

Xây dựng quy trình định lượng đồng thời 8 saponin có trong cây bảy lá một hoa (*Paris polyphylla* Sm.) bằng kỹ thuật HPLC

Cao Ngọc Anh¹, Nguyễn Thị Phương Lan², Thái Nguyễn Hùng Thu^{3*}

¹ Viện Kiểm nghiệm Thuốc Trung ương

² Cục Quản lý Y, Dược cổ truyền

³ Trường Đại học Dược Hà Nội

Summary

A HPLC method for the quantitative determination of 8 saponins in *Paris polyphylla* Sm. has been established and validated. The analysis was using gradient mobile phase on a C18 column at 35°C with flow rate 1.0 ml/min, detection wavelength at 203 nm, the injection volume is 20 µl. The method had applied on 12 samples with four different object. Preliminary results show that this method is feasible in quantifying simultaneously 8 substances in the survey samples.

Keywords: *Paris polyphylla* Sm., paris saponin, HPLC, quantification analysis.

Đặt vấn đề

Thành phần hóa học chính của cây bảy lá một hoa (*Paris polyphylla* Sm.) là saponin với nhóm chính là saponin spirostan (khung diosgenin và pennogenin) với khoảng 90 hợp chất trong tổng số 147 saponin đã được phân lập. Các chất này góp phần quan trọng trong tiềm năng chống ung thư của cây bảy lá một hoa [1]. Diosgenin saponin có các hợp chất đáng chú ý là diosgenin, polyphyllin D (paris I, chonglou saponin I), paris saponin II (paris II, chonglou saponin II, polyphyllin II), dioscin (paris saponin III), paris IV, paris V, gracillin, polyphyllin C, E, F, trillin... [2, 3]. Pennogenin saponin có các hợp chất đáng chú ý như paris saponin H (paris H), paris saponin VI (chonglou saponin VI, paris VI), paris saponin VII (chonglou saponin VII, paris VII, Tg) [4, 5, 6].

Dược điển Trung Quốc 2015 sử dụng 4 chất đánh dấu để kiểm nghiệm dược liệu *Paris* gồm: Chonglou saponin I (polyphyllin D), chonglou saponin II (paris saponin II), chonglou saponin VI và chonglou saponin VII. Để định lượng hàm lượng các chất này, phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao ở bước sóng 203 nm được sử dụng.

Tổng hàm lượng của 4 hợp chất trên không được thấp hơn 0,60 % tính trên dược liệu khô [7]. Để đánh giá chất lượng dược liệu bảy lá một hoa có ở Việt Nam, từ kết quả khảo sát sơ bộ hàm lượng một số saponin trong một số dịch chiết cây bảy lá một hoa ở Việt Nam (qua SKLM và HPLC), kết hợp với hoạt tính sinh học của các saponin và các hợp chất đánh dấu đã được Dược điển Trung Quốc sử dụng, 8 hợp chất được chọn lựa. Các hợp chất đó là polyphyllin D (PS-I), paris saponin II (PS-II), dioscin, paris saponin VI (PS-VI), paris saponin VII (PS-VII), paris saponin D (PS-D), paris saponin H (PS-H) và gracillin.

Muốn xây dựng được tiêu chuẩn cho dược liệu bảy lá một hoa cần có một phương pháp có thể phân tích đồng thời được cả 8 saponin kể trên. Phương pháp phân tích sẽ giúp cho khảo sát được với số lượng lớn các mẫu thu hái từ các vùng khác nhau ở các thời điểm khác nhau của năm để đưa ra các giới hạn phù hợp về hàm lượng các saponin nghiên cứu. Các kết quả khảo sát cũng sẽ giúp rà soát 8 hợp chất đánh dấu dự định đã phù hợp hay chưa. Cuối cùng, phương pháp sẽ được dùng trong đánh giá chất lượng dược liệu này sau khi tiêu chuẩn đã được xác định.

Nguyên liệu và phương pháp nghiên cứu

Đối tượng nghiên cứu

Các hợp chất phân lập, tinh chế được gồm: Paris saponin H (PS-H), paris saponin II (PS-II),

Chịu trách nhiệm: Thái Nguyễn Hùng Thu

Email: tnht22@yahoo.com

Ngày nhận: 20/7/2021

Ngày phản biện: 23/7/2021

Ngày duyệt bài: 24/8/2021

dioscin, gracillin và polyphyllin D (PS-I) của Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương; Paris saponin VII (PS-VII), paris saponin D (PS-D) và paris saponin VI (PS-VI) của Viện Dược liệu (Bộ Y tế).

