

ĐỊNH LƯỢNG SAPONIN TOÀN PHẦN TRONG DƯỢC LIỆU GIẢO CỔ LAM (*GYNOSTEMMA PENTAPHYLLUM*) 5 LÁ VÀ 7 LÁ THU HÁI TẠI THÁI NGUYÊN BẰNG PHƯƠNG PHÁP ĐO QUANG

**Bùi Thị Luyến*, Phạm Thị Tuyết Nhung,
Nguyễn Thu Quỳnh, Nguyễn Duy Thu, Nguyễn Thị Cải**
Trường Đại học Y Dược - ĐH Thái Nguyên

TÓM TẮT

Mục tiêu: Xây dựng quy trình định lượng saponin toàn phần trong giảo cổ lam bằng phương pháp đo quang. Từ quy trình đã xây dựng tiến hành định lượng và so sánh hàm lượng saponin toàn phần trong dược liệu Giảo cổ lam 5 lá và 7 lá thu hái tại Thái Nguyên.

Phương pháp: Định lượng saponin toàn phần trong giảo cổ lam bằng phương pháp đo quang. Chiết xuất saponin trong dược liệu bằng phương pháp siêu âm với dung môi ethanol 70%. Tinh chế bằng n – butanol. Saponin toàn phần thu được thực hiện tiến hành phản ứng Rosenthaler, sử dụng dung dịch màu tạo thành sau phản ứng để đo quang. Lượng saponin toàn phần được tính theo đường chuẩn của Gypenoside XVII chuẩn.

Kết luận: Đã ứng dụng phương pháp đo quang để định lượng saponin toàn phần trong giảo cổ lam, hàm lượng saponin toàn phần ở loài 7 lá: 5,76% và loài 5 lá: 4,69%.

Từ khóa: định lượng, giảo cổ lam, saponin toàn phần, độ hấp thụ tử ngoại UV-vis

Ngày nhận bài: 19/9/2019; Ngày hoàn thiện: 16/10/2019; Ngày đăng: 17/10/2019

QUANTIFICATION OF TOTAL SAPONIN IN *GYNOSTEMMA PENTAPHYLLUM* WITH 5 LEAVES AND 7 LEAVES COLLECTED IN THAI NGUYEN BY PHOTOMETRIC METHOD

**Bui Thi Luyen*, Pham Thi Tuyet Nhung,
Nguyen Thu Quynh, Nguyen Duy Thu, Nguyen Thi Cai**
University of Medicine and Pharmacy - TNU

ABSTRACT

Objective: Developing a procedure to quantify total saponins in *gynostemma pentaphyllum*. therefore, quantitative and comparative the content of total saponin in *gynostemma pentaphyllum* with 5 leaves and 7 leaves which were collected in Thai Nguyen by photometric method.

Method: Quantify total saponin in *gynostemma pentaphyllum* by photometric method. Extract saponins in medicinal herbs by ultrasonic method with 70% ethanol solvent. Refined with n – butanol. The total saponin obtained was performed by Rosenthaler reaction, using color solution formed after the reaction to measure photometer. The total saponin content was calculated using the Gypenoside XVII calibration curve.

Conclusion: Applied photometric method to quantify total saponin in *gynostemma pentaphyllum*, there was more content of total saponin in *gynostemma pentaphyllum* with 7 leaves (5.76%) than 5 leaves (4.69%).

Key words: quantification, wholives, total saponins, UV-vis spectrophotometric, *gynostemma pentaphyllum*

Received: 19/9/2019; Revised: 16/10/2019; Published: 17/10/2019

* Corresponding author. Email: builuyentn@gmail.com

1. Đặt vấn đề

Giảo cổ lam là một vị thuốc được sử dụng từ lâu đời ở nhiều nước châu Á với công dụng tăng cường sức khỏe và tuổi thọ. Nhiều báo cáo khoa học chứng minh thành phần chính của giảo cổ lam là flavonoid và saponin, với tác dụng: hạ đường huyết, chống oxy hóa bảo vệ tế bào gan, giảm cholesterol và triglycerol trong máu..., trong đó saponin được cho là thành phần có tác dụng sinh học chủ yếu này. Do tác dụng tốt cho sức khỏe nên sản phẩm của Giảo cổ lam tiêu thụ mạnh trên thị trường nhiều nước Châu Á, Châu Âu và cả ở Hoa Kỳ. Tuy nhiên gần đây, một số kết quả nghiên cứu đưa ra có sự khác nhau về thành phần hóa học trong các sản phẩm của Giảo cổ lam lưu hành trên thị trường [1], [2], [3]. Sự khác nhau về thành phần hóa học có thể liên quan đến loài Giảo cổ lam 5 lá và 7 lá. Xuất phát từ nhu cầu thực tế trên, chúng tôi tiến hành đề tài: "Định lượng saponin toàn phần trong dược liệu Giảo cổ lam (*Gynostemma pentaphyllum*) 5 lá và 7 lá thu hái tại Thái Nguyên bằng phương pháp đo quang".

