

Đặc điểm dấu vân tay TLC và HPLC của ginsenoside có trong một số loài thuộc chi *Panax*

Bùi Thế Vinh* và Võ Sỹ Nhật

¹ Trường Đại học Quốc Tế Hồng Bàng

TÓM TẮT

Đặt vấn đề: Ginsenoside là saponin chính trong các loài thuộc chi *Panax*, có nhiều tác dụng dược lý quan trọng đặc trưng cho chi này. Nghiên cứu này đánh giá đặc điểm dấu vân tay sắc ký lớp mỏng (TLC) và sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) của các ginsenoside có trong một số loài thuộc chi *Panax*, qua đó giúp phân biệt các loài thuộc chi *Panax*. **Mục tiêu nghiên cứu:** Xây dựng đặc điểm dấu vân tay TLC và HPLC các ginsenoside có trong một số loài thuộc chi *Panax*. **Đối tượng và phương pháp nghiên cứu:** Phương pháp TLC và HPLC được áp dụng để xây dựng đặc điểm dấu vân tay hóa học ginsenoside có trong các loài sâm thuộc chi *Panax*. **Kết quả:** Kết quả TLC và HPLC của các ginsenoside trong các loài trong chi *Panax* được trình bày và so sánh. Bên cạnh đó, hàm lượng G-Rg1 và G-Rb1 Tam Thất được xác định lần lượt là 0.814% và 1,656%, trong sâm Trung Quốc là 0.42% và 5,843%, trong sâm Mỹ là 0.375% và 2,965% và trong sâm Việt Nam là 0.629% và 0.878%. Ngoài ra sâm Việt Nam còn có M-R2 hàm lượng là 0.836%. **Kết luận và kiến nghị:** Kết quả trên có thể được sử dụng để phân tích, so sánh, phân biệt một số loài sâm thuộc chi *Panax*, cần thu thập, phân tích thêm các loài sâm khác để có thêm dữ liệu tổng thể hơn về chi *Panax*.

Từ khóa: *Panax*, dấu vân tay TLC, HPLC, ginsenoside

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Từ xưa đến nay sâm đã được xem là loại dược liệu quý bởi công dụng của chúng, hiện nay trên thế giới có rất nhiều loại sâm hữu ích và đang được sử dụng rộng rãi như nhân sâm, sâm Mỹ, Tam thất... Và tại Việt Nam cũng đã phát hiện được một loại dược liệu quý thuộc chi *Panax* ở là sâm Việt Nam (*Panax vietnamensis*) [1]. Bên cạnh việc so sánh, phân biệt các loài này dựa trên đặc điểm hình thái, vi phẫu, di truyền DNA thì kỹ thuật dấu vân tay hóa học bằng TLC và HPLC so sánh đặc điểm cũng có vai trò quan trọng giúp nhận định sự giống và khác biệt về thành phần chính của sâm là các ginsenoside. Ginsenoside là các saponin triterpene. Hầu hết các ginsenoside đều gồm một khung dammarane (17 cacbon trong cấu trúc bốn vòng) với nhiều gốc đường khác nhau (glucose, rhamnose, xylose và arabinose) được gắn vào các vị trí C-3 và C-20. Ngoài ra, còn có một số ginsenoside hiếm, chẳng hạn như saponin ocotillol

F11 (24-R-pseudoginsenoside) và saponin oleanane pentacyclic Ro (3,28-o-bisdesmoside), hay như majonoside-R2 (MR-2), một saponin ocotillol được biết đến chỉ có ở sâm Việt Nam *panax vietnamensis* [2]. Nghiên cứu này đánh giá đặc điểm dấu vân tay TLC và HPLC của các ginsenoside có trong một số loài thuộc chi *Panax*, từ đó góp phần so sánh, phân biệt các loài này dựa trên đặc điểm dấu vân tay hóa học ginsenoside.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU VÀ VẬT LIỆU NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu

- Chất chuẩn MR2, G-Rb₁, G-Rg₁ (tinh khiết trên 95%, HPLC),
- Mẫu dược liệu khô sâm Việt Nam (6 năm tuổi) được cung cấp bởi Phòng Hóa – Chế Phẩm, trung tâm Sâm và Dược liệu Thành phố Hồ Chí Minh.

Tác giả liên hệ: TS. Bùi Thế Vinh
Email: vinhbt@hiu.vn

- Mẫu Tam thất, sâm Mỹ và sâm Trung Quốc (6 năm tuổi) được cung cấp bởi Nhà thuốc Y học cổ truyền Đông Hoàng, Thành phố Hồ Chí Minh.

- CHCl_3 , MeOH, EtOAc, n-Bu, EtOH, Toluene, acid acetic, HCOOH tinh khiết đạt chuẩn phân tích dùng để triển khai sắc ký.