Các mẫu thân rễ và phần trên mặt đất của cây bầy lá một hoa thu hái tại các địa phương khác nhau ở Việt Nam (bảng 1).

Bảng 1. Một số mẫu dùng trong nghiên cứu

<i>TT</i>	<i>Mẫu</i>	<i>Ký hiệu</i>	<i>Nơi thu</i>	<i>Bộ phận</i>	<i>Thu mẫu</i>
1	Mẫu 01	PPC 02	Cao Bằng	Thân rễ	4/2017
2	Mẫu 02	PPC 04	Lào Cai	Thân rễ	12/2017
3	Mẫu 03	PD 01	Lai Châu	Thân rễ	6/2017
4	Mẫu 04	PPC 03	Nghệ An	Thân rễ	5/2017
5	Mẫu 05	PPC 08	Cao Bằng	Thân rễ	4/2017
6	Mẫu 06	PPC 05	Lai Châu	Phần trên mặt đất	12/2016
7	Mẫu 07	PPC 10	Kon Tum	Phần trên mặt đất	6/2017
8	Mẫu 08	PPC 16	Lào Cai	Phần trên mặt đất	12/2017
9	Mẫu 09	PV 02	Lai Châu	Phần trên mặt đất	9/2019
10	Mẫu 10	PP 03	Hà Giang	Phần trên mặt đất	5/2018
11	Cao khô bầy lá một hoa		Viện Dược liệu		
12	Viên nang Cung huyết ninh		Trung Quốc		

Cao khô bầy lá một hoa được cung cấp từ Viện Dược liệu và viên nang cứng Cung huyết ninh của Yunnan Baiyao Group Co., Ltd. (Trung Quốc) có chứa cao khô bầy lá một hoa, tinh bột, magnesi stearat được sử dụng để kiểm chứng thêm khả năng tách các saponin nghiên cứu khi sử dụng phương pháp phân tích xây dựng được.

Chất chuẩn, trang thiết bị, dung môi và hóa chất

Các chất chuẩn

- Paris saponin VII (Chengdu Biopurify Phytochemicals Ltd, Trung Quốc; SKS: PRF8041822; hàm lượng: 98,25%; độ ẩm: 1,12%).

- Paris saponin D (Viện Dược liệu; SKS: Pd01; hàm lượng: 96,56% (nguyên trạng)).

- Paris saponin H (Shanghai yuanye Bio-Technology Co., Ltd, Trung Quốc; SKS: Y23M9H62019; hàm lượng: 97,10%; độ ẩm: 1,92%).

- Paris saponin VI (Chengdu Biopurify Phytochemicals Ltd - Trung Quốc; SKS: PRF8051211; hàm lượng: 98,75%; độ ẩm: 1,20%).

- Paris saponin II (Shanghai yuanye Bio-Technology Co., Ltd, Trung Quốc; SKS: P09j9F46029; hàm lượng: 96,29%; độ ẩm: 2,14%).

- Dioscin (Chengdu Herbpurify Co. Ltd., Trung Quốc; SKS: S-048-180530; hàm lượng:

96,61%; độ ẩm: 1,45%).

- Gracillin (Shanghai yuanye Bio-Technology Co., Ltd, Trung Quốc; SKS: CFO227QC14; hàm lượng: 95,72%; độ ẩm: 1,12%).

- Polyphyllin D (Chengdu Herbpurify Co. Ltd., Trung Quốc; SKS: C-036-181216; hàm lượng: 97,10%; độ ẩm: 1,64%).

Trang thiết bị

Cân phân tích MS105 (Mettler, Thụy Sĩ, d = 0,1 mg); Máy HPLC-DAD Agilent 1260: Cột Phenomenex, C18 (250 × 4,6 mm; 5 μm), detector PDA và các dụng cụ thủy tinh cần thiết khác trong phòng thí nghiệm.

Dung môi

Dung môi tinh khiết **HPLC** dùng trong thiết lập chuẩn: Acetonitril (Hãng Merck), methanol (Hãng Merck), acid phosphoric (Hãng Prolabo), nước cất hai lần (Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương).

