

Phân lập một số vina-ginsenosides phục vụ công tác tiêu chuẩn hóa và kiểm nghiệm sâm Việt Nam (*Panax vietnamensis* Ha et Grushv.)

Nguyễn Minh Đức*, Dương Hồng Tổ Quyên, Nguyễn Thị Minh Tâm, Lê Quốc Việt
Huỳnh Trần Quốc Dũng, Tăng Thị Bảo Trân, Lê Thị Hồng Vân

Trường Đại học Y Dược TP Hồ Chí Minh

Ngày nhận bài 18.12.2015, ngày chuyển phân biện 22.12.2015, ngày nhận phân biện 22.1.2016, ngày chấp nhận đăng 27.1.2016

Vina-ginsenosides là các hợp chất rất đặc trưng cho sâm Việt Nam (*Panax vietnamensis* Ha et Grushv., Araliaceae). Trong nghiên cứu này, các tác giả phát triển một quy trình để phân lập một số vina-ginsenosides sử dụng làm chất đối chiếu quan trọng nhằm phục vụ cho công tác tiêu chuẩn hóa và đánh giá chất lượng sâm Việt Nam (SVN) và các chế phẩm. Nghiên cứu đã phân lập được 3 vina-ginsenoside có cấu trúc ocotillol bao gồm: V-R2 (98,25%), V-R11 (97,15%) và V-R10 (98,78%). Các hợp chất phân lập được xác định cấu trúc bằng phổ MS và NMR. Kết quả phân lập với sự hỗ trợ của hệ thống sắc ký hiệu năng cao HPLC đã giúp rút ngắn thời gian phân lập cũng như giúp định vị chính xác vị trí chất phân lập trong mẫu, do vậy các vina-ginsenosides phân lập được có độ tinh khiết cao. Quy trình phân lập đơn giản, có tính lặp lại cao, có thể ứng dụng điều chế một lượng lớn các vina-ginsenosides.

Từ khóa: chất đối chiếu, kiểm nghiệm, sâm Việt Nam, tiêu chuẩn hóa.

Chỉ số phân loại 3.4

Đặt vấn đề

SVN (*Panax vietnamensis* Ha et Grushv., Araliaceae), còn gọi là Sâm Ngọc Linh, là một dược liệu quý, đặc hữu của Việt Nam được phát hiện vào năm 1973 ở núi Ngọc Linh, tỉnh Kon Tum [1]. Đến nay, đã có nhiều nghiên cứu về thực vật, hóa học, kiểm nghiệm, tác dụng sinh học và dược lý được tiến hành và chứng minh SVN là một loài sâm quý có các tác dụng dược lý như chống oxy hóa, chống khối u, chống stress [1-6].

Thành phần hóa học chính của SVN ngoài các saponin thuộc nhóm protopanaxadiol, protopanaxatriol đã tìm thấy ở Nhân sâm, Tam thất, Sâm Mỹ... còn có saponin thuộc nhóm ocotillol chiếm hàm lượng cao, đặc trưng là majonosid-R2 (M-R2), mang lại tác dụng chính cho loài sâm này [1].

Từ bộ phận dưới mặt đất của SVN, Nguyễn Minh Đức và cộng sự còn phân lập được nhiều hợp chất mới, đặt tên là vina-ginsenoside với hàm lượng thấp nhưng rất đặc trưng cho SVN và đáng lưu ý [1]. Vì vậy, các vina-ginsenosides có vai trò quan trọng trong nghiên cứu tiêu chuẩn hóa và đánh giá chất lượng SVN và các

chế phẩm.

Bài báo này công bố kết quả phân lập một số hợp chất vina-ginsenosides để sử dụng làm chất đối chiếu trong kiểm nghiệm.

Thực nghiệm

Hóa chất và dụng cụ, thiết bị

Methanol, cloroform, dicloromethan loại tinh khiết phân tích (Xilong, Trung Quốc); acetonitril loại dùng cho hệ thống HPLC (J.T. Baker, Mỹ); nước cất 2 lần.