- Máy HPLC của Shimadzu với hệ thống bơm LC-20AT, Degasser DGU20A, đầu dò dây diode quang SPD-20A và cột Supelco C18.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

- Chuẩn bị mẫu thử: Cân chính xác khoảng 3 gam bột dược liệu, chiết Soxhlet với 300 mL MeOH trong 4 giờ. Cô giảm áp dịch chiết thu được cạn MeOH. Hòa cồn MeOH với 20 mL nước cất, chuyển vào bình lắc gạn 100mL, chiết lỏng lỏng với diethyl ether đến khi dịch diethyl ether hết màu, gạn bỏ dịch diethyl ether. Tiếp tục chiết dịch nước, chiết lỏng lỏng với n-BuOH. Tập trung dịch n-BuOH, chuyển vào bình lắc gạn 250 mL, rửa với nước cất 3 lần, mỗi lần 20 mL. Cô giảm áp dịch n-BuOH thu được cạn n-BuOH chứa saponin toàn phần. Cồn n-butanol hòa với 10 mL methanol, lọc qua màng lọc 0,45 μm , dịch lọc được đem định tính bằng sắc ký lớp mỏng và định lượng bằng sắc ký lỏng hiệu năng cao.

2.2.1. Sắc ký lớp mỏng

- Chuẩn bị mẫu chuẩn: M-R2, G-Rb1, G-Rg1, G-Rd tinh khiết >95% (HPLC) được pha ở nồng độ khoảng 100 $\mu\text{g/mL}$.

- Hệ dung môi pha động: Khảo sát trên 3 hệ dung môi pha động cho TLC gồm: Hệ 1: n-BuOH - acid acetic - nước (7:1:2); Hệ 2: n-butanol: ethylacetate: nước (5:1:5, lấy lớp trên); Hệ 3: Ethyl acetate: acid acetic: nước (8:2,5:1);

- Tiến hành: Chấm riêng lẻ khoảng 10 μL mỗi dịch thử và dịch chuẩn lên bản mỏng. Khai triển bản mỏng trên hệ dung môi đã chọn trong bình kín. Sau khi khai triển xong lấy bản mỏng ra, để khô ở nhiệt độ phòng.

- Phát hiện: Phun thuốc thử H_2SO_4 10% trong cồn, để khô rồi đem sấy ở 105°C đến khi hiện rõ vết.

2.2.2. Sắc ký lỏng hiệu năng cao

- Chuẩn bị mẫu chuẩn: Cân 3,6 mg M-R₂; 0,97 mg G-Rg₁; 1,2 mg G-Rb₁ pha trong bình định mức 10 mL với acetonitrile và nước (tỉ lệ 7:3) để có được dung dịch mẹ.

Từ dung dịch chuẩn tiến hành pha loãng thành các dung dịch chuẩn có nồng độ:

+ Dung dịch chuẩn M-R2 có nồng độ 72 - 144 - 216 - 288 - 360 $\mu\text{g/mL}$.

+ Dung dịch chuẩn G-Rg1 có nồng độ 97.0 - 77.6 - 58.2 - 38.8 - 19.4 $\mu\text{g/mL}$.

+ Dung dịch chuẩn G-Rb1 có nồng độ 24 - 48 - 72 - 96 - 120 $\mu\text{g/mL}$.

- Chương trình rửa giải: Chương trình rửa giải được thực hiện theo tham khảo các công bố trước đây về định tính, định lượng ginsenoside có trong sâm Việt Nam [3 - 4] với một chút điều chỉnh để có sắc ký dấu vân tay đồ phù hợp với các mẫu khác.

Bảng 1. Sắc ký lỏng

Thời gian	Acetonitril	Nước
0-20 phút	22	78
20-34 phút	28	72
34-44 phút	34	66
44-58 phút	43	57
58-65 phút	85	15
65-70 phút	85	15
70-72 phút	20	80
72-85 phút	22	78
85-90 phút	22	78

Hàm lượng của các saponin được tính theo công thức:

$$C\% = (X * V * 100) / (a * (1 - p) * 10^6)$$

Trong đó:

X: Nồng độ suy từ đường chuẩn ($\mu\text{g/mL}$)

a: Khối lượng mẫu (g)

V: Thể tích hòa mẫu (mL)

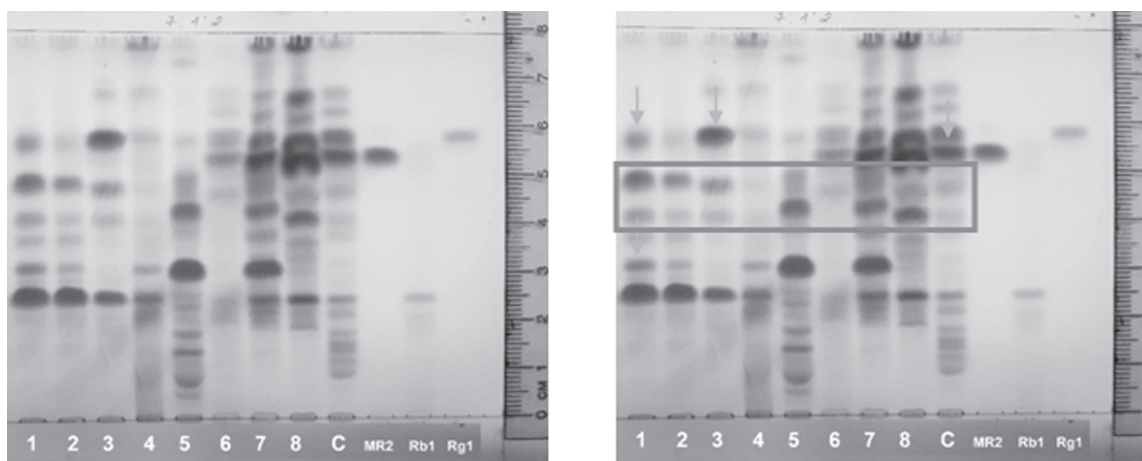
p: Độ ẩm (%)