Phương pháp nghiên cứu

Chuẩn bị các dung dịch

Các dung dịch chuẩn: Cân chính xác từng chất chuẩn và hòa tan với methanol trong các bình định mức riêng biệt để thu được các dung dịch chuẩn có nồng độ khoảng 0,2 mg/ml của chuẩn tương ứng.

Dung dịch chuẩn hỗn hợp: Cân chính xác từng chất chuẩn (8 chất chuẩn) và hòa tan với methanol trong bình định mức phù hợp để thu được dung dịch chuẩn hỗn hợp có nồng độ mỗi chất khoảng 0,2 mg/ml.

Dung dịch thử là nguyên liệu phân lập tinh chế được: Cân các lượng mẫu phù hợp hòa tan bằng methanol và định mức thành các dung dịch có nồng độ phù hợp tùy theo mức nồng độ khảo sát.

Dung dịch thử với cây bầy lá một hoa (thân rễ hay phần trên mặt đất): Cân chính xác khoảng 0,5 g bột thân rễ (hay phần trên mặt đất) cây bầy lá một hoa đã được nghiền mịn phù hợp, thêm chính xác 25,00 ml ethanol 70%, đun hồi lưu trong 60 phút. Để nguội về nhiệt độ phòng, bổ sung ethanol 70% về đủ lượng ban đầu, lắc đều và lọc qua giấy lọc, rồi lọc qua màng lọc 0,45 µm.

Dung dịch thử cao khô bầy lá một hoa: Cân chính xác khoảng 50 mg chế phẩm vào bình định mức 50 ml, thêm 30 ml methanol, lắc siêu âm trong 30 phút, để nguội, bổ sung methanol vừa đủ đến vạch, lắc đều. Lọc qua màng lọc 0,45 µm.

Dung dịch thử viên nang cứng Cung huyết ninh: Cân 10 viên, xác định khối lượng trung bình bột viên, nghiền thành bột mịn. Cân chính xác khoảng 50 mg chế phẩm vào bình định mức 50 ml, thêm 30 ml methanol, lắc siêu âm trong 30 phút, để nguội, bổ sung methanol vừa đủ đến vạch, lắc đều. Lọc qua màng lọc 0,45 µm.

Khảo sát điều kiện sắc ký và thẩm định phương pháp định lượng

Chọn lựa điều kiện sắc ký cho phép tách được các hợp chất với nhau và các tạp chất trong mẫu.

Thẩm định phương pháp phân tích: Áp dụng theo hướng dẫn của ICH Q2B để xây dựng phương pháp định lượng cho các hợp chất nghiên cứu. Các yếu tố cần được đánh giá đối với quy trình phân tích định lượng bao gồm: Tính đặc hiệu, độ đúng, độ lặp lại, độ tuyến tính [8].

Ứng dụng phương pháp

Ứng dụng phương pháp xây dựng được để phân tích một số mẫu cây bầy lá một hoa ở Việt Nam và kiểm chứng tính khả thi của phương pháp trên một số mẫu chứa bầy lá một hoa.

Kết quả và bàn luận

Khảo sát và chọn điều kiện sắc ký

Qua khảo sát đã chọn được điều kiện sắc ký như sau:

- Cột: C18, 250 × 4,6 mm; 5 µm. Nhiệt độ cột: 35°C. Pha động: Gradient dung môi với hỗn hợp A : B, trong đó A là hỗn hợp ACN - MeOH (95:5) và B là dung dịch H₃PO₄ 0,1%. Chương trình rửa giải như sau:

Thời gian (phút)	Tỷ lệ A (%)	Tỷ lệ B (%)
0	45	55
22	45	55
23	51	49
50	51	49

- Tốc độ dòng: 1 ml/phút;
- Detector: 203 nm;
- Thể tích tiêm: 20 µl.