2. Nguyên liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Nguyên liệu, hóa chất, thiết bị

Nguyên liệu

- Các mẫu Giảo cổ lam 5 lá và 7 lá được thu hái tại Thái nguyên, phơi khô, độ ẩm dưới 10%, nghiền nhỏ rây qua rây có cỡ mắt 0,25 mm và bảo quản nơi khô ráo.

- Chất chuẩn: Chất chuẩn Gypenoside XVII được cung cấp bởi Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương.

-Hóa chất, thuốc thử: vanillin, acid acetic băng, acid perchloric, methanol, ethyl acetat và n-butanol. Các hóa chất, thuốc thử đều đạt tiêu chuẩn tinh khiết phân tích.

- Dụng cụ, thiết bị: Tủ sấy, cân phân tích; máy đo hàm ẩm XM 60, Thụy Sĩ; bể điều nhiệt Sartorius, Đức; Máy cất chân không; Máy quang phổ UV-VIS Hitachi U-1900; bếp điện; bếp đun cách thủy.

2.2. Phương pháp nghiên cứu: Nghiên cứu thực nghiệm

2.2.1. Xây dựng phương pháp

Kỹ thuật lựa chọn để phân tích: phương pháp đo quang cần phải tiến hành tạo màu bằng phản ứng Rosenthaler giữa dung dịch mẫu và dung dịch thử với thuốc thử vanillin/acid acetic băng, acid perchloric.

Điều kiện phân tích được khảo sát: Quét phổ hấp thụ trong khoảng bước sóng 420-700nm của mẫu chuẩn và mẫu trắng sau khi thực hiện phản ứng tạo màu. Sử dụng bước sóng cực đại thu được để tiến hành khảo sát các yếu tố ảnh hưởng tiếp theo.

Khảo sát quá trình sử lý mẫu: phương pháp chiết (Soxhlet hoặc siêu âm); dung môi chiết gồm methanol, ethanol 70%, ethanol 90% ; tỷ lệ dung môi : dược liệu khác nhau; thời gian chiết khác nhau.

2.2.2. Thẩm định phương pháp

Thẩm định các tiêu chí theo hướng dẫn của AOAC: tính chọn lọc, khoảng tuyến tính, độ đúng, độ chính xác (độ lặp lại).

2.2.3. Ứng dụng

Định lượng saponin toàn phần trong dược liệu Giảo cổ lam 5 lá và Giảo cổ lam 7 lá thu hái tại Thái Nguyên.

2.2.4. Xử lý số liệu

Các số liệu thực nghiệm xử lý thống kê bằng phần mềm Microsoft Office Excel.

Tính kết quả

Dựa vào đường chuẩn tính được nồng độ saponin C ($\mu\text{g/ml}$).

Gọi M là khối lượng dược liệu ban đầu sử dụng.

a là hàm ẩm dược liệu; V là thể tích dung dịch chiết; k hệ số pha loãng

$$m_{\text{saponin toàn phần}} = k \times V \times C (\mu\text{g}) = k \times 10^{-6} \times V \times C$$

Hàm lượng saponin toàn phần có trong giảo cổ lam

$$X\% = \frac{m_{\text{saponin toàn phần}}}{m_{\text{dược liệu}}} = \frac{k \times 10^{-6} \times V \times C}{M(1-a)} \times 100$$

(*)

3. Kết quả nghiên cứu

3.1. Chuẩn bị mẫu

Dung dịch chuẩn gốc gypenoside XVII 0,2 mg/ml: cân chính xác 10,0 mg chất chuẩn

gypenoside XVII pha trong methanol vừa đủ 50 ml.

Dung dịch chuẩn: Hút chính xác 1,0 ml dung dịch chuẩn gốc gypenoside XVII vào bình định mức 10ml, pha loãng vừa đủ 10,0 ml bằng methanol.