10⁶: Hệ số chuyển đổi từ g thành μg

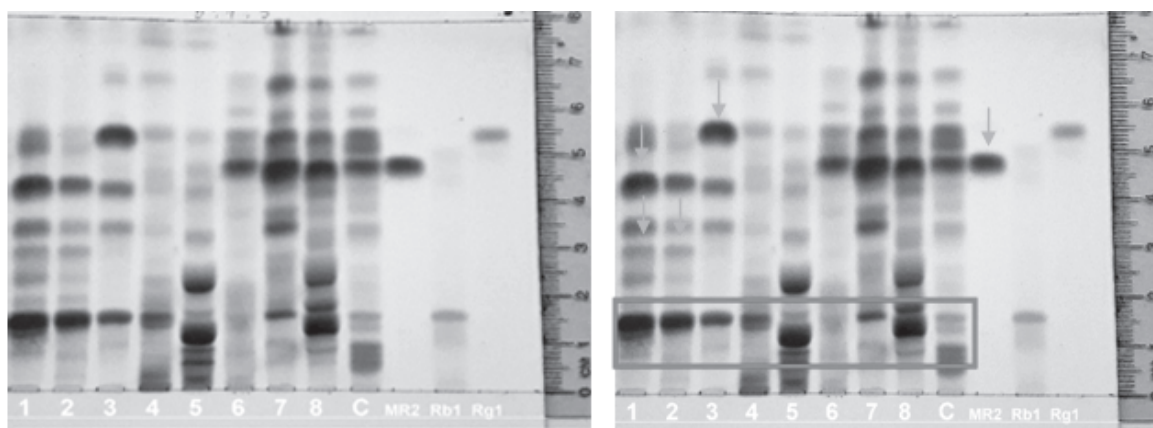
3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Sắc ký lớp mỏng

Trên sắc ký đồ đối với hệ 1 (7: 1: 2) giá trị R_f của 3



Hình 1. Sắc đồ SKLM saponin các mẫu sâm so sánh với các chất chuẩn của hệ 1: n-BuOH - acid acetic - nước (7:1:2)
1: Sâm Mỹ; 2: Sâm Trung Quốc; 3: Tam thất; C: Sâm Việt Nam chuẩn; 4-8: các mẫu tên gọi “Sâm Việt Nam” thu nhận ngoài thị trường; các chuẩn: MR2; Rb1; Rg1.



Hình 2. Sắc đồ SKLM saponin các mẫu sâm so sánh
với các chất chuẩn của hệ 2: n- butanol: ethylacetate: nước (5:1:5, lớp trên)
1: Sâm Mỹ; 2: Sâm Trung Quốc; 3: Tam thất; C: Sâm Việt Nam chuẩn; 4-8: các mẫu tên gọi “Sâm Việt Nam” thu nhận ngoài thị trường; các chuẩn: MR2; G-Rb1; G-Rg1.

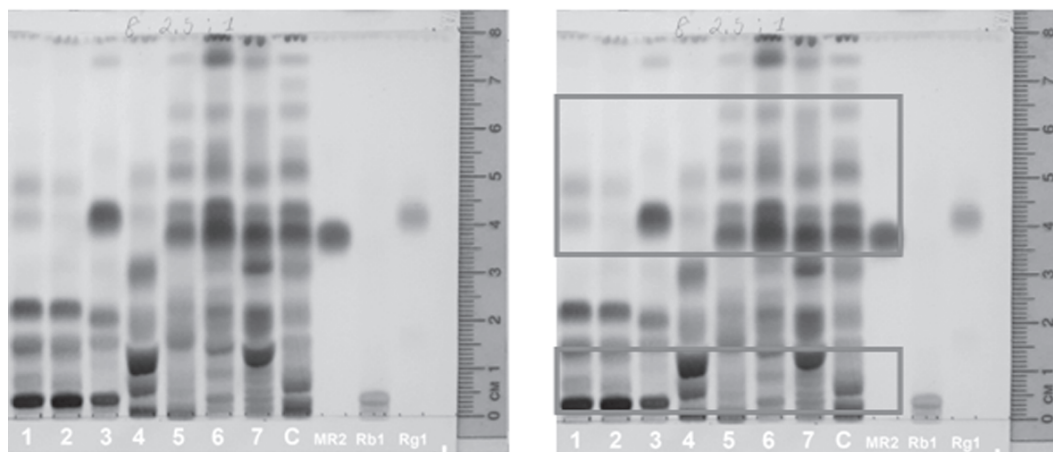
mẫu chuẩn MR2; Rb1; Rg1 lần lượt là 0.6; 0.25; 0.69. Các vết chất Saponin của các mẫu có khác nhau tại các vị trí đánh dấu, sâm Việt Nam có vết MR2 khác biệt so với các mẫu sâm khác.