Thẩm định phương pháp

Độ đặc hiệu

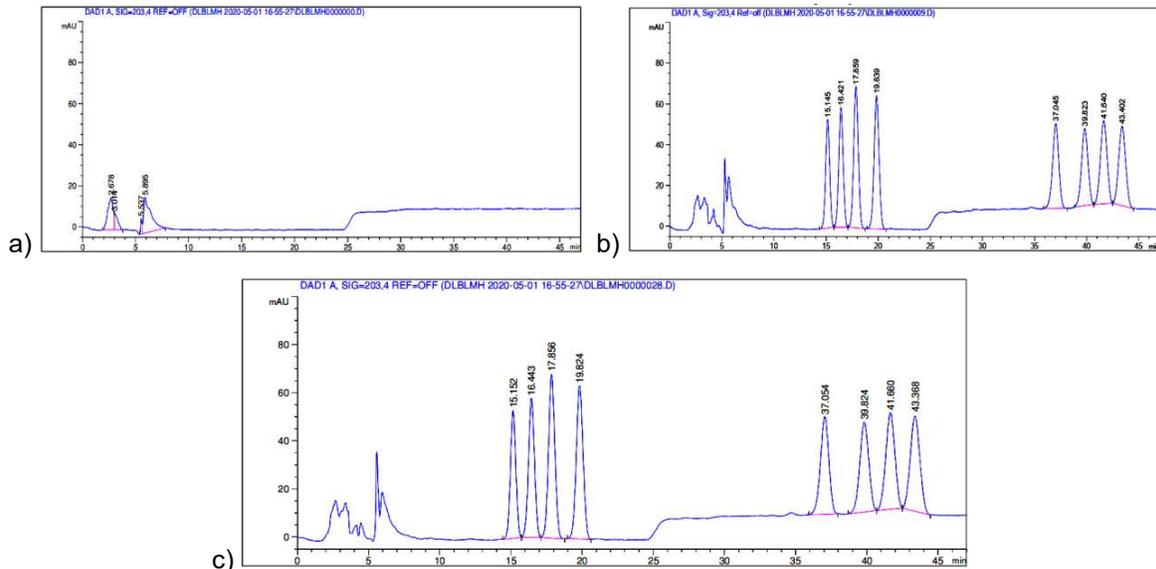
- *Mẫu trắng:* Dung môi pha mẫu.
- *Dung dịch hỗn hợp chuẩn:* Cân chính xác khoảng 5 mg mỗi chất chuẩn (gồm PS-VII, PS-D, PS-H, PS-VI, PS-II, dioscin, gracillin và PS-I) vào bình định mức 25 ml, hòa tan và định mức vừa đủ với methanol.

- *Dung dịch các chuẩn đơn:* Cân khoảng 1 mg từng chất chuẩn, hòa tan và định mức thành 5 ml dung dịch với methanol.

- *Dung dịch thử:* Cân chính xác khoảng 5 mg mỗi nguyên liệu tinh chế được vào bình định mức 25 ml, hòa tan và thêm methanol vừa đủ thể tích. Tiến hành với 6 mẫu thử.

Tiêm lần lượt mẫu trắng, dung dịch hỗn hợp chuẩn và các dung dịch chuẩn đơn và các dung dịch thử vào hệ thống sắc ký, ghi lại sắc ký đồ. Kết quả cho thấy:

- Trên sắc ký đồ của mẫu trắng không xuất hiện pic có thời gian lưu tương ứng với thời gian lưu của các pic hợp chất cần phân tích trên sắc ký đồ mẫu chuẩn.
- Trên sắc ký đồ dung dịch thử cho các pic có thời gian lưu tương ứng với thời gian lưu của các pic tương ứng trên sắc ký đồ dung dịch chuẩn: PS-VII khoảng 15,1 phút; PS-D khoảng 16,4 phút; PS-H khoảng 17,8 phút; PS-VI khoảng 19,8 phút, PS-II khoảng 37,0 phút, dioscin khoảng 39,8 phút, gracillin khoảng 41,6 phút và PS-I khoảng 43,4 phút (hình 1).