Bản mỏng sắc ký silica gel F₂₅₄ (Merck, Đức). Silica gel 60 dùng cho sắc ký cột (Merck, Đức) và silica pha đảo RP-18 (ODS), 50-60 µm (Phenomenex, Mỹ). Hệ thống HPLC LC-8A với đầu dò SPD-20A (Shimadzu, Nhật). Cột HiQsil C18, 250×4,6 mm; 5 µm (Kyatech, Nhật). Cột Discovery HS C18, 250×21,2 mm; 10 µm (Sigma-Aldrich, Mỹ). Máy đo khối phổ microTOF-Q (Bruker, Mỹ). Máy đo phổ cộng hưởng từ hạt nhân NMR AV-500 Ultrashield (Bruker, Mỹ).

Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

Đối tượng: cao *n*-BuOH toàn phần (70 g) chiết

*Tác giả liên hệ: Tel: 08.38558411

Developing a procedure for isolation of some vina-ginsenosides to be used as reference standards in standardization and quality control of Vietnamese ginseng

Summary

Vina-ginsenosides are characteristic minor saponins in Vietnamese ginseng (*Panax vietnamensis* Ha et Grushv.- Araliaceae). The study aimed to develop a procedure for isolation of some vina-ginsenosides to be used as reference standards in standardization and quality control of Vietnamese ginseng. The study includes the extractions and isolation of 3 vina-ginsenosides which share the same structure of ocotillol and the verification of these saponins with various criteria including TLC purity, HPLC quantitative analysis, MS and NMR spectra. The isolated saponins were identified as vina-ginsenoside R2, -R10, R11 with the HPLC purity > 95%. By using the preparative reverse-phased HPLC system with an ODS column, the isolation procedure of these compounds could be simpler and faster. The result showed the developed method was suitable for isolation of these compounds to be used as the reference standards for standardization and quality control of Vietnamese ginseng.

Keywords: quality control, reference standards, standardization, Vietnamese ginseng.

Classification number 3.4

xuất từ thân và rễ SVN. Các chất đối chiếu: Vina-ginsenoside R2 (V-R2), Vina-ginsenoside R11 (V-R11) do Ban Nghiên cứu khoa học - thư viện, Khoa Dược, Trường Đại học Y Dược TP Hồ Chí Minh cung cấp.

Phương pháp nghiên cứu:

Chiết suất cao *n*-BuOH toàn phần: bộ phận dưới mặt đất (thân rễ và rễ củ) của SVN sau khi sấy khô, được xay nhỏ, chiết Soxhlet với MeOH. Cô đặc dưới áp suất giảm để loại dung môi, thu được cặn. Hòa tan cặn với nước cất, lắc đều với ethyl acetate (EtOAc), cô đặc thu được cao EtOAc và cao nước. Cao EtOAc

tiếp tục được hòa tan với nước và chiết phân bố với *n*-BuOH bão hòa nước, cô đặc thu được cao *n*-BuOH toàn phần SVN.

Phân lập các vina-ginsenosides từ cao *n*-BuOH:

- Phân lập các phân đoạn từ cao *n*-BuOH toàn phần SVN bằng phương pháp sắc ký cột (SKC) cổ điển sử dụng cột 6,5×60 cm. Triển khai bằng EtOAc-MeOH (100:0), thay đổi tỷ lệ phân cực tăng dần, mỗi lần không quá 10%. Kiểm tra các phân đoạn thu được bằng sắc ký lớp mỏng (SKLM), HPLC, thu được: phân đoạn A có chứa nhiều chất X, phân đoạn B có chứa nhiều V-R2 và phân đoạn C có chứa nhiều V-R11.

- Phân đoạn A được tiếp tục loại tạp bằng SKC cổ điển, sử dụng cột 4×40 cm. Triển khai bằng CHCl₂-MeOH (95:5), thu được phân đoạn A4 giàu chất X và đã loại bớt tạp. Phân tích phân đoạn A4 bằng HPLC và tiếp tục tinh chế chất X từ phân đoạn A4 bằng phương pháp HPLC điều chế pha đảo RP-18 để thu được chất X tinh khiết.