Trên sắc ký đồ đối với hệ dung môi n- Butanol: ethyl acetate: nước (5:1:5) giá trị R_f các vết chuẩn MR2; Rb1; Rg1 lần lượt là: 0,56; 0,16; 0,6. Các chuẩn MR₂ và Rg, phân tách rõ hơn so với hệ 1 (7:1:2). Các vết chất Saponin của các mẫu có khác nhau tại các vị trí đánh dấu, sâm Việt Nam có vết MR2 khác biệt so với các mẫu sâm khác.

Hệ dung môi n-butanol:acid acetic:nước (Hệ 1; 7: 1: 2) tách tốt hợp chất saponin có trong mẫu sâm, tuy nhiên hai vết chuẩn MR2 và G-Rg1 khoảng cách khá gần nhau.

Hệ dung môi n- butanol: ethylacetate: nước (Hệ 2; 5:1:5) tách tốt các chất có trong hợp chất saponin của mẫu sâm, các vết chuẩn G-Rb₁, MR₂, G-Rg₁ tách biệt rõ ràng.

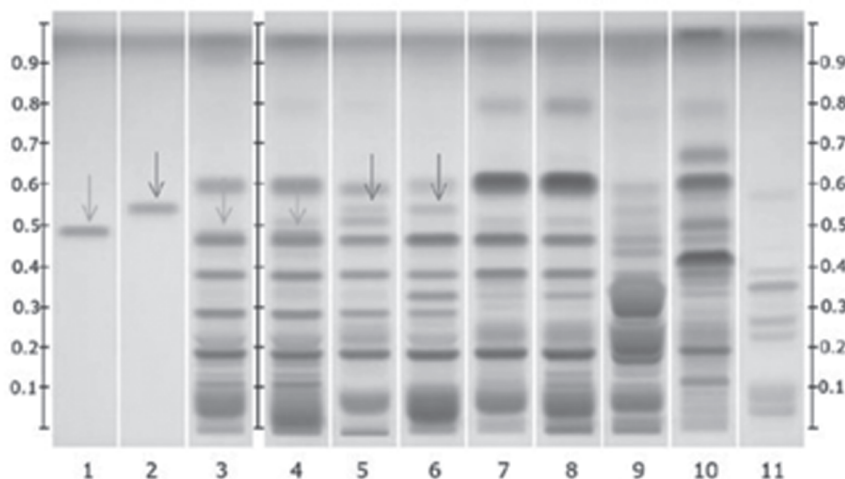
Hệ dung môi ethylacetate: acid acetic: nước (8:2,5:1) các vết chuẩn MR₂, G-Rg₁ tách biệt rõ ràng, G-Rb₁ có R_f rất thấp. Dấu vân tay TLC các mẫu có sự khác biệt trong vùng được đánh dấu. Kết quả dấu vân tay TLC trên các hệ khác nhau cho thấy có thể áp dụng, so sánh các loài khác nhau trong chi *Panax*. Kết quả này cũng được so sánh với công bố của Tiên Do, Melanie Broszat, Matthias Nold. (2018) đánh giá dấu vân tay sắc ký lớp mỏng hiệu năng cao (HPTLC) của các loài sâm Mỹ (*P. quinquefolium*); Tam Thất (*P. notoginseng*); sâm Nhật (*P. japonicas*); sâm Việt



Hình 3. Sắc đồ SKLM saponin các mẫu sâm

so sánh với các chất chuẩn của hệ 3: Ethyl acetate: acid acetic: nước (8:2,5:1)

1: Sâm Mỹ; 2: Sâm Trung Quốc; 3: Tam thất; C: Sâm Việt Nam chuẩn; 4-7: các mẫu tên gọi “Sâm Việt Nam” thu nhận ngoài thị trường; các chuẩn: MR2; G-Rb1; G-Rg1.



Hình 4. HPTLC (Ethyl acetate – water – butanol 25:50:100, lớp trên),

phát hiện: Anisaldehyde / sulfuric acid. (Analytix Reporter, ISSUE 2, 2018, Merck.) [5]

1: ginsenoside Rf; 2: ginsenoside F11; 3, 4: dịch chiết và rễ sâm Trung Quốc (*P. ginseng*); 5, 6: Dịch chiết và rễ sâm Mỹ (*P. quinquefolium*); 7, 8: Dịch chiết và rễ Tam Thất (*P. notoginseng*); 9: Rễ sâm Nhật (*P. japonicas*); 10: Rễ sâm Việt Nam trồng (*P. vietnamensis*); 11: Rễ sâm Việt Nam tự nhiên.

Nam (*P. vietnamensis*); so với hai chuẩn ginsenoside Rf; ginsenoside F11. (Hình 4) [5].