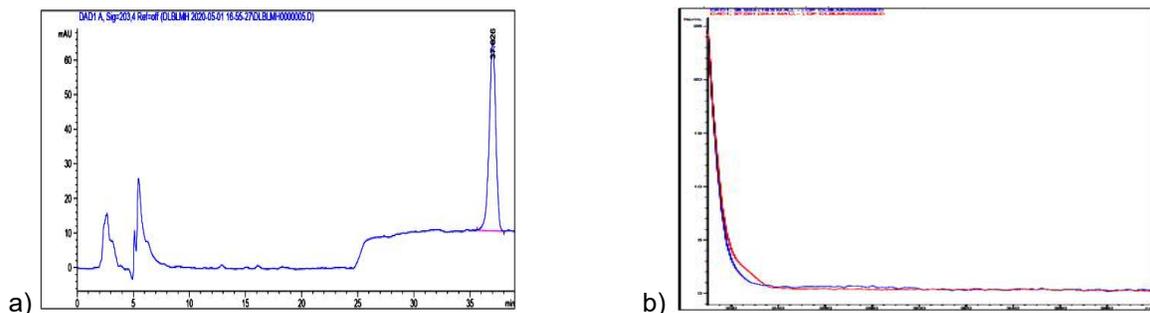


Hình 1. Sắc ký đồ của các mẫu

a) Dung môi pha mẫu b) Mẫu chuẩn hỗn hợp c) Mẫu thử

- Phổ **UV** của các pic trên sắc ký đồ mẫu thử phù hợp với phổ **UV** của các pic chất cần phân tích tương ứng trên sắc ký đồ mẫu chuẩn đơn

tương ứng. Hình 2 là sắc ký đồ đại diện với chuẩn đơn PS-II và kết quả chồng phổ **UV**.



Hình 2. Sắc ký đồ của chuẩn đơn PS-II (a) và kết quả chồng phổ với pic tương ứng trên mẫu thử (b)

Độ thích hợp của hệ thống

Tiêm 6 lần dung dịch chuẩn, ghi lại sắc ký đồ. Xác định các thông số diện tích pic, thời gian

lưu, số đĩa lý thuyết, hệ số bất đối xứng pic, độ phân giải. Kết quả như ở bảng 2.

Bảng 2. Kết quả khảo sát độ thích hợp hệ thống của các paris saponin (n = 6)

TT	Hợp chất	Thời gian lưu (phút)		Diện tích pic (mAU.S)		N	T	R _s
		Trung bình	RSD(%)	Trung bình	RSD(%)			
1	PS-VII	15,154	0,04	1452,6	0,23	7205	0,98	-
2	PS-D	16,443	0,08	1745,6	0,23	7162	0,96	1,71
3	PS-H	17,872	0,05	2169,0	0,19	7670	0,94	1,80
4	PS-VI	19,847	0,03	2175,3	0,21	8275	0,98	2,34
5	PS-II	37,048	0,02	1735,1	0,66	18563	1,11	17,53
6	Dioscin	39,824	0,01	1661,3	0,68	18451	1,01	2,45
7	Gracillin	41,650	0,03	1833,4	0,41	18878	1,00	1,52
8	PS-I	43,404	0,03	1840,6	0,41	18387	0,95	1,49

Từ bảng 2 ta thấy RSD_{thời gian lưu} từ 0,01 đến 0,08% (< 1,0 %); RSD_{diện tích pic} từ 0,19 đến 0,68% (< 2,0 %); số đĩa lý thuyết (N) từ 7162 đến 18878 > 3000; hệ số bất đối xứng (T) từ 1,0 - 1,1; độ phân giải giữa các pic cạnh nhau (R_s) từ 1,5 đến 17,5. Vậy hệ thống phù hợp để định lượng đồng thời 8 saponin.

Độ tuyến tính

Chuẩn bị các dung dịch chuẩn trong methanol có nồng độ các chất biến thiên trong khoảng từ 50 đến 150 % của nồng độ dự tính định lượng. Tiêm các dung dịch này vào hệ thống sắc ký, ghi lại sắc ký đồ. Kết quả tổng hợp ở bảng 3 cho thấy có sự tương quan tuyến tính giữa diện tích pic và nồng độ các chất tương ứng.

Bảng 3. Kết quả khảo sát độ tuyến tính của các paris saponin

TT	Hợp chất	Khoảng nồng độ (mg/ml)	Hệ số tương quan r	Hệ số góc	Hệ số chặn (intercept)	Y (%)
1	PS-VII	0,0992 - 0,2971	0,9999	7321,5129	0,3696	1,22
2	PS-D	0,0973 - 0,2924	0,9999	8945,3977	6,8993	0,40
3	PS-H	0,0985 - 0,2956	0,9998	11064,7545	5,0729	0,23
4	PS-VI	0,0991 - 0,2980	0,9999	10934,8518	1,7257	0,08
5	PS-II	0,0969 - 0,2904	0,9999	9000,5307	11,6422	0,67
6	Dioscin	0,0989 - 0,2949	0,9997	8531,5917	12,2141	0,74
7	Gracillin	0,0974 - 0,2933	0,9999	9393,1621	1,4497	0,06
8	PS-I	0,0979 - 0,2960	0,9999	9341,5937	3,3260	0,18