Dung dịch thử: Cân chính xác khoảng 1,0 g bột dược liệu cho vào cốc có mỏ 100 ml, thêm 20 ml dung môi chiết mẫu, lắc nhẹ, chiết mẫu theo cách thích hợp. Lọc dịch chiết bằng giấy lọc (Bỏ 10 ml dịch lọc đầu). Lấy 25 ml dịch lọc cho vào bình cất quay, cất thu hồi dung môi dưới áp suất giảm đến còn 1-2 ml. Tráng bình cất quay 2 lần, mỗi lần với khoảng 5 ml nước cất, chuyển dịch vào bình gạn. Tráng tiếp bình cất với 10 ml n-butanol đã bão hòa nước (5 ml x 2 lần), tập trung vào bình gạn. Lắc trong 5 phút. Tách lấy phần n-butanol vào bình cầu. Chiết bằng n-butanol 2 lần nữa, lần lượt là 10 ml và 5 ml. Tập trung dịch chiết n-butanol vào bình cầu. Cất thu hồi dung môi dưới áp suất giảm tới gần, hòa tan gần trong 10 ml x 5 ml x 5 ml EtOH 70% chuyển vào bình định mức 25 ml và thêm EtOH 70% vừa đủ 25 ml. Hút chính xác 5 ml dung dịch này cho vào bình định mức 50 ml và thêm EtOH 70% vừa đủ đến vạch. Lấy

chính xác 2,0 ml dung dịch thử tiến hành phản ứng màu Rosenthaler.

Dung dịch placebo: lấy chính xác 2,0 ml dung môi mẫu placebo cho vào ống nghiệm, cô cách thủy đến gần và tiếp tục tiến hành tương tự như cách chuẩn bị dung dịch thử.

Thuốc thử vanilin /acid acetic băng 5%: Cân 0,5 g vanilin pha trong acid acetic băng vừa đủ 10 ml.

3.2. Xây dựng phương pháp

Khảo sát điều kiện đo quang

Quét hấp thụ trong khoảng 420-700 nm của dung dịch chuẩn đã tiến hành phản ứng tạo màu rosenthaler với mẫu trắng là MeOH (được làm phản ứng màu tương tự mẫu thử). Phổ hấp thụ của gypenoside XVII đạt cực đại tại bước sóng 555 nm. Do đó chúng tôi lựa chọn bước sóng 555 nm là bước sóng khảo sát.

3.3. Khảo sát và lựa chọn quy trình xử lý mẫu

Phương pháp chiết

Tiến hành chiết bằng hai phương pháp Soxhlet (thời gian chiết 4 giờ) và siêu âm (thời gian chiết 2 giờ), cố định các thông số còn lại (dung môi chiết: ethanol 70%, nhiệt độ chiết: 80°C, tỉ lệ dược liệu: dung môi = 1: 20). Kết quả khảo sát được trình bày trong Bảng 1.

Bảng 1. Ảnh hưởng phương pháp chiết đến mật độ quang

Pp chiết	Chiết soxhlet			Chiết siêu âm		
	Mẫu 1	Mẫu 2	Mẫu 3	Mẫu 1	Mẫu 2	Mẫu 3
A/m	0,400	0,364	0,362	0,369	0,400	0,365
Trung bình	0,375 ± 0,002			0,378 ± 0,0019		

Nhận xét: kết quả cho thấy tỉ số A/m của hai phương pháp xấp xỉ như nhau. Phương pháp siêu âm có ưu điểm: thời gian chiết ngắn hơn, phương pháp đơn giản. Do vậy lựa chọn phương pháp siêu âm để chiết xuất.

Dung môi chiết

Tiến hành chiết bằng dung môi khác nhau: methanol (MeOH), ethanol (EtOH) 70%, ethanol 90%, cố định các thông số còn lại (chiết bằng phương pháp siêu âm, thời gian chiết 1 giờ, nhiệt độ chiết 80°C, tỉ lệ dược liệu: dung môi = 1: 20). Kết quả như bảng 2.

Bảng 2. Ảnh hưởng của dung môi chiết đến mật độ quang

Dung môi	MeOH			EtOH 70%			EtOH 90%		
	Mẫu 1	Mẫu 2	Mẫu 3	Mẫu 1	Mẫu 2	Mẫu 3	Mẫu 1	Mẫu 2	Mẫu 3
A/m	0,361	0,364	0,356	0,359	0,360	0,357	0,310	0,316	0,317
Trung bình	0,360 ± 0,004			0,358 ± 0,0017			0,314 ± 0,0054		

Nhận xét bảng 2: Căn cứ vào bảng cho thấy tỷ số A/m là tương đương nhau khi chiết bằng dung môi MeOH (0,360), EtOH 70% (0,358) còn khi chiết bằng EtOH 90% thấp hơn (0,314). MeOH là dung môi độc và giá thành cao hơn EtOH, vì vậy EtOH 70% được lựa chọn làm dung môi chiết.