3.2. Sắc ký lỏng hiệu năng cao

Sắc ký đồ chất chuẩn

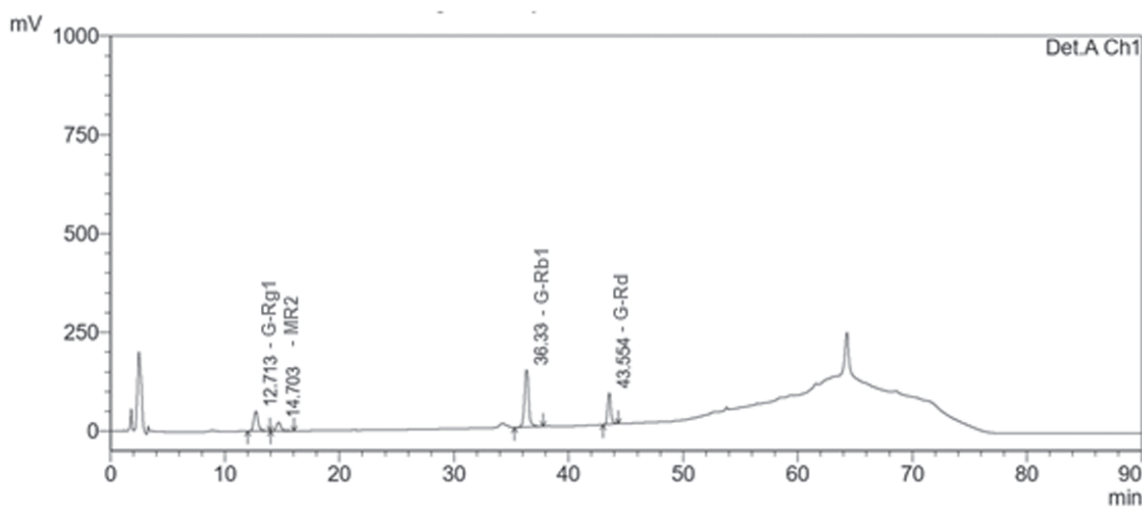
Kết quả HPLC cho thấy ở bước sóng 203 nm phát hiện được 3 chuẩn G-Rg1, G-Rb1 và G-Rd và không có sự xuất hiện của M-R2. Cũng với chương trình như trên, dùng bước sóng 196 nm thì thấy có sự xuất hiện của M-R2 ở phút thứ 14. Kết quả này phù hợp với những nghiên cứu trước đây [3, 6], bước sóng phát hiện G-Rg1, G-Rb1 và G-Rd là 203 nm, M-R2

là 196 nm.

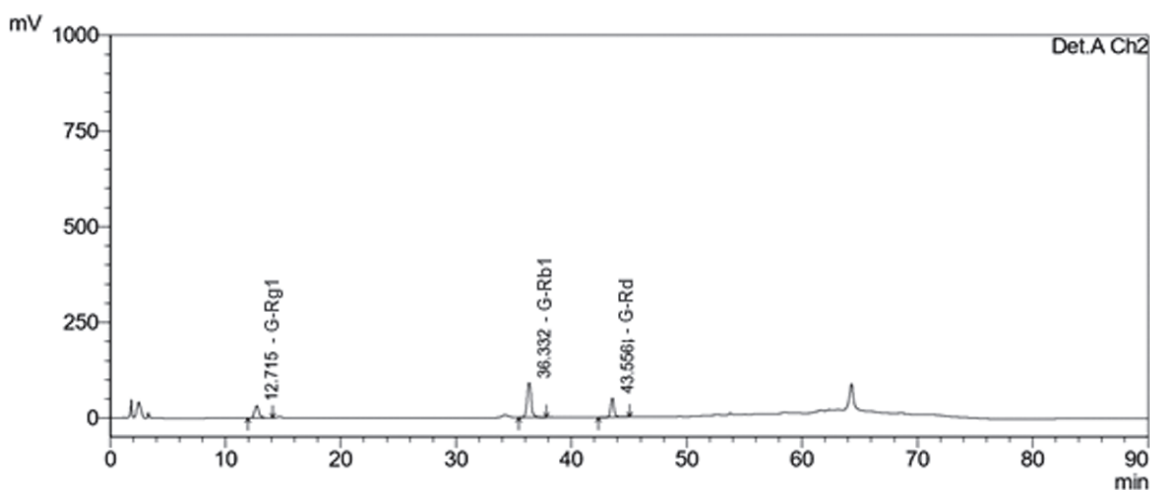
- Thời gian lưu lần lượt là G-Rg1~12 phút, M-R2~ 14 phút, G-Rb1~ 36 phút và G-Rd ~ 43 phút.

- Sắc ký đồ của các mẫu phân tích có nhiều peak khác nhau cho thấy mỗi mẫu sâm có sự hiện diện của nhiều loại saponin. Dựa vào sắc ký đồ toàn phần có thể so sánh sự khác nhau về thành phần của các loài.

