 50 ml, thêm methanol 80 % đến vạch, lắc đều. Hút chính xác 2 – 5 ml dung dịch thử, tiến hành làm phản ứng tương tự như với dung dịch chuẩn.

Độ chọn lọc đặc hiệu: Tiến hành đo phổ UV-VIS của mẫu trắng, mẫu thử và mẫu chuẩn Ruscogenin, ghi lại hình ảnh phổ. Xác định đỉnh hấp thụ UV mạnh của mẫu chuẩn và mẫu thử để lựa chọn bước sóng đo độ hấp thụ.

Tính tương thích hệ thống: Phân tích 6 lần lặp lại cùng 1 mẫu chuẩn, ghi giá trị hấp thụ. Kết quả được đánh giá thông qua giá trị RSD (%) của độ hấp thụ.

Xác định khoảng tuyến tính: Xác định mối quan hệ tuyến tính giữa nồng độ dung dịch chuẩn và độ hấp thụ. Xây dựng đường chuẩn, đánh giá độ tương quan R^2 .

Xây dựng đường chuẩn: Hút chính xác 0,6 ml, 1,2 ml, 2,4 ml, 3,6 ml và 4,8 ml dung dịch chuẩn vào ống nghiệm, cô đến cạn, thêm chính xác 10 ml acid perchloric và lắc đều, để trong bể nước nóng 80°C trong vòng 15 phút, lấy ra và làm lạnh bằng nước đá. Đo độ hấp thụ quang tại bước sóng 397 nm. Mẫu trắng được chuẩn bị tương tự, thay dung dịch chuẩn bằng methanol. Xây dựng đường chuẩn biểu diễn sự phụ thuộc của độ hấp thụ vào nồng độ dung dịch.

Độ lặp lại: Tiến hành phân tích 6 lần lặp lại 1 mẫu thử theo quy trình, xác định độ hấp thụ. Kết quả được đánh giá

thông qua giá trị RSD (%) của độ hấp thụ các lần đo mẫu thử.

Độ đúng: Độ đúng (hiệu suất thu hồi) được xác định bằng phương pháp thêm chuẩn Ruscogenin với 2 mức 10% và 50% so với hàm lượng saponin tổng số tính theo Ruscogenin. Phân tích mẫu thêm chuẩn và mẫu không thêm chuẩn để xác định lượng chất chuẩn thêm vào tính theo thực nghiệm. So sánh giá trị lượng chất chuẩn thêm vào theo lý thuyết và theo thực nghiệm, xác định độ đúng.

Hàm lượng Ruscogenin được tính theo công thức:

$$X (\%) = \frac{C \times V \times 2 \times K \times 100}{m \times 100 - a \times 10^6} \times 100$$

Trong đó: X (%): Hàm lượng Ruscogenin trong mẫu thử. C: Nồng độ Ruscogenin có trong dung dịch thử tính từ phương trình đường chuẩn ($\mu\text{g/ml}$). V: Thể tích dung dịch thử (ml). m: Khối lượng mẫu thử (g). a: Độ ẩm của mẫu thử (%). K: hệ số pha loãng.

Phương pháp xử lý và phân tích số liệu

Các kết quả được xử lý bằng phần mềm Excel 2024. Kết quả được biểu thị bằng tỷ lệ % giá trị trung bình và cộng/trừ độ lệch chuẩn: $\mu = X \pm SD$.

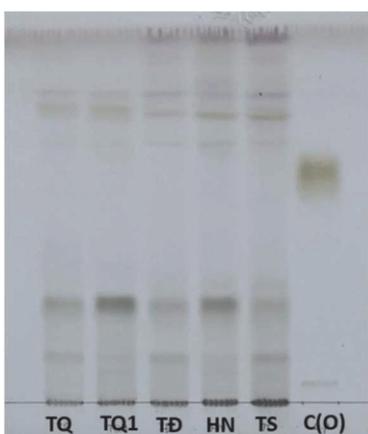
Đạo đức trong nghiên cứu

Các nghiên cứu chưa được công bố trên bất kỳ các tạp chí nào trong nước và ngoài nước. Các thí nghiệm được tiến hành lặp lại tối thiểu 3 lần theo quy định của AOAC. Các số liệu thu được mang tính trung thực, khách quan do nhóm tác giả thực hiện. Kết quả đảm bảo độ tin cậy.