Bảng 3. Ảnh hưởng của thời gian chiết đến mật độ quang

Thời gian	30 phút			45 phút			60 phút			75 phút		
	Mẫu 1	Mẫu 2	Mẫu 3	Mẫu 1	Mẫu 2	Mẫu 3	Mẫu 1	Mẫu 2	Mẫu 3	Mẫu 1	Mẫu 2	Mẫu 3
A/m	0,261	0,254	0,256	0,339	0,340	0,337	0,340	0,336	0,343	0,338	0,338	0,339
Trung bình	0,257 ± 0,004			0,339 ± 0,0015			0,340 ± 0,0035			0,339 ± 0,0007		

Bảng 4. Ảnh hưởng của tỉ lệ dược liệu : dung môi chiết đến mật độ quang

Dược liệu: Dung môi	A/m			
	Mẫu 1	Mẫu 2	Mẫu 3	Trung bình
1:20	0,366	0,362	0,362	0,363 ± 0,002
1:30	0,372	0,368	0,368	0,369 ± 0,002
1:40	0,390	0,395	0,387	0,391 ± 0,004
1:50	0,444	0,450	0,453	0,449 ± 0,003
1:60	0,410	0,416	0,418	0,415 ± 0,003

Thời gian chiết

Tiến hành chiết mẫu bằng phương pháp siêu âm với dung môi EtOH 70%, thời gian chiết thay đổi: 30 phút, 45 phút, 60 phút, 75 phút. Cố định các thông số còn lại (phương pháp chiết siêu âm, dung môi chiết EtOH 70%, nhiệt độ chiết 80°C, tỉ lệ dược liệu: dung môi = 1: 20). Kết quả được mô tả trong Bảng 3.

Nhận xét bảng 3: kết quả cho tỷ số A/m cho thấy thời gian chiết 45 phút cho hiệu suất tương đương với 60 phút và 75 phút (0,339; 0,340; 0,339). Thời gian chiết 30 phút cho tỷ số A/m thấp nhất (0,257). Do vậy, lựa chọn thời gian chiết xuất là 45 phút.

Khảo sát tỷ lệ dược liệu: dung môi

Tiến hành chiết mẫu bằng dung môi EtOH 70% với tỷ lệ lần lượt là 1:20, 1: 30, 1: 40, 1:50; 1:60. Cố định các thông số còn lại (phương pháp chiết siêu âm, dung môi chiết EtOH 70%, nhiệt độ chiết 80°C, thời gian chiết 45 phút). Kết quả trình bày ở bảng 4.

Nhận xét bảng 4: kết quả cho thấy mật độ quang đo được ở tỷ lệ dược liệu: dung môi 1:50 là cao nhất (0,449), mật độ quang đo được ở tỷ lệ dược liệu: dung môi 1:20 là thấp nhất (0,363). Vì vậy lựa chọn tỷ lệ dung môi: dược liệu là 1:50.

Tinh chế saponin

n-butanol là dung môi có khả năng hòa tan chọn lọc saponin, vì vậy dùng dung môi này để tinh chế saponin.

Từ các kết quả khảo sát thu được ở trên, điều kiện phân tích saponin toàn phần trong Giáo cổ lam được lựa chọn như sau:

Quy trình chiết mẫu và tinh chế saponin toàn phần

Cân chính xác khoảng 1,00 g bột dược liệu cho vào cốc có mỏ 100 ml, thêm 20 ml dung môi EtOH 70%, lắc nhẹ, siêu âm 20 phút ở nhiệt độ 80°C. Gạn dịch lọc. Chiết lần 2 với 20 ml dung môi trong 10 phút. Chiết tiếp lần 3 với 10 ml dung môi trong 10 phút. Gộp toàn bộ dịch chiết, lọc lấy dịch lọc (Bỏ 10ml dịch lọc đầu). Lấy 25 ml dịch lọc cho vào bình cất quay, cất thu hồi dung môi dưới áp suất giảm đến còn 1-2 ml. Tráng bình cất quay 2 lần, mỗi lần với khoảng 5 ml nước cất, chuyển dịch vào bình gạn. Tráng tiếp bình cất với 10 ml n-butanol đã bão hòa nước (5 ml x 2 lần), tập trung vào bình gạn. Lắc trong 5 phút. Tách lấy phần n-butanol vào bình cầu. Chiết bằng n-butanol 2 lần nữa, lần lượt là 10 ml và 5 ml. Tập trung dịch chiết n-butanol vào bình cầu. Cất thu hồi dung môi dưới áp suất giảm tới gần, hòa tan cân trong 10 ml x 5 ml x 5 ml EtOH 70% chuyển vào bình định mức 25 ml và thêm EtOH 70% vừa đủ 25 ml. Hút chính xác 5 ml dung dịch này cho vào bình định mức 50 ml và thêm EtOH 70% vừa đủ đến vạch.