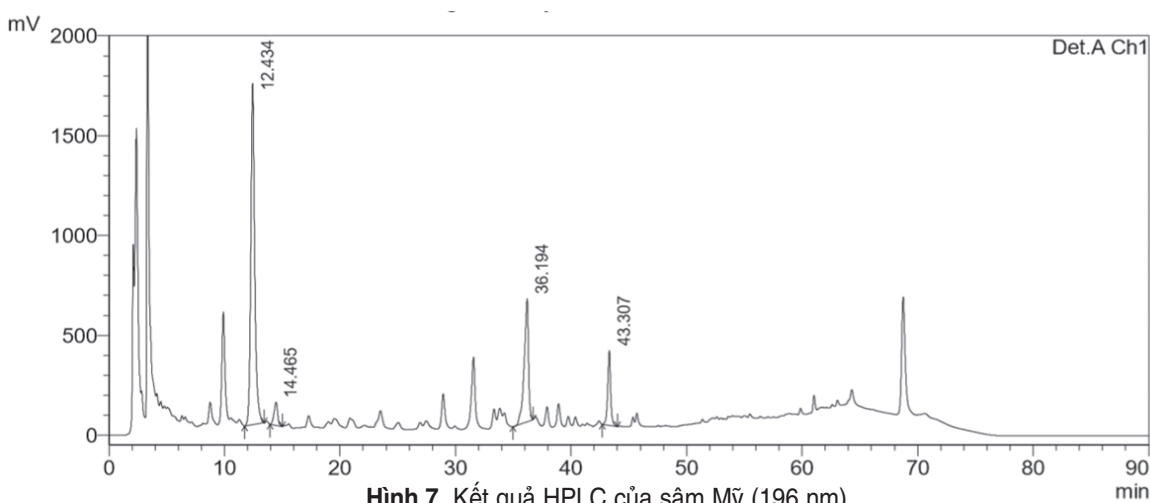
- Ở mẫu sâm Mỹ, sâm Trung Quốc, Tam Thất đều có xuất hiện những peak ở thời gian lưu lần lượt xấp xỉ 12, 36, 43 phút ứng với thời gian lưu của các chất



Hình 5. Sắc ký đồ 4 chuẩn G-Rg1, M-R2, G-Rb1 và G-Rd ở bước sóng 196 nm



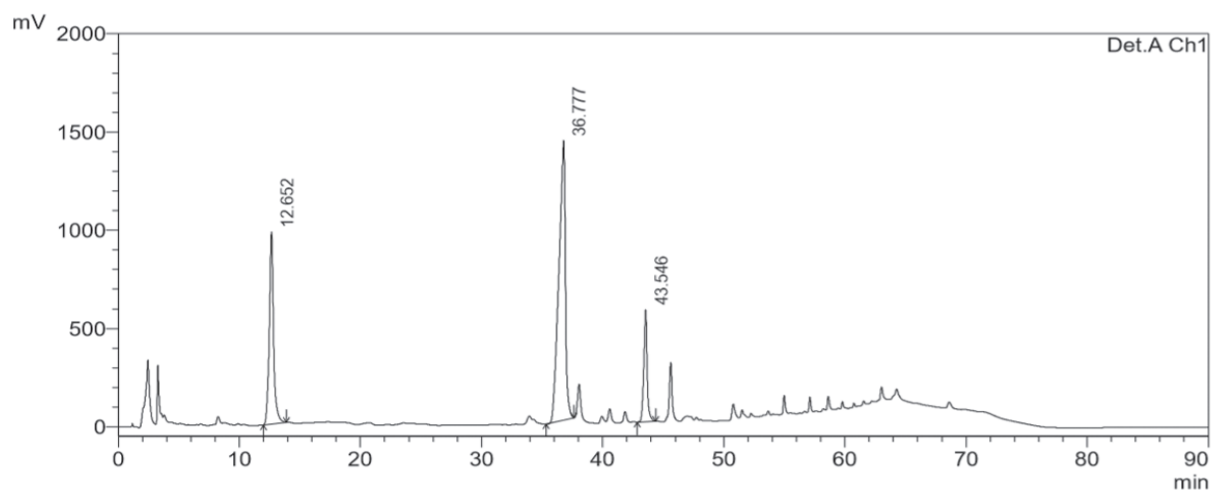
Hình 6. Sắc ký đồ 3 chuẩn G-Rg1, G-Rb1 và G-Rd ở bước sóng 203 nm