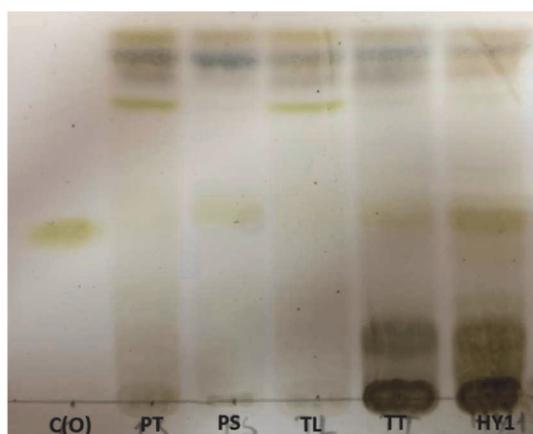
KẾT QUẢ

Định tính

Định tính so sánh với chất đối chiếu Ophiopogonin D:



1A



1B

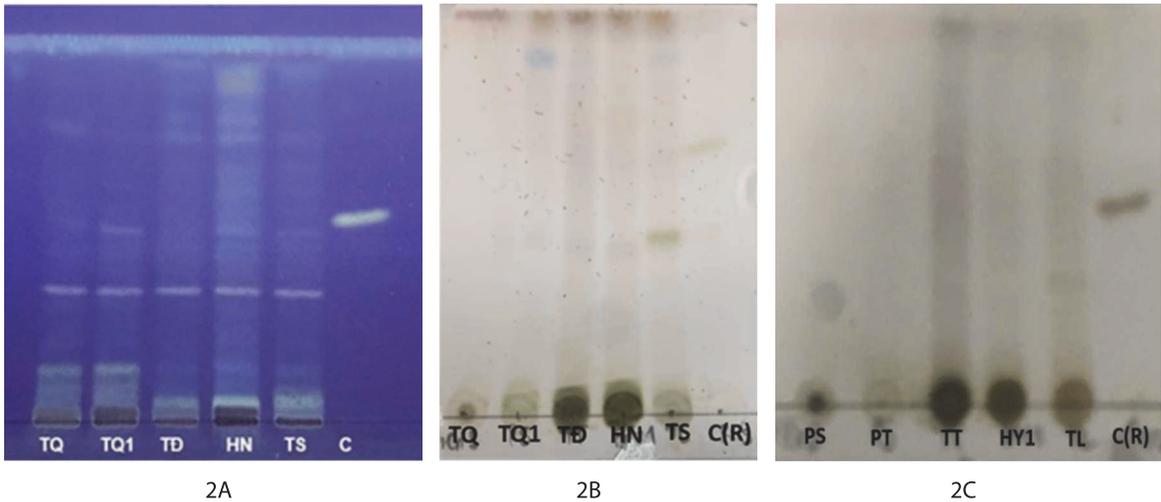
Hình 1. Sắc ký đồ TLC định tính Ophiopogonin D các mẫu Mạch môn (Hình 1A gồm các pic TQ, TQ1, TĐ, HN, TS, C(Ophiopogonin D); hình 1B gồm các pic C(Ophiopogonin D), PT, PS, TL, TT, HY1, quan sát dưới ánh sáng thường)

Trên sắc ký đồ TLC có nhiều mẫu không xuất hiện pic có R_f trùng với R_f của Ophiopogonin D.

