

Nghiên cứu chiết xuất saponin toàn phần và định tính ginsenoside Rb_1 , Re , Rg_1 trong sâm ngọc linh tự nhiên và sâm ngọc linh sinh khối bằng phương pháp sắc ký lớp mỏng hiệu năng cao

Trần Quang Trung*; Trịnh Văn Lầu*

TÓM TẮT

Nghiên cứu xây dựng đ-ợc ph-ơng pháp chiết xuất saponin toàn phần trong sâm Ngọc Linh tự nhiên và sâm Ngọc Linh sinh khối bằng cách đun hồi l-u mẫu thử với methanol trong 1 giờ. Ly tâm, lấy một l-ợng chính xác dịch trong cô trên cách thủy đến khô, hoà tan trong n-ớc. Sau đó, làm sạch bằng chiết pha rắn trên cột RP - C18 đã hoạt hoá. Rửa cột bằng n-ớc và methanol 30%. Cuối cùng, phần hấp phụ bằng methanol.

Đã xây dựng đ-ợc ph-ơng pháp định tính 3 ginsenoside Rb_1 , Re , Rg_1 ph-ơng pháp sắc ký lớp mỏng hiệu năng cao (HPTLC) với 3 hệ dung môi: chloroform/MeOH/H₂O = 13/7/2 (lớp d-ới); n-Butanol/AcOEt/H₂O = 4/1/5 (lớp trên); chloroform/AcOEt/MeOH/H₂O = 15/40/22/10.

* Từ khóa: Sâm Ngọc Linh; Saponin; Ginsenoside; Ph-ơng pháp sắc ký lớp mỏng hiệu năng cao.

Study on the extraction of total saponin and building qualitative analysis method of ginsenoside Rb_1 , Re , Rg_1 in ngoclinh ginseng and its plant cell by high performance thin layer chromatography

SUMMARY

We established total saponin extractive process in Ngoclinh ginseng and its plant cell by heating ginseng powder (ginseng's plant cell powder) with methanol under reflux on a water bath for 1 hour. Separated extractive solution from the residue by centrifuge. Evaporated the extractive solution to dryness, then dissolved in water and loaded into the cartridge. Poured water and methanol 30% into the cartridge to wash. Finally, substances eluted from the column by methanol.

We established the qualitative analysis method of ginsenoside Rb_1 , Re , Rg_1 in Ngoclinh ginseng and its plant cell by high performance thin layer chromatography using three solvent system: Chloroform/MeOH/H₂O = 13/7/2 (lower layer); n-butanol/AcOEt/H₂O = 4/1/5 (Upper layer); chloroform/AcOEt/MeOH/H₂O = 15/40/22/10.

* Key words: Ngoclinh ginseng; Saponin; Ginsenoside Rb_1 , Re , Rg_1 ; High performance thin layer chromatography.

* Học viện Quân y

** Viện Kiểm nghiệm Thuốc Trung Ương

Phản biện khoa học: PGS. TS. Nguyễn Văn Minh

ĐẶT VẤN ĐỀ

Sắc ký lớp mỏng là một ph-ơng pháp dùng trong phân tích và kiểm nghiệm thuốc, ph-ơng pháp này đơn giản, dễ sử dụng, trang bị rẻ, có thể áp dụng đối với nhiều loại mẫu khác nhau, thời gian phân tích nhanh,

độ nhạy cao, đặc biệt với kỹ thuật sắc ký lớp mỏng hiệu năng cao (HPTLC). Cùng với việc đ-a công nghệ truyền hình và tự động hoá vào thiết bị dùng trong sắc ký lớp mỏng đã làm thay đổi vị trí của kỹ thuật sắc ký lớp mỏng trong phân tích định tính và đặc biệt là định l-ợng hoạt chất. Nhờ những tiến bộ

này, kỹ thuật sắc ký lớp mỏng đ-ợc ứng dụng rộng rãi trong định tính, định l-ợng hoạt chất trong d-ợc liệu, bán thành phẩm và thành phẩm. Kỹ thuật quét phổ sắc ký lớp mỏng truyền hình đã đ-ợc đ- a vào nhiều chuyên luận d-ợc liệu và thuốc Đông d-ợc Trung Quốc cũng nh- tiêu chuẩn cơ sở của d-ợc liệu và thuốc.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Vật liệu nghiên cứu.