- Phân đoạn B được tiếp tục loại tạp bằng SKC cổ điển, sử dụng cột 4×40 cm. Triển khai bằng hệ dung môi CH₂Cl₂-MeOH tăng dần từ 95:5 đến 85:15, mỗi lần tăng không quá 4%, thu được phân đoạn B6 giàu V-R2. Tiếp tục tinh chế phân đoạn B6 bằng SKC cổ điển, sử dụng cột 4×40 cm. Triển khai bằng hệ EtOAc-MeOH tăng dần từ 25:1 đến 8:2. Phân đoạn B6 có chứa V-R2 dễ bay hơi dung môi tự nhiên thu được chất kết tinh V-R2 tinh khiết.

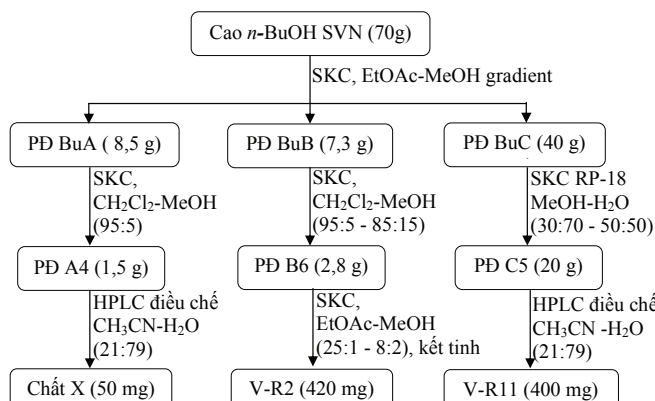
- Phân đoạn C được tiếp tục loại tạp bằng sắc ký lỏng hiệu năng trung bình MPLC pha đảo RP-18 có hệ dung môi MeOH-H₂O có tỷ lệ tăng dần từ 30:70 đến 50:50, mỗi lần tăng không quá 5%, thu được các phân đoạn C5 giàu V-R11. Phân tích phân đoạn C5 bằng HPLC và tiếp tục tinh chế V-R11 bằng phương pháp HPLC điều chế pha đảo RP-18 thu được V-R11 tinh khiết.

Xác định cấu trúc và đánh giá độ tinh khiết các hợp chất thu được:

- Các hợp chất thu được sẽ được kiểm tra độ tinh khiết bằng SKLM ở 3 hệ dung môi khác nhau, HPLC phân tích để xác định độ tinh khiết và được xác định cấu trúc bằng phổ MS, NMR.

Kết quả và bàn luận

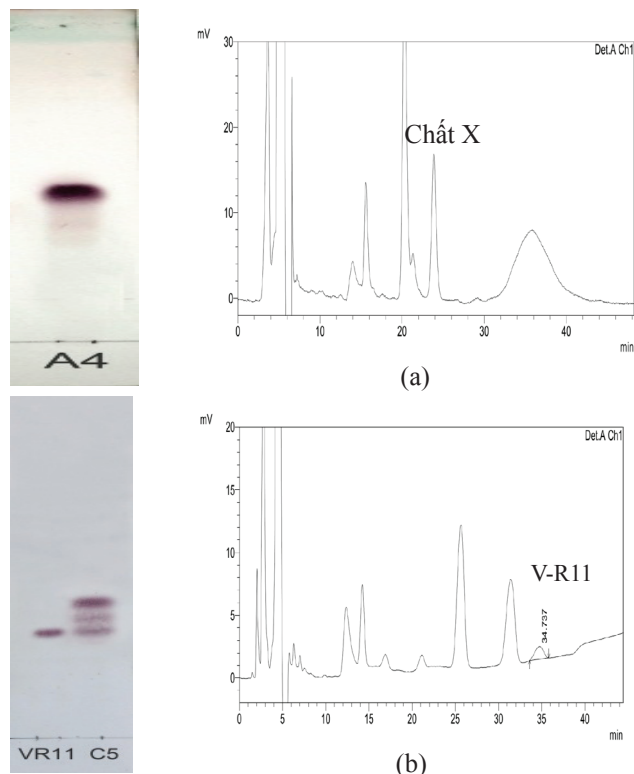
Phân lập các vina-ginsenosides từ cao *n*-BuOH