Trên sắc ký đồ của các mẫu PS, TT, HY1 xuất hiện pic có

R_f gần với R_f của Ophiopogonin D còn các mẫu khác không nhìn thấy sự xuất hiện của pic ở vùng R_f của Ophiopogonin D.

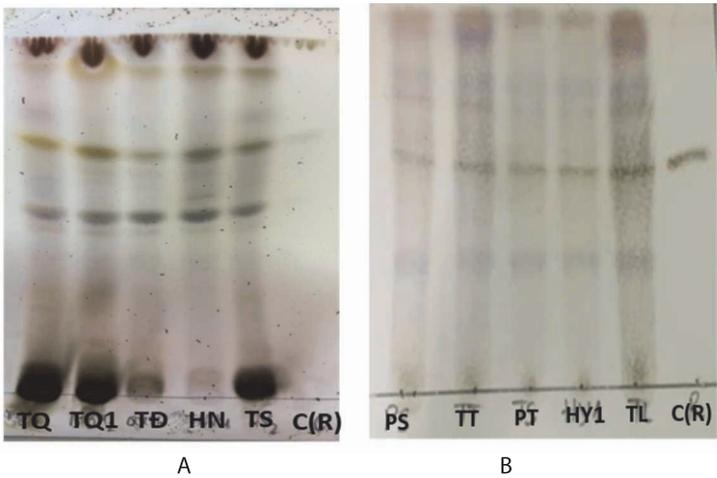
Định tính so sánh mẫu trước thủy phân với chất đối chiếu Ruscogenin:



Hình 2. Sắc ký đồ TLC định tính ruscogenin các mẫu Mạch môn trước thủy phân (Hình 2A, 2B gồm các pic TQ, TQ1, TĐ, HN, TS, C(Ruscogenin); hình 2C gồm các pic PS, PT, TT, HY1, TL, C(Ruscogenin); hình 3A quan sát dưới ánh sáng tử ngoại ở bước sóng 366 nm, hình 2B và 2C quan sát dưới ánh sáng thường)

Trên sắc ký đồ TLC của các mẫu không xuất hiện hoặc rất mờ nhạt pic có thời gian lưu trùng với thời gian lưu của Ruscogenin.

Định tính so sánh mẫu sau thủy phân với chất đối chiếu Ruscogenin:

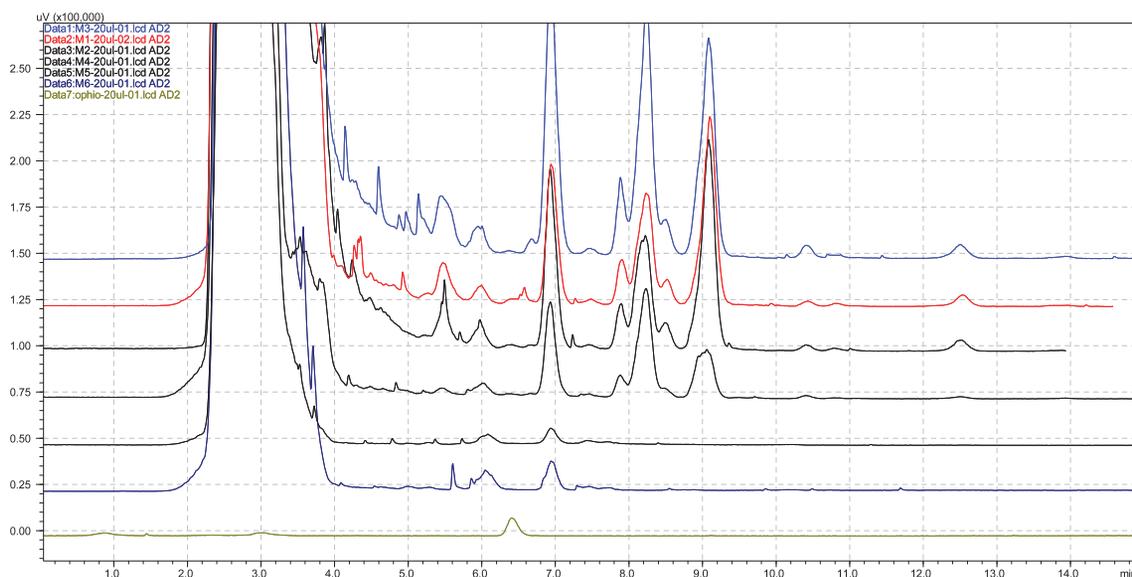


Hình 3. Sắc ký đồ TLC định tính Ruscogenin các mẫu mạch môn sau thủy phân (Hình 3A gồm các pic TQ, TQ1, TĐ, HN, TS, C(Ruscogenin); hình 3B gồm các pic PS, TT, PT, HY1, TL, C(Ruscogenin) quan sát dưới ánh sáng thường)

Trên sắc ký đồ của dung dịch thử của tất cả các mẫu đều có các vết cùng giá trị R, và màu sắc với vết trên sắc ký đồ của dung dịch đối chiếu Ruscogenin.



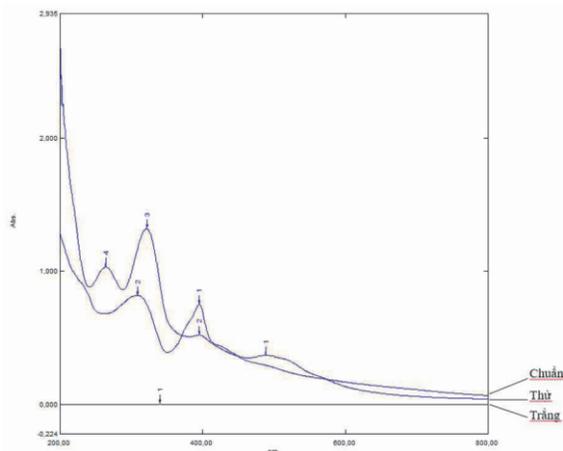
Định tính Ophiopogonin D trong Mạch môn bằng phương pháp HPLC-ELSD theo Dược điển Hồng Kông 2020:



Biểu đồ 1. Sắc ký đồ HPLC-ELSD của ophiopogonin D và các mẫu theo Dược điển Hồng Kông

Trên sắc ký đồ của 5 dung dịch thử (TQ, TQ1, TĐ, HN, TS) không xuất hiện pic có thời gian lưu trùng với thời gian lưu của pic dung dịch chuẩn Ophiopogonin D.

Định lượng Độ chọn lọc đặc hiệu:



Biểu đồ 2. Phổ UV-VIS của mẫu trắng, thử và chuẩn Ruscogenin

Phổ UV-Vis của mẫu trắng không xuất hiện đỉnh hấp thụ ở bước sóng 397 nm. Phổ UV-Vis của mẫu chuẩn và mẫu thử đều có đỉnh hấp thụ UV mạnh ở bước sóng 397 nm. Dựa vào tài liệu tham khảo chuyên luận Mạch môn của Dược điển Trung Quốc 2020, lựa chọn bước sóng 397 nm để xác định độ hấp thụ của các mẫu Mạch môn, từ đó tính hàm lượng saponin theo Ruscogenin chuẩn.

Tính tương thích hệ thống:

Xác định độ hấp thụ của Ruscogenin chuẩn có nồng độ 48 µg/ml, thực hiện đồng thời 6 mẫu. Kết quả thu được độ hấp thụ là $0,876 \pm 0,048$ (RSD = 1,92 %). Với giá trị RSD < 2%, hệ thống UV-Vis và điều kiện phân tích đã lựa chọn là phù hợp để định lượng saponin tổng số trong Mạch môn.