* Nguyên liệu, dung môi, hoá chất:

- Thân rễ (củ) sâm Ngọc Linh tự nhiên trên 10 năm tuổi (Quảng Nam, 6 - 2008).

- Sâm Ngọc Linh sinh khối (Trung tâm Nghiên cứu Sinh - Y - D-ợc học, Học viện Quân y).

- Chất chuẩn ginsenoside Rb₁, Re, Rg₁ loại SH của hãng Chromadex (Mỹ).

- Dung môi, hoá chất đạt tiêu chuẩn PA.

* Trang thiết bị và dụng cụ:

- Hệ thống HPTLC của hãng DESAGA; bản mỏng HPTLC 10 x 10 cm; micropipet 2 µl; cột chiết pha rắn C₁₈; máy lắc siêu âm Soniclean (Australia); dụng cụ chiết Soxhlet; máy ly tâm; các loại dụng cụ thủy tinh có độ chính xác thích hợp.

2. Phương pháp nghiên cứu.

* Chiết xuất saponin toàn phần trong mẫu thử:

Cân chính xác 1 gam bột khô sâm Ngọc Linh tự nhiên hoặc bột khô sâm Ngọc Linh sinh khối cho vào bình nón dung tích 100 ml đ-ợc gắn với bộ phận hồi l-u. Thêm chính xác 50 ml methanol. Đun hồi l-u cách thủy

trong 1 giờ. Dem ly tâm 2.500 vòng/phút trong 10 phút. Hút chính xác 25 ml dịch trong sau khi ly tâm, cô cách thủy. Hoà tan cặn trong 5 ml n-ớc cất. Sau đó, cho qua cột chiết pha rắn (C₁₈, 360 mg) đã đ-ợc hoạt hoá lần l-ợt bằng 5 ml methanol, 5 ml methanol 50%, 5 ml H₂O cất. Rửa cột đã chứa mẫu lần l-ợt với 20 ml n-ớc cất, 10 ml methanol 30% với tốc độ 20 - 25 giọt/phút. Bỏ dịch rửa. Rửa giải bằng 40 ml methanol, lấy dịch rửa giải cô cách thủy tới khô. Hoà tan cặn trong 10 ml ethanol để chấm sắc ký.

* Xây dựng ph-ơng pháp định tính ginsenosid Rb₁, Re, Rg₁ bằng HPTLC:

Trên cơ sở sắc ký đồ mẫu chuẩn và mẫu thử, tính giá trị R_f của từng vết của mẫu thử, so sánh với giá trị R_f của các chất chuẩn ginsenosid Rb₁, Re, Rg₁. Nếu giá trị R_f có sự trùng nhau, kết luận trong mẫu thử có chứa ginsenosid Rb₁, Re, Rg₁.

Sử dụng máy sắc ký lớp mỏng hiệu năng cao DESAGA với detector nhân quang điện để xây dựng định tính ginsenoside Rb₁, Re, Rg₁ dựa vào giá trị R_f và phổ hấp thụ tử ngoại - khả kiến của mẫu chuẩn và mẫu thử.

KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ BÀN LUẬN

1. Kết quả định tính ginsenosid Rb₁, Re và Rg₁ bằng HPTLC.

* Tạo mẫu thử định tính và dung dịch chuẩn:

- Mẫu thử 1: cân 1 gam bột khô sâm Ngọc Linh tự nhiên, chiết xuất theo ph-ơng pháp đã nêu, thu đ-ợc ethanol toàn phần để chấm sắc ký.

- Mẫu thử 2: cân khoảng 1 gam bột khô sâm Ngọc Linh sinh khối, ph-ơng pháp chiết xuất t-ơng tự nh- mẫu thử 1.