Phản ứng màu và đo quang: lấy chính xác 2,0 ml dung dịch mẫu cho vào ống nghiệm, cô cách thủy đến gần. Thêm 0,6 ml dung dịch vanillin 5% trong acid acetic băng và 2,0 ml acid perchloric 72%. Đậy kín ống nghiệm, ủ trong nồi cách thủy ở 80°C trong 30 phút. Ngâm ống nghiệm trong nước đá, sau đó chuyển vào bình định mức 10 ml, tráng ống nghiệm bằng ethyl acetat, tập trung vào bình

định mức trên và bổ sung ethyl acetat vừa đủ đến vạch. Lắc đều.

Đo độ hấp thụ ở bước sóng 555 nm; mẫu trắng là EtOH 70% được làm song song trong cùng điều kiện.

Tính kết quả: Hàm lượng saponin toàn phần trong mẫu thử (%) tính theo gypenoside XVII được tính theo công thức (*).

3.4. Thẩm định phương pháp phân tích

Bảng 6. Kết quả đánh giá ảnh hưởng của dung môi chiết

	Độ hấp thụ			Trung bình
Mẫu chuẩn	0,682	0,679	0,685	0,682
Mẫu placebo	0,003	0,005	0,003	0,0037
Ảnh hưởng của mẫu placebo	0,76%			

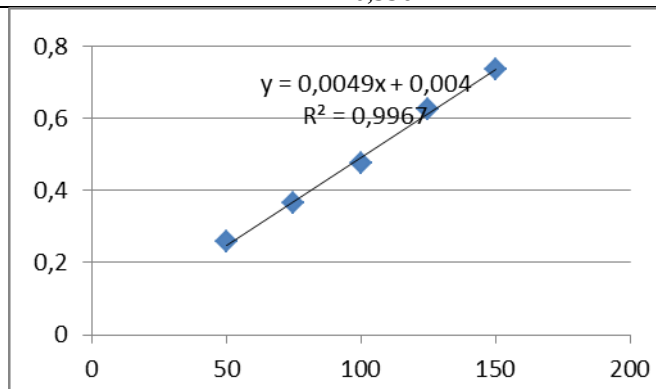
Tại bước sóng định lượng (555 nm), mẫu placebo có đáp ứng, tuy nhiên độ hấp thụ của mẫu placebo không đáng kể ($0,0037 < 1,0\%$) so với đáp ứng độ hấp thụ của mẫu chuẩn. Do đó, có thể kết luận phương pháp có độ chọn lọc đạt yêu cầu.

Độ tuyến tính

Tiến hành đo độ hấp thụ của dung dịch chuẩn gốc gypenoside XVII ở 5 nồng độ khác nhau (50-150 µg/ml). Kết quả khảo sát sự tương quan giữa độ hấp thụ và nồng độ của gypenoside XVII được trình bày ở bảng 7 và hình 1.

Bảng 7. Kết quả khảo sát tính tuyến tính của quy trình định lượng

Nồng độ chất chuẩn (µg/ml)	50	75	100	125	150
Mật độ quang (abs)	0,257	0,364	0,676	0,625	0,736
Phương trình hồi quy tuyến tính	$Y = 0,0049x + 0,004$				
Hệ số tương quan	$R^2 = 0,9967$				



Hình 1. Đồ thị biểu diễn tương quan tuyến tính giữa nồng độ saponin gypenoside XVII và độ hấp thụ

Nhận xét: Với hệ số tương quan $R^2 = 0,9967$, có sự tương quan tuyến tính giữa nồng độ gypenoside XVII và độ hấp thụ.

Độ lặp lại

Tiến hành định lượng trên một mẫu thử, làm 6 lần độc lập song song trong cùng một điều kiện thí nghiệm. Hàm lượng saponin toàn phần theo gypenoside XVII trong mẫu thử tính theo được liệu khô được trình bày trong bảng 8.

Bảng 8. Kết quả khảo sát độ lặp lại của phương pháp

STT	Lượng cân	Độ hấp thụ	Độ ẩm	Nồng độ saponin tìm lại theo đường chuẩn (µg/ml)
1	1,0026	0,695	6,55%	100,20
2	1,0285	0,503		101,84
3	1,0047	0,691		99,39
4	1,0109	0,688		98,78
5	1,0300	0,500		101,22
6	1,0008	0,684		97,96
Hàm lượng trung bình (%)				99,898

RSD (%) = 1,47%

Chuẩn gypenoside XVII: nồng độ 100µg/ml

Độ hấp thụ: 0,680

Nhận xét: độ lặp lại của phương pháp với RSD = 1,47% đạt yêu cầu của AOAC.