Hình 1: sơ đồ phân lập các vina-ginsenosides từ cao *n*-BuOH toàn phần SVN

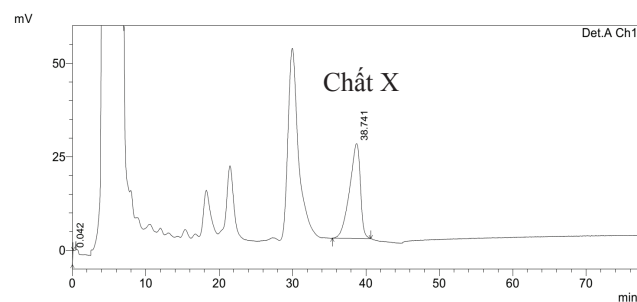
Phân đoạn B6 sau khi loại tạp bằng SKC cổ điển, các phân đoạn chứa V-R2 để kết tinh, lọc lấy phần kết tinh và rửa lại với EtOAc-MeOH (25:1) thu được 420 mg V-R2 tinh khiết.

Các phân đoạn A4, C5 được phân tích bằng SKLM và HPLC để tìm hệ dung môi phù hợp áp dụng cho HPLC điều chế.

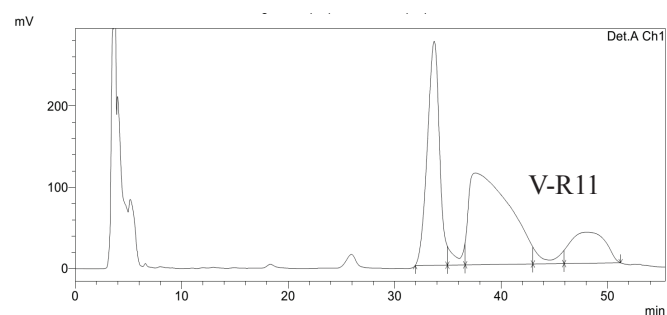


Hình 2: sắc ký đồ SKLM và HPLC phân tích các phân đoạn A4 (a), C5 (b)
 Hệ thống HPLC LC-8A; cột Kyatech HiQsil C-18 (250×4,6 mm, 5 μm);
 phát hiện UV 190 nm; tốc độ dòng 0,8 ml/ph; thể tích tiêm mẫu 20 μl;
 nhiệt độ phòng. Pha động: (a) CH₃CN-H₂O (26:74); (b) CH₃CN-H₂O (23:77)

Dựa vào điều kiện HPLC phân tích các phân đoạn A4, C5 tiếp tục tinh khiết hóa các vina-ginsenosides bằng phương pháp HPLC điều chế.



(a)



(b)

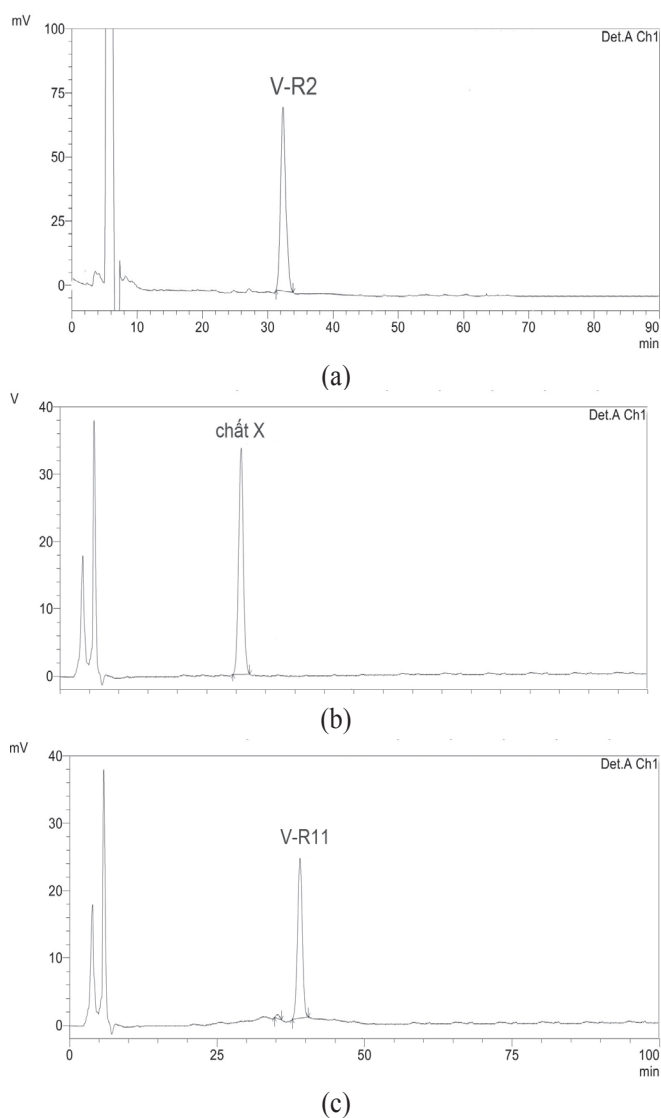
Hình 3: sắc ký đồ HPLC điều chế phân đoạn A4 (a) và C5 (b)
 Hệ thống HPLC Shimadzu LC-10AD; cột Discovery HS C18 (250×21,2 mm;
 10 μm); phát hiện: UV 190 nm; tốc độ dòng: 15 ml/phút; Pha động:
 ACN-H₂O (21:79).