Độ đúng

Chuẩn bị các mẫu thử: Cân chính xác khoảng 4,0 mg; 5,0 mg; 6,0 mg mỗi chất (tương ứng với 80%, 100% và 120% của nồng độ

dự tính định lượng) vào các bình định mức 25 ml, hòa tan và pha loãng vừa đủ thể tích bằng methanol. Ở mỗi mức nồng độ tiến hành 3 mẫu thử. Kết quả được tổng hợp trong bảng 4.

Bảng 4. Kết quả khảo sát độ đúng với các paris saponin

TT	Hợp chất	Mức 80%		Mức 100 %		Mức 120 %		% thu hồi trung bình	RSD (%)
		R (%)	RSD (%)	R (%)	RSD (%)	R (%)	RSD (%)		
1	PS-VII	99,64	1,53	99,53	0,39	99,64	0,10	99,60	0,80
2	PS-D	98,91	0,40	99,02	0,29	98,79	0,44	98,91	0,35
3	PS-H	99,30	1,24	98,38	0,18	99,44	0,41	99,04	1,07
4	PS-VI	99,38	1,03	98,18	1,14	99,17	0,56	99,14	0,85
5	PS-II	98,81	0,48	99,38	0,92	98,77	0,94	98,99	0,73
6	Dioscin	99,76	0,76	99,94	1,14	100,76	0,79	100,15	0,91
7	Gracillin	99,64	1,65	100,26	1,10	101,16	0,28	100,36	1,20
8	PS-I	99,12	1,07	98,46	0,57	98,79	0,53	100,36	1,20

Tỷ lệ thu hồi R ở trong khoảng 98,0 đến 102,0 % với RSD từ 0,10 đến 1,65% (< 2 %). Vậy phương pháp định lượng đồng thời 8 paris saponin đạt yêu cầu về độ đúng.

Khoảng xác định

Kết quả khảo sát độ tuyến tính cho thấy có sự tương quan tuyến tính giữa nồng độ và diện tích pic trong khoảng nồng độ các chất bằng 50% đến 150% so với nồng độ định lượng. Kết quả đánh giá độ đúng của phương pháp cho thấy tại nồng độ các chất bằng 80% đến 120%

so với nồng độ định lượng, phương pháp có độ đúng, độ lặp lại tốt và nằm trong khoảng tuyến tính. Như vậy, khoảng xác định của phương pháp là trong giới hạn từ 80 % đến 120% so với nồng độ dự tính định lượng.

Độ lặp lại

Chuẩn bị dung dịch thử độ lặp lại: Cân chính xác khoảng 5 mg mỗi chất vào bình định mức 25 ml, hòa tan và pha loãng vừa đủ thể tích với methanol. Tiến hành trên 6 mẫu thử. Kết quả được tổng hợp tóm tắt ở bảng 5.

Bảng 5. Kết quả khảo sát độ lặp lại của các paris saponin (n = 6)

TT	Hợp chất	Khối lượng mẫu thử (mg)	S_{pic} trung bình (mAu.s)		$m_{chuẩn}$ (mg)	Hàm lượng (%)	RSD (%)
			Thử	Chuẩn			
1	PS-VII	5,00 - 5,19	1470,7	1452,6	5,05	98,20	0,57
2	PS-D	5,02 - 5,18	1763,9	1745,6	5,04	96,52	0,38
3	PS-H	5,00 - 5,21	2174,6	2169,0	5,07	96,62	0,52
4	PS-VI	4,96 - 5,08	2161,8	2175,3	5,02	98,24	0,62
5	PS-II	5,02 - 5,19	1760,3	1735,1	5,03	96,66	0,63
6	Dioscin	5,03 - 5,12	1663,5	1661,3	5,12	97,59	0,37
7	Gracillin	5,01 - 5,15	1841,6	1833,4	5,09	96,21	0,36
8	PS-I	5,03 - 5,16	1874,4	1840,6	5,04	97,50	0,45

RSD của các kết quả định lượng từ 0,36% đến 0,63% đều nhỏ hơn 2%. Phương pháp định lượng đồng thời 8 paris saponin đạt yêu cầu về độ lặp lại.