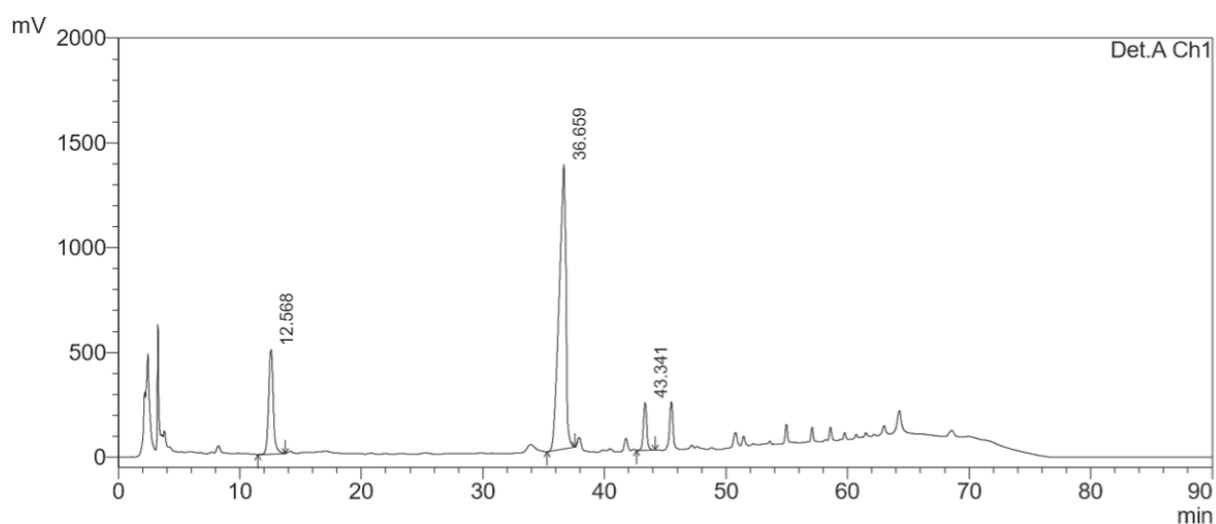
Hình 7. Kết quả HPLC của sâm Mỹ (196 nm)

chuẩn G-Rg1, G-Rb1 và G-Rd ở phần kết quả trên. Nhưng ở phút 14 không thấy sự xuất hiện của M-R2 (sắc ký đồ ở bước sóng 196 nm), điều này đúng với

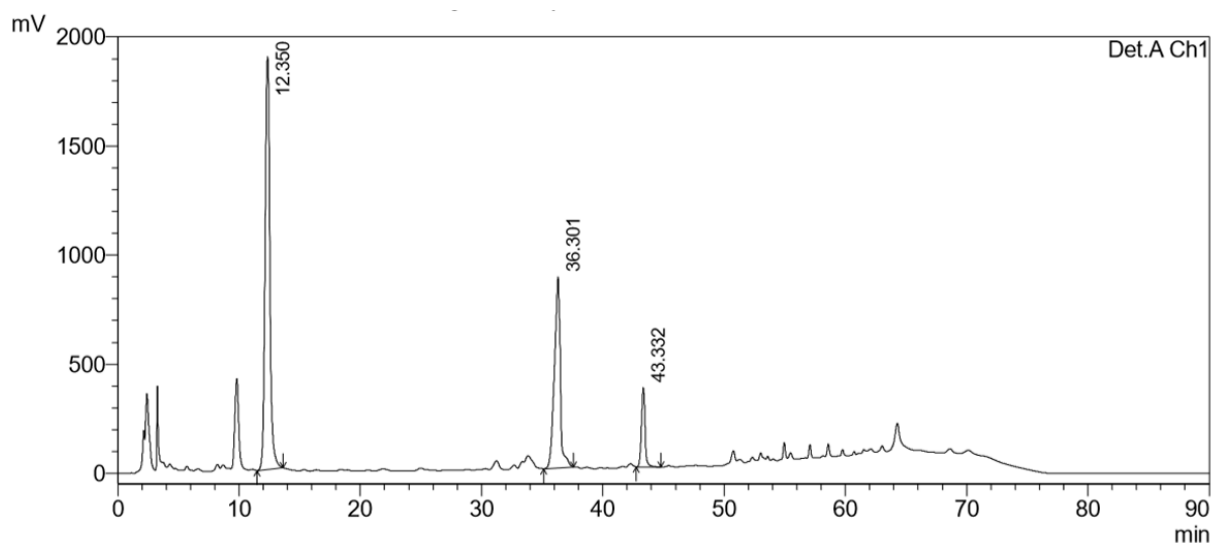
lý thuyết và kết quả sắc ký lớp mỏng.
- Ở sâm Việt Nam ở bước sóng 196 nm xuất hiện peak ở phút 14 vậy trong sâm Việt Nam có sự hiện



Hình 8. Kết quả HPLC của sâm Trung Quốc (196 nm)



Hình 9. Kết quả HPLC của Tam Thất (196 nm)



Hình 10. Kết quả HPLC của sâm Việt Nam (196 nm)

diện của M-R2, đây là hợp chất saponin đặc trưng cho sâm Việt Nam.

Bảng 1 tổng hợp giá trị thời gian lưu và diện tích peak

của các mẫu phân tích, xác định hàm lượng của G-Rg1, G-Rb1 tại bước sóng 203 nm và M-R2 tại bước sóng 196 nm.