Phân đoạn A4 sau khi được tinh khiết hóa bằng HPLC điều chế thu được 50 mg chất X tinh khiết. Phân đoạn C5 sau khi được tinh khiết hóa thu được 420 mg V-R11.

Xác định cấu trúc và độ tinh khiết của các hợp chất phân lập được

Định tính bằng SKLM: 3 hợp chất phân lập được kiểm tra bằng SKLM ở 3 hệ dung môi khác nhau đều cho một vết duy nhất trên bản mỏng. Riêng V-R2 và V-R11 phân lập được cho R_f trùng với vết của V-R2 và V-R11 chuẩn đối chiếu.

Định tính bằng HPLC phân tích: các hợp chất phân lập được được kiểm tra bằng HPLC phân tích. Kết quả cho thấy V-R2 và V-R11 phân lập được cho 1 pic chính trùng với thời gian lưu của chuẩn V-R2 và V-R11 đối chiếu với độ tinh khiết lần lượt là 98,25% và 97,15%. Hợp chất X phân lập được cho 1 pic chính với độ tinh khiết theo % diện tích pic là 98,78%.



Hình 4: sắc ký đồ HPLC kiểm tra độ tinh khiết của V-R2 (a), chất X (b), V-R11 (c)

Hệ thống HPLC LC-8A; cột Kyatech HiQsil C-18 (250×4,6 mm, 5 μm); phát hiện UV 190 nm; tốc độ dòng 0,8 ml/ph; thể tích tiêm mẫu 20 μl; nhiệt độ phòng. Pha động: (a) CH₃CN-H₂O (28:72); (b) CH₃CN-H₂O (26:74); (c) CH₃CN-H₂O (24:76)

Phổ MS: khối phổ của hợp chất V-R2 phân lập được cho ion pic [M+H]⁺ ở m/z 829,0643 tương ứng với công thức phân tử C₄₃H₇₂O₁₅ (M=828,487) của vina-ginsenoside R2.

Khối phổ của hợp chất V-R11 phân lập được cho ion pic [M-H]⁻ ở m/z 785,8988 tương ứng với công thức phân tử C₄₁H₇₀O₁₄ (M=786,98) của vina-ginsenoside R11.

Khối phổ của hợp chất X phân lập được cho ion pic [M+H]⁺ ở m/z 655,423 tương ứng với công thức phân tử C₃₆H₆₂O₁₄ (M=654,8728).

Phổ NMR: kết quả so sánh phổ ¹³C-NMR của các chất phân lập: V-R2, V-R11 (đo ở 125 MHz, trong C₅D₅N) so với số liệu phổ NMR đã được công bố cho thấy là giống nhau. Bên cạnh đó, phổ ¹³C-NMR và ¹H-NMR của chất X phù hợp với phổ NMR của hợp chất vina-ginsenoside R10 đã công bố.