Bảng 9. Kết quả khảo sát độ đúng của phương pháp

STT	Lượng mẫu thử	Lượng chuẩn thêm	Độ hấp thụ	Lượng chuẩn thu hồi	Độ thu hồi	Kết quả
1	0,5023	80	0,893	80,61	100,76	TB= 100,60
2	0,5053	80	0,895	81,02	101,28	RSD= 0,77%
3	0,5175	80	0,889	79,80	99,75	
4	0,5090	100	0,980	98,37	98,37	TB= 99,52
5	0,5075	100	1,008	100,61	100,61	RSD= 1,13%
6	0,5055	100	0,986	99,59	99,59	
7	0,5201	120	1,086	119,18	99,32	TB= 100,39
8	0,5035	120	1,099	122,65	102,21	RSD= 1,57%
9	0,5001	120	1,084	119,59	99,66	

Bảng 10. Kết quả xác định hàm lượng saponin toàn phần trong giảo cổ lam (GCL) 5 lá và giảo cổ lam 7 lá

GCL 5 lá						
STT	Lượng mẫu thử trung bình (g)	Độ ẩm (%)	Độ hấp thụ trung bình (abs)	Nồng độ saponin toàn phần (µg/ml)	Hàm lượng saponin toàn phần (%)	Hàm lượng saponin toàn phần trung bình
1	1,0023	6,2	0,436	88,16	4,7	4,69 ± 0,16 %
2	1,1053	6,8	0,532	100,76	4,9	
3	1,0175	6,8	0,436	88,16	4,6	
4	1,0090	6,5	0,445	90,00	4,7	
5	1,0075	6,3	0,462	93,50	4,95	
6	1,0020	6,2	0,422	85,32	4,5	
7	1,0003	6,7	0,418	84,50	4,5	
GCL 7 lá						
STT	Lượng mẫu thử trung bình (g)	Độ ẩm (%)	Độ hấp thụ trung bình (abs)	Nồng độ saponin toàn phần (µg/ml)	Hàm lượng saponin toàn phần (%)	Hàm lượng saponin toàn phần trung bình
1	1,0043	6,8	0,504	102,04	5,5	5,76 ± 0,58 %
2	1,1103	6,8	0,598	121,22	5,9	
3	1,0075	6,8	0,608	123,27	6,6	
4	1,1050	6,8	0,531	107,55	5,2	
5	1,0275	6,6	0,500	101,22	5,3	
6	1,1000	6,8	0,537	108,78	5,3	
7	1,0275	6,6	0,615	124,69	6,5	

Độ đúng

Độ đúng được xác định bằng phương pháp thêm một lượng chính xác saponin gypenoside XVII chuẩn vào mẫu thử đã xác định hàm lượng sao cho tổng nồng độ nằm trong khoảng tuyến tính đã

khảo sát. Tiến hành chiết và định lượng như ở quy trình phân tích đã đưa ra, từ kết quả thu được xác định độ thu hồi của phương pháp. Thực hiện ở lượng thêm vào tương ứng 80%, 100%, 120% so với nồng độ phân tích trong dung dịch thử. Kết quả thu được trong bảng 9.

Nhận xét: Kết quả thu được với độ thu hồi của saponin toàn phần (tính theo gypenoside XVII) từ 98,37 đến 102,21%, chỉ số này đa số nằm đạt yêu cầu về thẩm định phương pháp đối với phân tích mẫu theo AOAC (nằm trong khoảng 97-103% với hàm lượng 1-10%)[7].

Từ kết quả thẩm định thu được cho thấy phương pháp phân tích có tính đặc hiệu cao, độ lặp lại và độ thu hồi đạt yêu cầu tốt theo AOAC, do vậy có thể áp dụng định lượng mẫu nghiên cứu.

3.5. Định lượng saponin toàn phần trong giảo cổ lam (GCL) 5 lá và giảo cổ lam 7 lá

Tiến hành phân tích trên mẫu giảo cổ lam 5 lá và 7 lá. Xử lý mẫu và tiến hành đo quang mỗi mẫu thử làm 3 lần riêng biệt. Tính hàm lượng saponin toàn phần trong mẫu theo công thức (*). Kết quả trình bày trong bảng 10.

Nhận xét bảng 10: hàm lượng saponin toàn phần trung bình trong giảo cổ lam 5 lá là $4,69 \pm 0,16\%$ và thấp hơn giảo cổ lam 7 lá: $5,76 \pm 0,58 \%$.