Xác định khoảng tuyến tính:

Bảng 1. Quan hệ tuyến tính giữa nồng độ và độ hấp thụ của dung dịch Ruscogenin

TT	Nồng độ (ug/ml)	Độ hấp thụ	Δ (%)
1	12	0,096	-7,91
2	24	0,357	1,25
3	36	0,585	-0,35
4	48	0,876	5,51
5	60	1,016	-3,75
Đường chuẩn	$y = 0,0197x - 0,1217$		
Hệ số tương quan	$R^2 = 0,991$		

Có sự phụ thuộc tuyến tính giữa độ hấp thụ quang và nồng độ của dung dịch chuẩn Ruscogenin theo phương trình hồi quy tuyến tính $y = 0,0197x - 0,1217$ với hệ số tương quan $R^2 = 0,991$. Hệ số tương quan $R^2 > 0,95$ đảm bảo yêu cầu của phép phân tích UV-Vis.

Độ lặp lại:

Bảng 2. Kết quả đánh giá độ lặp lại

Mẫu	Khối lượng dược liệu (g)	Độ ẩm (%)	A	K	Hàm lượng (%)
TQ1.1	1,4933	6,50	0,449	2,5	0,52
TQ1.2	1,5061	6,50	0,473	2,5	0,55
TQ1.3	1,5014	6,50	0,446	2,5	0,51
TQ1.4	1,5026	6,50	0,408	2,5	0,48
TQ1.5	1,5033	6,50	0,412	2,5	0,48
TQ1.6	1,5101	6,50	0,452	2,5	0,52
Trung bình (%)					0,51
RSD (%)					1,70

Độ lệch chuẩn tương đối RSD = 1,7% cho thấy phương pháp có độ lặp lại tốt, nằm trong giới hạn quy định của AOAC.

Độ đúng:

Bảng 3. Kết quả đánh giá độ thu hồi

Mẫu	Lượng chuẩn thêm vào (mg)	Tổng lượng chất chuẩn trong mẫu thử theo lý thuyết (mg)	A	Tổng lượng chất chuẩn trong mẫu thử xác định được (mg)	Độ thu hồi (%)
Không thêm chuẩn	0,00	7,75	0,449	7,75	
Thêm 10 %	0,80	8,55	0,517	8,67	101,39
	0,80	8,55	0,523	8,75	102,34
	0,80	8,55	0,506	8,52	99,64
Thêm 50 %	4,00	11,75	0,764	12,02	102,31
	4,00	11,75	0,755	11,90	101,27
	4,00	11,75	0,745	11,76	100,11

Tiến hành thêm chuẩn ở 2 mức nồng độ 10% và 50% tương ứng hàm lượng trong mẫu thử. Kết quả thu được ở bảng 3 cho thấy độ thu hồi nằm trong

khoảng 99,64–102,34%.

Phương pháp đã xây dựng có độ thu hồi đạt các yêu cầu theo AOAC.

Định lượng mẫu thử:

Bảng 4. Kết quả định lượng Ruscogenin trong các mẫu mạch môn

STT	Mẫu	Độ ẩm	Hàm lượng Ruscogenin (%)
1	TQ	6,5	0,81 ± 0,02
2	TQ1	7,9	0,51 ± 0,04
3	TS	9,4	1,29 ± 0,04
4	TĐ	6,6	0,95 ± 0,03
5	HN	5,9	2,01 ± 0,02
6	PS	7,2	0,53 ± 0,03
7	TT	6,7	1,07 ± 0,02
8	PT	9,3	0,89 ± 0,02
9	HY1	7,5	2,19 ± 0,06
10	TL	4,3	0,86 ± 0,03

Đánh giá các mẫu cho thấy hàm lượng Ruscogenin nằm trong khoảng 0,51% - 2,19%.