Giới hạn phát hiện và giới hạn định lượng
Giới hạn phát hiện, giới hạn định lượng của các saponin xác định được như ở bảng 6.

Bảng 6. Giới hạn phát hiện và giới hạn định lượng của các saponin

Chất phân tích	PS-VII	PS-D	PS-H	PS-VI	PS-II	Dioscin	Gracillin	PS-I
LOD ($\mu\text{g/ml}$)	1,06	1,12	0,32	1,01	1,25	1,01	1,25	1,01
LOQ ($\mu\text{g/ml}$)	3,50	3,73	1,06	3,33	4,12	3,33	4,12	3,33

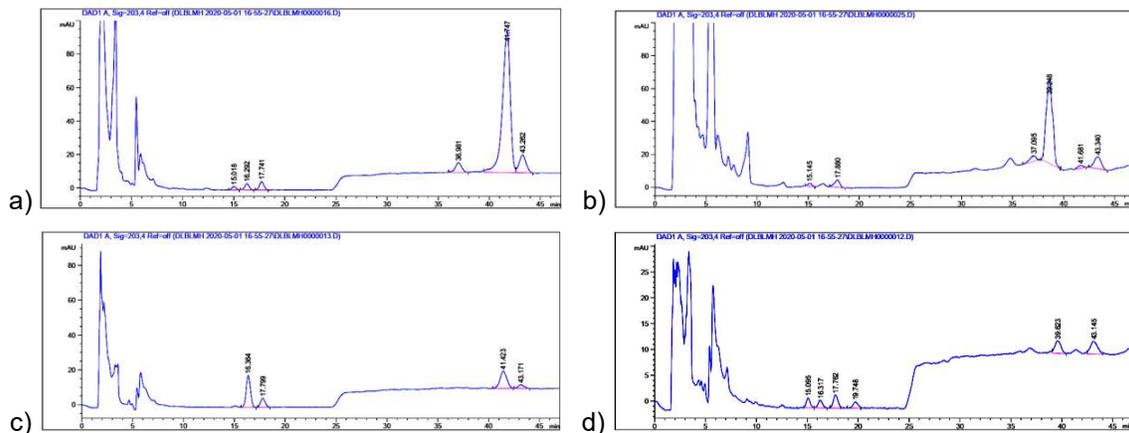
Ứng dụng phương pháp trên mẫu thực

Áp dụng phương pháp xây dựng được với 12 mẫu trong bảng 1. Kết quả thu được tổng hợp trong bảng 7 và bảng 8. Hình 3 là một số sắc ký

đồ đại diện cho thân rễ (mẫu 3), phần trên mặt đất (mẫu 9), cao khô (mẫu 11) và viên nang cứng Cung huyết ninh (mẫu 12).

Bảng 7. Thời gian lưu của các chất tương ứng trên SKĐ mẫu chuẩn và mẫu thử

STT	Hợp chất	Thời gian lưu (phút)		Các mẫu thử có pic tương ứng
		Mẫu chuẩn	Mẫu thử	
1	PS-VII	15,1	15,0 - 15,1	Mẫu 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 12
2	PS-D	16,4	16,3 - 16,4	Mẫu 1, 2, 3, 5, 6, 7, 11, 12
3	PS-H	17,8	17,7 - 17,8	Mẫu 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 11, 12
4	PS-VI	19,7	19,7	Mẫu 12
5	PS-II	37,0	36,9 - 37,2	Mẫu 3, 6, 7, 9, 10
6	Dioscin	39,7	39,2 - 40,0	Mẫu 5, 8, 9, 10, 12
7	Gracillin	41,7	41,5	Mẫu 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 11
8	PS-I	43,4	43,3	Mẫu 1, 3, 5, 8, 9, 11, 12