4. Bàn luận

4.1. Về phương pháp chiết xuất và tinh chế mẫu

Kết quả nghiên cứu đã lựa chọn được các thông số tối ưu để xử lý mẫu: phương pháp chiết siêu âm, dung môi chiết là ethanol 70%, tỉ lệ dung môi: được liệu = 1: 50. Đây là phương pháp chiết đơn giản, dung môi rẻ tiền, dễ kiếm, không độc hại và dễ thực hiện trong điều kiện phòng thí nghiệm,

Phương pháp tinh chế: Có hai phương pháp tinh chế saponin là chiết lỏng - lỏng bằng n-butanol và chiết pha rắn với cột nhồi Diaion HP – 20, tuy nhiên do chiết pha rắn yêu cầu kỹ thuật phức tạp, cột chiết đắt tiền, người phân tích cần có kinh nghiệm [9], [10] nên trong nghiên cứu này phương pháp chiết lỏng - lỏng với dung môi n-butanol có khả năng hòa tan chọn lọc saponin là phù hợp và có tính kinh tế cao. Sự lựa chọn dung môi tinh chế trong nghiên cứu này cũng phù hợp theo Chuyên luận giảo cổ lam tại Dược điển Việt Nam V [8].

4.2. Khảo sát điều kiện đo quang

Nhóm chất chính trong Giảo cổ lam là saponin với khoảng 100 saponin khác nhau có tên gọi chung là gypenoside. Theo kinh nghiệm sử dụng trong dân gian dùng dạng nước hãm toàn cây, do vậy lựa chọn đối tượng định lượng nhóm chất saponin toàn phần là hợp lý. Các nghiên cứu trước đã sử dụng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao, sắc ký lỏng kết nối với khối phổ đã xác định được gần 34 gypenoside như Rb₁, Rb₃, malonyl Rb₁, malonyl Rd, Rf, gylongiposid, gypenoside XVII, XLIX [5].... Căn cứ vào thành phần gypenoside trong Giảo cổ lam và tính sẵn có của chất chuẩn, nghiên cứu này đã lựa chọn gypenoside XVII làm chất đối chiếu để định lượng saponin toàn phần là phù hợp.

Nguyên tắc của phương pháp đo quang đòi hỏi dung dịch đo độ hấp thụ phải có màu. Các saponin có đặc điểm thường không màu và ít hấp thụ ánh sáng, vì vậy cần phải tại ra dung dịch có màu để thực hiện phép phân tích. Nghiên cứu đã tiến hành tạo màu bằng phản ứng Rosenthaler giữa saponin toàn phần trong dịch chiết được liệu với thuốc thử vanillin/acid acetic băng và acid perchloric. [5].

Dựa trên các tài liệu tham khảo và tiến hành thực nghiệm: chúng tôi đã khảo sát được điều kiện đo quang: xác định bước sóng cực đại 555 nm, xây dựng được hệ thống các điều kiện về thời gian, nhiệt độ và nồng độ các thuốc thử tiến hành phản ứng tạo màu [...].

4.3. Thẩm định phương pháp định lượng

Sau khi xây dựng được quy trình phân tích, các điều kiện làm phản ứng đo quang. Kết quả thẩm định phương pháp định lượng có tính đặc hiệu cao, độ lặp lại và độ thu hồi tương đối tốt. đa số các chỉ số nằm trong khoảng yêu cầu về thẩm định phương pháp đối với phân tích mẫu của AOAC. Việc đánh giá cho thấy phương pháp đã xây dựng là phù hợp, ứng dụng được để định lượng saponin toàn phần trong giảo cổ lam.

4.4. Kết quả định lượng trong các mẫu giảo cổ lam 5 lá và 7 lá

Kết quả định lượng saponin toàn phần trong giảo cổ lam 5 lá và 7 lá thu hái tại Thái Nguyên có sự khác nhau, trong giảo cổ lam 7 lá saponin toàn phần đạt 5,76% cao hơn so với loại 5 lá (4,69%). So với kết quả nghiên

cứu của nhóm tác giả Phạm Thanh Kỳ về hàm lượng saponin toàn phần của giáo cổ lam trồng ở Hòa bình và Tam đảo Vĩnh Phúc thì giáo cổ lam thu hái tại Thái Nguyên có hàm lượng saponin toàn phần cao hơn loại trồng ở Tam Đảo (4,12%). So với loại trồng ở Hòa Bình (5,1%) thì loại 5 lá trồng ở Thái Nguyên có hàm lượng saponin toàn phần thấp hơn, nhưng loại 7 lá có hàm lượng cao hơn [10].

Hiện nay theo kinh nghiệm dân gian thường sử dụng giáo cổ lam 5 lá. Tuy nhiên với kết quả của nghiên cứu thì giáo cổ lam thu hái tại Thái Nguyên loại 5 lá có hàm lượng saponin thấp hơn so với loại 7 lá; bên cạnh đó nhóm chất saponin trong giáo cổ lam là thành phần có liên quan đến các tác dụng của dược liệu. Vì vậy cần có nghiên cứu so sánh tác dụng sinh học của hai loại giáo cổ lam 5 lá và 7 lá.