BÀN LUẬN

Chuyên luận Mạch môn trong Dược điển Hồng Kông quy định chỉ tiêu định tính và định lượng bằng HPLC-ELSD có mặt của Ophiopogonin D với hàm lượng không thấp hơn 0,010% [13]. Dược điển Trung Quốc quy định chỉ tiêu định tính bằng TLC so sánh với dược liệu Mạch môn đối chiếu mà không sử dụng chất đối chiếu Ophiopogonin D [12]. Dược điển Việt Nam không quy định chỉ tiêu định lượng, chỉ tiêu định tính so sánh với dược liệu Mạch môn đối chiếu hoặc chất chuẩn Ophiopogonin D [11]. Trong nghiên cứu của chúng tôi, nếu chỉ sử dụng dung dịch đối chiếu Ophiopogonin D để định tính dược liệu Mạch môn thì trong 10 mẫu có đến 7 mẫu không đạt tiêu chuẩn. Tiến hành định tính bằng HPLC-ELSD trên 5 mẫu dược liệu theo chuyên luận Dược điển Hồng Kông cũng không thấy xuất hiện pic của Ophiopogonin D. Khi chúng tôi định tính bằng TLC so sánh với chất đối chiếu Ruscogenin của dung dịch chiết mẫu chiết cũng không xuất hiện hoặc xuất hiện mờ nhạt pic có R_f trùng với R_f của Ruscogenin. Nhưng khi thủy phân mẫu dược liệu Mạch môn trong acid và chiết với dung môi hữu cơ, so sánh với Ruscogenin thì trên sắc ký đồ TLC xuất hiện pic có giá trị R_f trùng với R_f của pic chất đối chiếu, pic hiện lên rõ nét.

Đề xuất: Sử dụng chất đối chiếu Ruscogenin trong phương pháp định tính TLC Mạch môn và thủy phân mẫu với acid loãng trước khi chiết với dung môi hữu cơ. Đây cũng là cơ sở để định lượng saponin tổng số bằng phương pháp UV-Vis tính theo Ruscogenin.

Phương pháp định lượng saponin tổng số tính theo Ruscogenin bằng thiết bị UV-Vis, dựa theo Dược điển Trung Quốc cho kết quả đáng tin cậy với hàm lượng saponin tổng số nằm trong khoảng 0,51% - 2,19%, cao hơn nhiều so với quy định trong Dược điển Trung Quốc 2020 (quy định hàm lượng saponin tổng số không thấp hơn 0,12% tính theo Ruscogenin).