**Hình 3. Sắc ký đồ định lượng các saponin trong một số mẫu thực tế**

a) Mẫu 3 b) Mẫu 9 c) Mẫu 11 d) Mẫu 12

Bảng 8. Hàm lượng các saponin nghiên cứu có trong các mẫu khảo sát

Mẫu	Hàm lượng (%)							
	PS-VII	PS-D	PS-H	PS-VI	PS-II	Dioscin	Gracillin	Polyphyllin D
Mẫu 01	0,10	0,26	0,30	-	-	-	0,50	0,05
Mẫu 02	0,13	0,30	0,20	-	-	-	0,48	-
Mẫu 03	0,07	0,07	0,07	-	0,25	-	2,32	0,55
Mẫu 04	0,10		0,07	-	-	-	0,14	-
Mẫu 05	0,24	2,16	0,51	-	-	0,06	1,41	0,43
Mẫu 06	0,02	0,18	0,04	-	1,46	-	0,21	-
Mẫu 07	0,15	0,03	0,06	-	0,04	-	0,10	-
Mẫu 08		-		-		0,25		0,19
Mẫu 09	0,03	-	0,07	-	0,08	1,18	0,03	0,20
Mẫu 10	-	-	-	-	0,69	0,07	-	-
Mẫu 11	-	6,49	1,50	-	-	-	4,95	1,14
Mẫu 12	0,69	0,53	0,72	0,34	-	1,08	-	1,45

Kết quả ở bảng 8 cho thấy 8 saponin phân bố trong các mẫu với tần suất và hàm lượng khá dao động. Cần khảo sát trên số lượng mẫu đủ lớn để đưa ra mức giới hạn phù hợp cho các saponin này trong quá trình xây dựng tiêu chuẩn cho dược liệu bầy lá một hoa ở Việt Nam cũng như xác định hợp lý hơn các saponin (đánh dấu) cần được xác định hàm lượng với dược liệu này.

Kết luận

Một phương pháp **HPLC** đã được xây dựng cho phép định lượng được 8 saponin có trong cây bầy lá một hoa. Phương pháp khá đơn giản để phân tích cả 8 saponin trong thời gian 50 phút. Phương pháp đã được thẩm định đầy đủ các chỉ tiêu cần thiết và áp dụng trên 12 mẫu với 4 dạng khác nhau. Kết quả ban đầu cho thấy phương pháp khả thi trong việc áp dụng với các mẫu thực tế.

Tài liệu tham khảo

1. Wu S. S., Gao W. Y., Duan H. Q., Jia W. (2004), "Advances in studies on chemical constituents and pharmacological activities of *Rhizoma Paridis*", *Chinese Traditional and Herbal Drugs*, 35, pp. 344-346.

2. Gao L. L., Li F. R., Jiao P., Yang M. F., Zhou X. J., Si Y. H., Jiang W. J., Zheng T. T. (2011), "*Paris chinensis* dioscin induces G2/M cell cycle arrest and apoptosis in human gastric cancer SGC-7901 cells", *World Journal of Gastroenterology*, 17 (39), pp. 4389-4395.

3. Zhang X. F., Cui Y., Huang J. J., Zhang Y. Z., Nie Z., Wang L. F., Yan B. Z., Tang Y. L., Liu Y. (2007), "Immuno - stimulating properties of diosgenyl saponins isolated from *Paris polyphylla*", *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 17, pp. 2408-2413.

4. Chen Y. S., He Y., Chen C., Zeng Y., Xue D., Wen F. Y., Wang L., Zhang H., Du J. R. (2014), "Growth inhibition by pennogenyl saponin from *Rhizoma paridis* on hepatoma xenografts in nude mice", *Steroids*, 83, pp. 39-44

5. Fu Y. L., Yu Z. Y., Tang X. M., Zhao Y., Yuan X. L., Wang S., Ma B. P., Cong Y. W. (2008), "Pennogenin glycosides with a spirostanol structure are strong platelet agonists: Structural requirement for activity and mode of platelet agonist synergism", *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 6, pp. 524-533.

6. Justyna Stefanowicz-Hajduk, Rafal Bartoszewski, Sylwia Bartoszewska, Kinga Kochan, Anna Adamska, Igor Kosinski, J. Renata Ochocka (2015), "Pennogenyl saponins from *Paris quadrifolia* L. induce extrinsic and intrinsic pathway of apoptosis in human cervical cancer hela cells", *PlosONE*, 10 (8), pp. 0135993.

7. Pharmacopoeia of the people's republic of China (2015), IA, pp. 327-328.

8. Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương (2020), Xây dựng, thẩm định và phê duyệt phương pháp, *Thủ tục VKN/TT/09.17*.