- Dung dịch chuẩn: dung dịch chuẩn hỗn hợp các ginsenoside Rb₁, Re và Rg₁ trong ethanol.

* Tiến hành định tính:

- Chuẩn bị bản mỏng HPTLC có kích thước 10 x 10 cm.

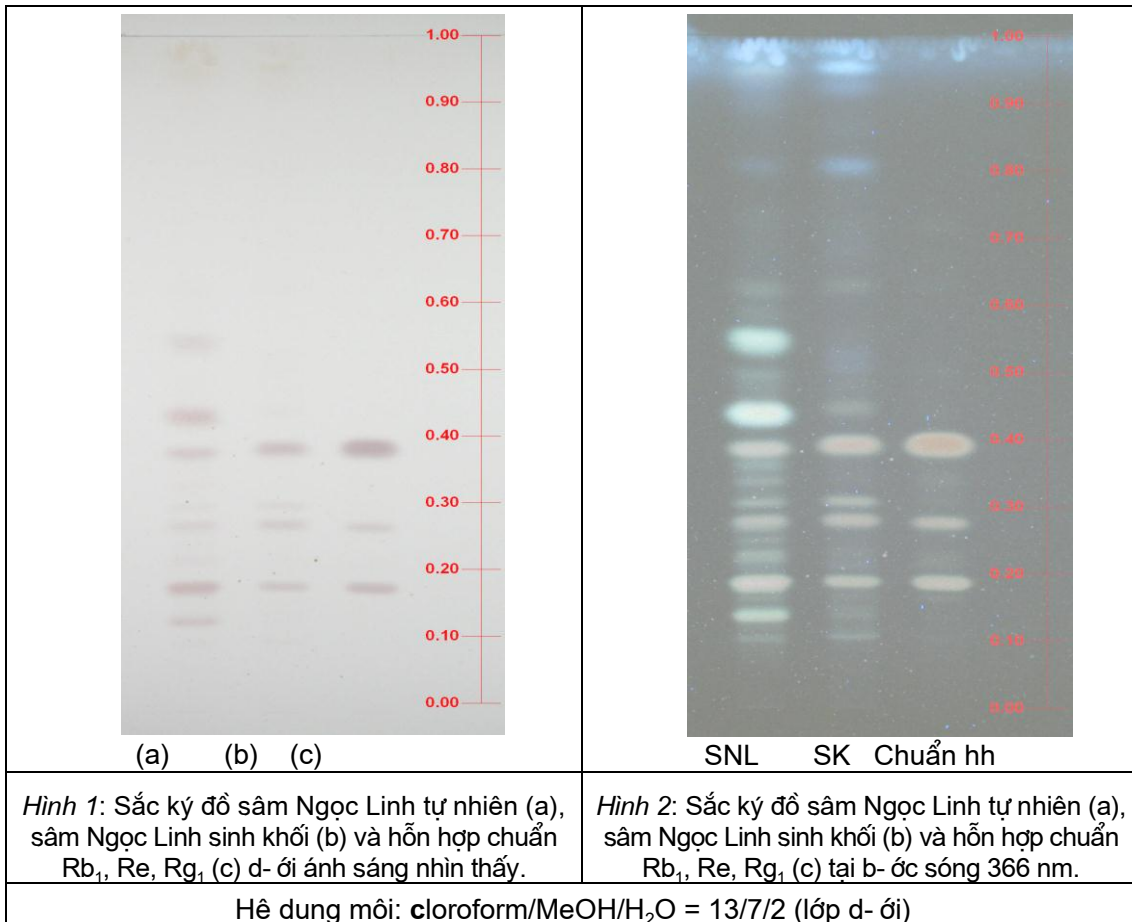
- Sấy bản mỏng ở nhiệt độ 100°C trong 30 phút.

- Chấm lên bản mẫu thử 1, mẫu thử 2 và dung dịch chuẩn với thể tích 20 μl.