Bảng 1: so sánh phổ ¹³C-NMR của các chất phân lập được với tài liệu đã công bố

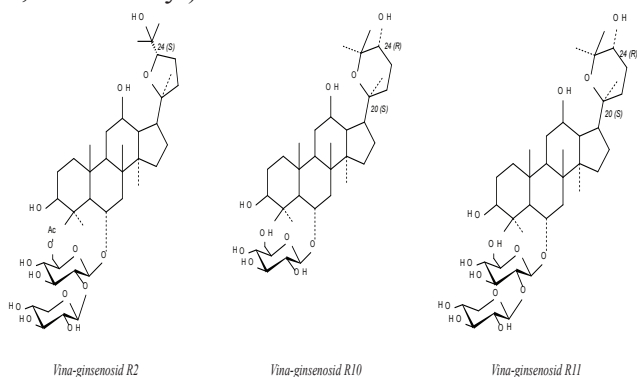
Khung aglycon							Phản đường							
C	1	1R	2	2R	3	3R	C	1	1R	2	2R	3	3R	
1	39,4	39,5	39,5	39,3	39,4	39,6	6-O-Glc	1	103,1	103,5	103,5	103,3	105,8	106,0
2	27,6	27,8	28,0	27,9	27,8	28,1		2	80,1	80,2	80,2	80,1	75,3	75,4
3	78,6	78,7	78,5	78,4	78,3	78,5		3	78,6	78,7	78,7	78,6	79,9	80,1
4	39,9	40,1	40,2	40,0	40,1	40,1		4	71,1	71,2	71,2	71,1	71,8	71,8
5	61,2	61,3	61,4	61,2	61,3	61,5		5	74,9	75,0	79,8	79,7	79,4	79,6
6	79,1	79,3	79,4	79,3	78,4	78,6		6	64,9	65,0	62,9	62,7	62,9	62,5
7	45,1	45,3	44,8	44,7	44,9	45,1	Xyl	1	104,8	105,0	104,8	104,6		
8	41,0	41,1	41,1	40,9	40,9	41,1		2	75,6	75,7	75,8	75,6		
9	50,1	50,2	50,0	49,9	49,9	50,1		3	78,6	78,7	78,8	78,6		
10	39,5	39,6	39,5	39,4	39,3	39,4		4	71,1	71,2	71,7	71,6		
11	32,0	32,2	31,6	31,5	31,9	32,1		5	67,1	67,3	67,2	67,1		
12	70,7	70,8	70,5	70,4	70,4	70,6	CH ₃ CO		20,9	21,0				
13	49,0	49,2	48,9	47,8	48,7	48,9	CH ₃ CO		170,7	170,8				
14	52,2	52,3	52,0	51,9	51,9	52,1								
15	32,4	32,6	32,1	31,9	31,5	31,7								
16	25,7	25,8	27,6	27,5	27,4	27,6								
17	49,4	49,5	52,2	52,1	51,9	52,2								
18	17,7	17,9	17,2	17,1	17,1	17,3								
19	16,9	17,0	17,6	17,4	17,4	17,6								
20	86,9	87,0	77,9	77,8	77,8	77,9								
21	26,8	27,0	26,3	26,1	26,2	26,3								
22	32,4	32,6	27,8	27,6	27,7	27,7								
23	28,5	28,6	25,9	25,7	25,7	25,9								
24	88,3	88,4	74,4	74,3	74,2	74,4								
25	69,9	70,0	80,0	77,9	77,9	78,1								
26	26,4	26,6	23,2	23,1	23,0	23,2								
27	28,8	28,9	29,9	29,9	29,8	29,9								
28	31,6	31,7	31,7	31,6	31,5	30,0								
29	16,8	16,9	16,7	16,5	16,1	16,3								
30	17,8	17,9	17,7	17,6	17,5	17,7								

Ghi chú: 1: V-R2 phân lập; 1R: V-R2 đối chiếu theo tài liệu [2]
2: V-R11 phân lập; 2R: V-R11 đối chiếu theo tài liệu [4]
3: V-R10 phân lập; 3R: V-R10 đối chiếu theo tài liệu [4]

V-R2 phân lập (500 MHz, C₅D₅N): ¹H-NMR δ 0,84; 0,99; 1,22; 1,27; 1,28; 1,35; 1,42; 1,97 (s, 3H, CH₃ x 8); 2,05 (s, 3H, CH₃CO); 4,95 (1H, J = 6 Hz, H-1 của Glc); 5,68 (1H, J = 6 Hz, H-1 của Xyl).