KẾT LUẬN

Các kết quả nghiên cứu góp phần xây dựng được phương pháp định tính bằng TLC cho Mạch môn tại Việt Nam với chất chuẩn là Ruscogenin và thủy phân mẫu trước khi chiết mẫu. Đã xây dựng được phương pháp định lượng saponin tổng số bằng UV-Vis trong Mạch môn tính theo Ruscogenin. Định lượng 10 mẫu dược liệu cho hàm lượng saponin tổng số tính theo Ruscogenin nằm trong khoảng 0,51% - 2,19%. Các kết quả nghiên cứu đã cung cấp thêm thông tin về chất lượng Mạch môn tại Việt Nam và là một trong những căn cứ để xây dựng tiêu chuẩn định tính, định lượng dược liệu Mạch môn.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu này được hỗ trợ kinh phí từ đề tài cơ sở Viện Dược liệu "Nghiên cứu quy trình chiết xuất cao chuẩn hóa và nâng cấp tiêu chuẩn cơ sở dược liệu rễ Mạch môn (*Ophiopogon japonicus* (L.f.) Ker-Gawl) quy mô 1 kg/mẻ". Nhóm tác giả xin trân trọng cảm ơn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. **Đỗ Huy Bích.** *Cây thuốc và động vật làm thuốc*, Nhà xuất bản Khoa học Kỹ thuật 2004, tập 2, tr.216–220.
2. **Min-Hui Chen, Xiao-Jia Chen, Mei Wang, Li-Gen Lin, Yi-Tao Wang.** *Ophiopogon japonicus-A phytochemical, ethnomedicinal and pharmacological review.* *Journal of Ethnopharmacol*, 2016, 181, pp.193-213.
3. **Qiao Liu, Jin-Jian Lu, Hui-Jie Hong, Qi Yang, Yitao Wang, Xiao-Jia Chen.** *Ophiopogon japonicus and its active compounds: A review of potential anticancer effects and underlying mechanisms.* *Phytomedicine*, 2023, 113, 154718-154730.
4. **Yanan Li, Pingping Dong, Zhanpeng Shang, Long Dai, Shaoping Wang and Jiayu Zhang.** *Unveiling the Chemical Composition of Sulfur-Fumigated Herbs: A Triple Synthesis Approach Using UHPLC-LTQ-Orbitrap MS—A Case Study on Steroidal Saponins in Ophiopogonis Radix.* *Molecules*, 2024, 29, pp.702-738.
5. **Xian-En Li, Yu-Xia Wang, Peng Sun, and Deng-Qun Liao.** *Determination of Saponin Content in Hang Maidong and Chuan Maidong via HPLC-ELSD Analysis.* *Journal of Analytical Methods in Chemistry*, 2016, pp.1-5.
6. **Mengxia Tan, Jiali Chen, Chengcheng Wang, Lisi Zou, Shuyu Chen, Jingjing Shi, Yuqi Mei, Lifang Wei and Xunhong Liu.** *Quality Evaluation of Ophiopogonis Radix from Two Different Producing Areas.* *Molecules*, 2019, 24, pp.3220-3233.
7. **Peng Sun, Juhua Tong, and Xianen Li.** *Evaluation of the Effects of Paclitaxel and Cultivation Years on Saponins in Ophiopogon japonicus Using UPLC-ELSD.* *International Journal of Analytical Chemistry*, 2020, pp.1-8.
8. **Min-Hui Chen, Fong Leong, Si-Jia Gao, Xin Chen, Jin-Jian Lu, Li-Gen Lin, Yitao Wang and Xiao-Jia Chen.** *Comparison of Ophiopogon japonicus and Liriope spicata var. prolifera from Different Origins Based on Multi-Component Quantification and*

Anticancer Activity. *Molecules*, 2023, 28, pp.1045-1059.

9. **Chun-Hua Liu, Ming Li, Ya-Qian Feng, Yuan-Jia Hu, Bo-Yang Yu, Jin Qi.** Determination of Ruscogenin in *Ophiopogonis Radix* by High-performance Liquid Chromatography-evaporative Light Scattering Detector Coupled with Hierarchical Clustering Analysis. *Pharmacognosy Magazine*, 2016, pp.13-20.
10. **Feiyi Lei, Michael Heinrich, Eike Reich, Caroline Weckerle.** Quality variation of *maidong* (*Ophiopogon japonicus* and *Liriope spicata*) – A HPTLC-based approach. *Journal of pharmaceutical and Biomedical analysis*, 2024, 241, pp. 115990-115997.
11. **Bộ Y tế-Hội đồng Dược điển.** *Dược điển Việt Nam V*, Nhà xuất bản Y học Hà Nội, 2017, tr.1241-1242.
12. **Chinese Pharmacopoeia Commission.** *Pharmacopoeia of the people's republic of China*, China Medical Science Press, 2020, tr.329-330.
13. **Department of Health, Hong Kong special administrative region, The people's republic of China.** *Hong Kong Chinese Materia Medica Standards*, Chinese Medicine Regulatory Office, 2010, quyển 3, tr.167-176.
14. **Nguyen Dinh Chung, Nguyen Phuong Thao, Ha Manh Tuan, Nguyen Van Thanh, Nguyen Hai Dang, Nguyen Thi Mai Huong and Nguyen Tien Dat.** New Steroidal Glycoside and Flavonoid Constituents from *Ophiopogon japonicus*. *Natural product communication*, 2017, 12(6), pp.905-906.
15. **AOAC International.** *AOAC guidelines for single laboratory validation of chemical method for dietary supplements and botanicals*, 2012.