Bảng 2. Giá trị thời gian lưu và diện tích peak của các mẫu phân tích

		Sâm Mỹ	Sâm Trung Quốc	Tam Thất	Sâm Việt Nam
G-Rg1	Thời gian lưu (phút)	12,653	12,569	12,352	12,436
	Diện tích peak (mAU.s)	14,715,840	8,198,577	31,973,020	24,804,700
M-R2	Thời gian lưu (phút)	-	-	-	14,465
	Diện tích peak (mAU.s)	-	-	-	2,454,766
G-Rb1	Thời gian lưu (phút)	36,778	36,661	36,303	36,195
	Diện tích peak (mAU.s)	32,713,625	32,079,771	18,333,295	9,746,492

Bảng 3. Hàm lượng của từng loại saponin trong các mẫu phân tích

Hàm lượng C% Nguyên liệu	G-Rg1	M-R2	G-Rb1
Sâm Mỹ	0.375		2,965
Sâm Trung Quốc	0.420		5,843
Tam Thất	0.814		1,656
Sâm Việt Nam	0.629	0.836	0.878

- Hàm lượng của G-Rb1 cao hơn so với G-Rg1 ở hầu hết các loài thuộc chi *Panax*. Hàm lượng G-Rg1 của Tam Thất là cao nhất (0.814%), giảm dần là sâm Việt Nam (0.629%), sâm Trung Quốc (0.42%), và thấp nhất là sâm Mỹ (0.375%). Hàm lượng G-Rb1 của sâm Trung Quốc là cao nhất (5,843%), giảm dần là sâm Mỹ (2,965%), Tam Thất (1,656%), và thấp nhất sâm Việt Nam là (0.878%). Hàm lượng M-R2 trên sâm Việt Nam là 0.836%.

4. KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

Đặc điểm dấu vân tay TLC và HPLC của các

ginsenoside trong các loài trong chi *Panax* được trình bày và so sánh. Đặc điểm dấu vân tay TLC cũng được khảo sát trên các hệ pha động khác nhau để phân biệt đối chiếu các saponin trong cùng mẫu và trong các mẫu, đồng thời kết quả cũng được đối chiếu với một công bố khác trên cùng các đối tượng phân tích.

Kết quả trên có thể được sử dụng để phân tích, tham chiếu để so sánh, phân biệt một số loài sâm thuộc chi *Panax*, trong điều kiện còn giới hạn về số lượng mẫu thu thập, cần thu thập, phân tích thêm các loài sâm khác cũng thuộc chi này để có thêm dữ liệu tổng thể hơn về chi *Panax*.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Nguyen Minh Duc et al., "New saponins from Vietnamese ginseng: highlights on biogenesis of dammarane triterpenoids, in Saponins Used in Traditional and Modern Medicine.", *Springer*. p. 129-149, 1996.
- [2] Kazuo Yamasaki, "Bioactive saponins in

Vietnamese ginseng, *Panax Vietnamensis*.", *Pharmaceutical Biology*, 38(1), p. 16-24, 2000.

- [3] Bùi Thế Vinh, Trần Công Luận. "Xây dựng phương pháp định lượng G-Rb1, G-Rg1 và MR2 trong Sâm Ngọc Linh bằng kỹ thuật sắc ký lỏng hiệu năng cao", *Tạp chí Dược liệu*, 16(44), 2011.

- [4] Dược điển Việt Nam V, 2017. 2, 2018.
- [5] Tiên Do, Melanie Broszat, Matthias Nold, "High-Performance Thin-Layer Chromatography: A Fast and Efficient Fingerprint Analysis Method for Medicinal Plants.", *Merck, Analytix Reporter*, issue 38(2), p. 154-159, 2014.
- [6] Le Thi Hong Van et Al., "Processed Vietnamese ginseng: preliminary results in chemistry and biological activity.", *Journal of ginseng research*, 38(2), p. 154-159, 2014.

TLC and HPLC fingerprints of ginsenosides from different Panax species

Bui The Vinh and Vo Sy Nhat

ABSTRACT

Background: The saponin is a major ingredient of many medicinal plants, it is also found in species of the genus Panax as ginsenoside compounds, ginsenoside has many important pharmacological effects specific to this genus. This study evaluates the TLC and HPLC fingerprint characteristics of ginsenosides present in some species of panax genus, thereby contributing to the comparison and differentiation of these species based on ginsenoside fingerprint characteristics. Objective: This study evaluates the fingerprint characteristic of ginsenosides presented in some species of the genus panax, thereby comparing and discriminating the differentiation these species. Method: Thin layer chromatography (TLC) and high performance liquid chromatography (HPLC) methods are applied to contribute the fingerprints of ginsenosides characterization in Panax species. Moreover, the content of ginsenoside substances G-Rg1, G-Rb1 and MR-2 were determined. Results: TLC and HPLC fingerprint characteristics of ginsenosides in some species genus panax are presented and compared. In addition, the HPLC results also determined that the G-Rg1 and G-Rb1 content of Panax notoginseng were 0.814% and 1,656%, respectively; "Chinese ginseng" was 0.42% and 5,843%; "American ginseng" was 0.375% and 2,965% . and in "Vietnamese ginseng" was 0.629% and 0.878%. Especially, "Vietnamese ginseng" also has M-R2 content of 0.836%. Conclusions: The results can be used for comparing and distinguishing some Panax ginseng species. In the limited condition of the number of samples collected, it is necessary to collect and analyze more species of other ginsengs of this genus for more comprehensive data on the genus panax.

Keywords: Panax, ginsenoside, TLC and HPLC fingerprint

Received: 21/04/2023

Revised: 12/05/2023

Accepted for publication: 12/05/2023