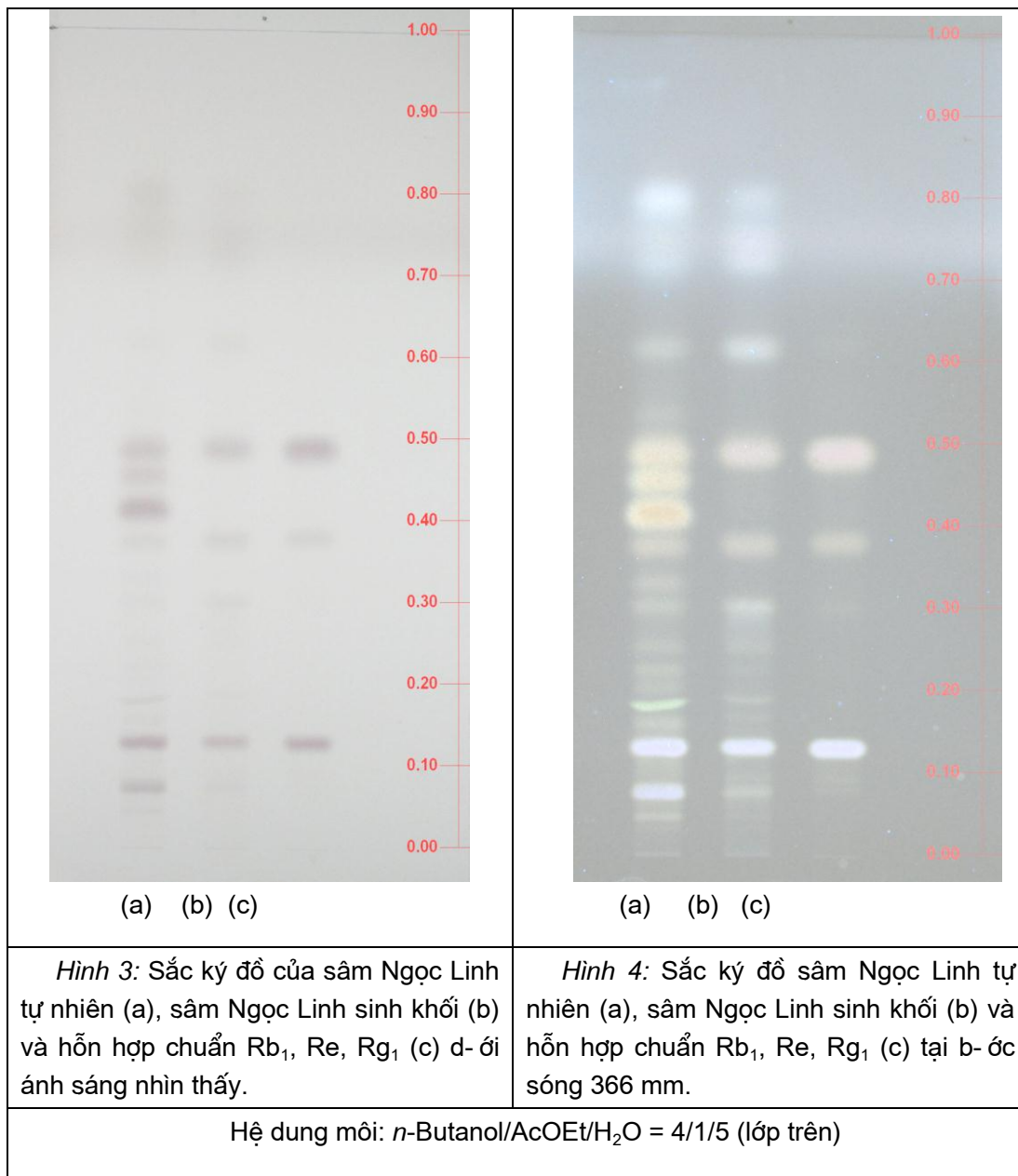
- Triển khai sắc ký với 3 hệ dung môi.