5. Kết luận

Chúng tôi triển khai thực nghiệm và thu được các kết quả sau:

- Đã khảo sát được phương pháp chiết xuất và tinh chế để thu được saponin toàn phần trong giáo cổ lam.

- Đã xây dựng và thẩm định được phương pháp định lượng saponin toàn phần bằng phương pháp quang phổ dùng saponin gypenoside XVII là chất đối chiếu.

Phương pháp định lượng saponin toàn phần đã được thẩm định đáp ứng yêu cầu của AOAC đối với mẫu thử dược liệu. Kết quả thu được cho thấy các tiêu chí thẩm định tính chọn lọc ảnh hưởng của mẫu placebo là không đáng kể, khoảng tuyến tính của gypenoside 50-150 $\mu\text{g/ml}$ cho thấy mối tương quan chặt chẽ giữa nồng độ hoạt chất và độ hấp thụ với $r=0,9967$, độ lặp lại cao với $\text{RSD}=1,47\%$ đạt yêu cầu AOAC ($\leq 2,7\%$), độ thu hồi từ 98,37 đến 102,21%, đa số nằm trong khoảng yêu cầu về thẩm định phương pháp đối với phân tích mẫu của AOAC [7].

- Đã ứng dụng phương pháp phân tích để định lượng saponin toàn phần trong Giáo cổ lam 5 lá và 7 lá thu hái tại Thái nguyên. Hàm lượng saponin toàn phần trong GCL 5 lá đạt 4,69% và thấp hơn so với GCL 7 lá (5,76%).

6. Đề xuất

Nghiên cứu mới chỉ thực hiện trên 7 mẫu thu hái tại Thái Nguyên. Vì vậy chúng tôi xin đưa ra đề xuất sau:

- Cần thu nhập thêm các mẫu GCL 5 lá và 7 lá của loài này từ các vùng khác nhau trong cả nước và tại các mùa khác nhau từ đó khẳng định thêm về kết quả so sánh hàm lượng saponin toàn phần trong GCL 5 lá và 7 lá. Ngoài ra, đánh giá được vùng nào cho điều kiện tốt để phục vụ nhu cầu canh tác.

- Tiến hành thử tác dụng chống oxy hóa, bảo vệ tế bào gan nhằm so sánh tác dụng của GCL 5 lá và 7 lá để khẳng định xem loại GCL nào tốt hơn, phục vụ cho nhu cầu sử dụng dược liệu cũng như sản phẩm chế biến từ dược liệu không ngừng tăng lên.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1]. Phạm Hoàng Bộ, *Cây cỏ Việt Nam*, Nxb Trẻ, quyển 1, tr.563-575, 1999
- [2]. Phạm Thanh Kỳ và đồng sự, “Nghiên cứu tác dụng tăng đáp ứng miễn dịch của dược liệu Giáo cổ lam (*Gynostemma pentaphyllum* (Thumb.)”, *Tạp chí thông tin Y dược* số 5, tr.35-38, 2007.
- [3]. Phạm Thanh Hương, *Nghiên cứu thành phần hóa học và tác dụng sinh học của cây Giáo cổ lam Gynostemma pentaphyllum* (Thumb.)makido - Cucurbitaceae, Luận văn Thạc sỹ Dược học, Trường Đại học Dược Hà Nội, 2003.
- [4]. Zhuohong Xie, Margaret Slavin, Huiping Zhou, et al, (2010), “Chemical composition of five commercial *Gynostemma pentaphyllum* samples and their radical scavenging, antiproliferative, and anti – inflammatory properties”, *J. Agric Food chemistry*, 58, pp. 11243-11249.
- [5]. Ngô Văn Thu, Trần Hùng, *Dược liệu học tập I*, Nxb Y học, 2011.
- [6]. Ngô Văn Thu, *Hóa học saponin*, khoa Dược-Trường Đại học Y Dược Thành phố Hồ Chí Minh, trang 109-114, 1990.
- [7]. AOAC International, *Validation and Qualification in Analytical Laboratories*, Second Edition, 2007.
- [8]. Bộ Y tế, *Dược điển Việt Nam V*, chuyên luận Giáo cổ lam, 2018
- [9]. Kao, T. H., et al , “Determination of flavonoids and saponins in *Gynostemma pentaphyllum* (Thumb.) Makino by liquid chromatography – mass spectrometry”, *Analytica Chimica Acta*, 626, (2), pp. 237-241, 2008.
- [10]. Phạm Tuấn Anh, Phạm Thanh Kỳ, Trịnh Thị Diệp Thanh, “Định lượng saponin toàn phần trong giáo cổ lam *Gynostemma pentaphyllum* (Thumb.) Makino trồng ở 3 vùng bằng phương pháp đo quang”, *Tạp chí Dược học*, số 2, tr. 54, 2014.