V-R10 phân lập (500 MHz, C_5D_5N): 1H -NMR δ 0,81; 1,04; 1,20; 1,32; 1,52; 1,60; 1,68; 2,07 (s, 3H, $CH_3 \times 8$); 3,53 (1H, dd, $J = 11, 5$ Hz, H-3); 3,74 (1H, ddd, $J = 10, 10, 5$ Hz, H-12); 3,86 (1H, dd, $J = 10, 5$ Hz, H-24); 4,43 (1H, ddd, $J = 10, 10, 3$ Hz, H-6); 5,05 (1H, trùng với pic dung môi, H-1 của Glc).

V-R11 phân lập (500 MHz, C_5D_5N): 1H -NMR δ 0,76; 0,95; 1,14; 1,29; 1,42; 1,49; 1,64; 2,04 (s, 3H, $CH_3 \times 8$); 3,47 (1H, dd, $J = 11, 4,5$ Hz, H-3); 3,69 (1H, ddd, $J = 12, 9, 4$ Hz, H-12); 4,35 (1H, m, H-6); 4,91 (1H, d, $J = 5,7$ Hz, H-1 của Glc), 5,72 (1H, d, $J = 5,8$ Hz, H-1 của Xyl).



Hình 5: công thức cấu tạo của các chất vina-ginsenosides đã phân lập

Kết luận

Từ cao *n*-BuOH của phần dưới mặt đất SVN, đã phân lập được 3 vina-ginsenoside có cấu khung ocotillol bao gồm V-R2 (98,25%), V-R11 (97,15%) và V-R10 (98,78%). Các hợp chất phân lập được xác định

cấu trúc bằng phổ MS và NMR. Kết quả phân lập với sự hỗ trợ của hệ thống HPLC điều chế đã giúp rút ngắn thời gian phân lập cũng như giúp định vị chính xác vị trí chất phân lập trong mẫu nên các vina-ginsenosides phân lập được có độ tinh khiết cao. Quy trình phân lập đơn giản, có tính lặp lại cao, có thể ứng dụng điều chế một lượng lớn các vina-ginsenosides trong tương lai nhằm phục vụ cho công tác tiêu chuẩn hóa và kiểm nghiệm SVN và các chế phẩm.

Tài liệu tham khảo

- [1] Nguyễn Thượng Dong, Trần Công Luận, Nguyễn Thị Thu Hương (2007), *Sâm Việt Nam và một số cây thuốc thuộc họ Nhân sâm*, Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật, Hà Nội, tr.141
- [2] N.M Duc, N.T Nham, R Kasai, A Ito, K Yamasaki, O Tanaka (1993), "Saponins from Vietnamese ginseng, *Panax vietnamensis* Ha e Grushv. Collected in Central Vietnam. I", *Chem. Pharm. Bull.*, **41(11)**, pp.2010-2014.
- [3] N.M Duc, R Kasai, K Ohtani, A Ito, N.T Nham, K Yamasaki, O Tanaka (1994), "Saponins from Vietnamese ginseng, *Panax vietnamensis* Ha e Grushv. Collected in Central Vietnam. II", *Chem. Pharm. Bull.*, **42**, p.115.
- [4] N.M Duc, R Kasai, K Ohtani, A Ito, N.T Nham, K Yamasaki, O Tanaka (1994), "Saponins from Vietnamese ginseng, *Panax vietnamensis* Ha e Grushv. Collected in Central Vietnam. III", *Chem. Pharm. Bull.*, **42(3)**, pp.634-640.
- [5] N.T Nham, P.V De, T.C Luan, Nguyen Minh Duc, S Shibata, O Tanaka, R Kasai (1995), "Pharmacognostical and chemical studies on Vietnamese ginseng, *Panax vietnamensis* Ha et Grushv. (Araliaceae)", *J. Jpn. Bot.*, **70**, p.1.
- [6] Đỗ Tất Lợi (2004), *Những cây thuốc và vị thuốc Việt Nam*, Nhà xuất bản Y học, Hà Nội, tr.804-810.