Chloroform/MeOH/H₂O = 13/7/2 (lớp d-ới);
n-butanol/AcOEt/H₂O = 4/1/5 (lớp trên);
chloroform/AcOEt/MeOH/H₂O = 15/40/22/10. Sấy khô bản mỏng trên thiết bị sấy chuyên dụng.

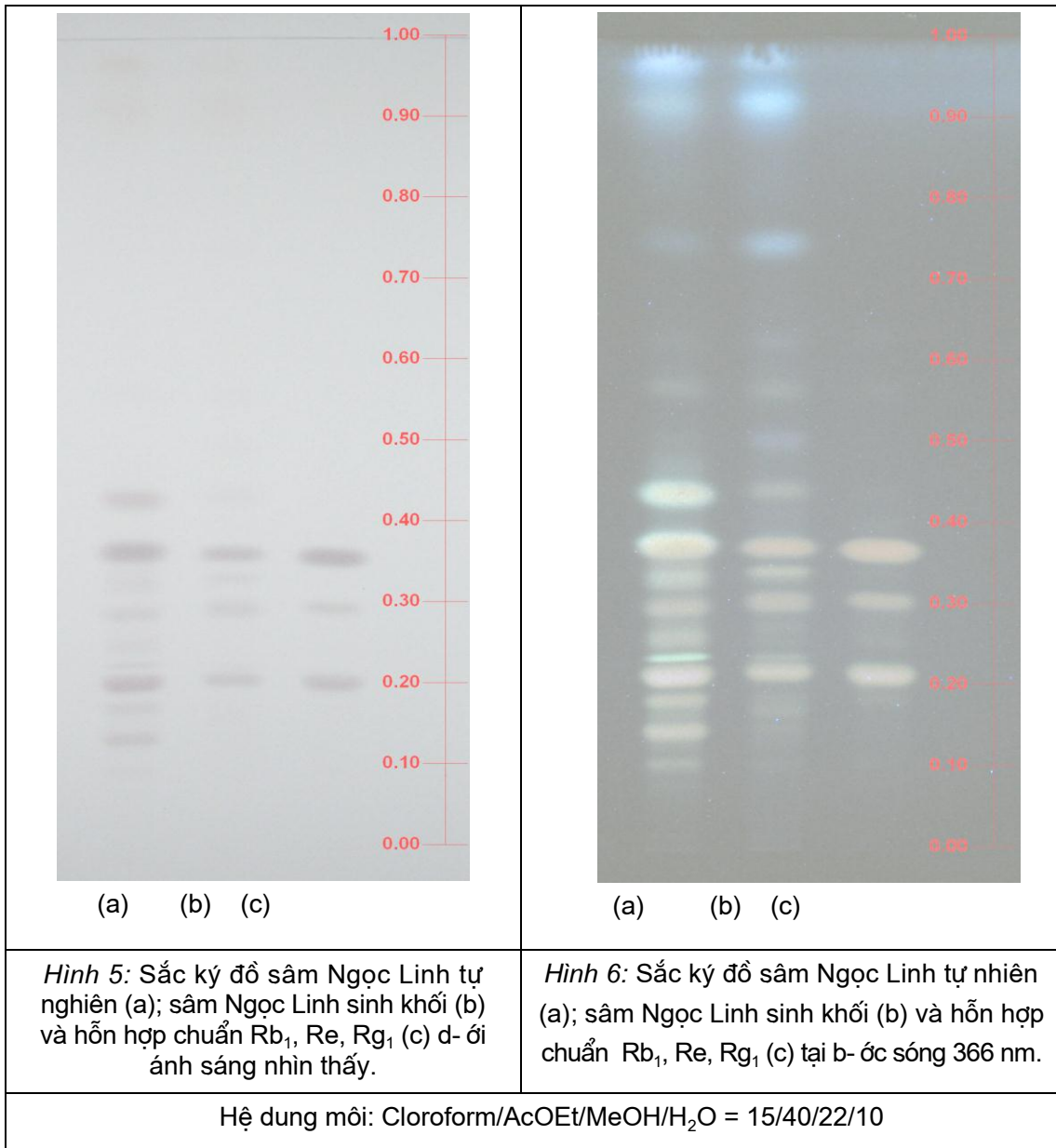
- Phun thuốc thử hiện màu là dung dịch H₂SO₄.10% trong ethanol.



Các giá trị R_f của 3 vết trong mẫu thử sâm Ngọc Linh tự nhiên (a), mẫu thử sâm Ngọc Linh sinh khối (b) và dung dịch chuẩn hỗn hợp ginsenoside Rb₁, Re, Rg₁ (c) là trùng nhau với các giá trị lần l-ợt là: 0,18, 0,27 và 0,39.



Các giá trị R_f của 3 vết trong mẫu thử sâm Ngọc Linh tự nhiên (a), mẫu thử sâm Ngọc Linh sinh khối (b) và dung dịch chuẩn hỗn hợp ginsenoside Rb₁, Re, Rg₁ (c) trùng nhau với các giá trị lần lượt là: 0,13; 0,38 và 0,49.



Các giá trị R_f của 3 vết trong mẫu thử sâm Ngọc Linh tự nhiên (a), mẫu thử sâm Ngọc Linh sinh khối (b) và dung dịch chuẩn hỗn hợp ginsenoside Rb₁, Re, Rg₁ trùng nhau với các giá trị lần l-ợt là: 0,21; 0,30 và 0,36. Từ các giá trị R_f thu đ-ợc của 3 vết chất trong mẫu thử sâm Ngọc Linh tự nhiên và mẫu thử sinh khối tế bào sâm Ngọc Linh sinh khối khi triển khai song song với chuẩn hỗn hợp ginsenoside Rb₁, Re, Rg₁ trên 3 hệ dung môi khác nhau có thể kết luận trong sâm Ngọc Linh tự nhiên và sâm Ngọc Linh sinh khối có mặt của cả 3 ginsenoside Rb₁, Re, Rg₁.

KẾT LUẬN

- Nghiên cứu đã xây dựng đ- ợc ph- ơng pháp chiết xuất bằng cách đun hồi l- u mẫu thử với methanol trong 1 giờ. Ly tâm, lấy một l- ợng chính xác dịch trong cô trên cách thủy đến khô, hoà tan trong n- ớc, sau đó làm sạch bằng chiết pha rắn trên cột RP-C18 đã hoạt hoá. Rửa cột bằng n- ớc và methanol 30%. Cuối cùng phản hấp phụ bằng methanol.

- Xây dựng đ- ợc ph- ơng pháp định tính 3 ginsenoside Rb₁, Re, Rg₁ với 3 hệ dung môi: chloroform/MeOH/H₂O = 13/7/2 (lớp d- ới); n-butanol/AcOEt/H₂O = 4/1/5 (lớp trên); chloroform/AcOEt/MeOH/H₂O = 15/40/22/10.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. *Trần Tử An*. Ph- ơng pháp chiết ứng dụng trong Kiểm nghiệm thuốc và độc chất. Bộ môn Hoá phân tích và độc chất, Tr- ờng Đại học D- ợc Hà Nội. 2002. tr.33-39, 76-83.

2. *Viện Kiểm nghiệm Thuốc Trung Ớng*. Đảm bảo chất l- ợng thuốc và một số ph- ơng pháp kiểm nghiệm. 2007. tr.107-120, 372-392.

3. *Nguyen Minh Duc, Nguyen Thoi Nham*. Chemical composition and pharmacological activities of Vietnamese ginseng, *Advances in Ginseng Research*. The Korean Society of Ginseng. 1998, pp.137-127.

4. *Kurt Randerath*. Sắc ký lớp mỏng. Nhà xuất bản Y học. Ng- ời dịch: Nguyễn Hữu Bẩy, Trần Trung Nam. 1974.

5. *Pharmacopoeia of the People's, Republic of China*. English edition. Vol I. Chemical industry press. pp.205-207, 223-225. Appendix VI, A 38-40.