

# ĐIỀU CHẾ, THIẾT LẬP CHẤT CHUẨN BACOSIDE A3 VÀ ĐÁNH GIÁ CHẤT LƯỢNG CAO RAU ĐẮNG BIỂN Ở CÁC ĐIỀU KIỆN CHIẾT XUẤT KHÁC NHAU

## PRODUCTION, ESTABLISHMENT OF THE STANDARD BACOSIDE A3 AND ASSESSING THE QUALITY OF *BACOPA MONNIERI* EXTRACTS UNDER DIFFERENT EXTRACTION CONDITIONS

*Lê Minh Hà\**, *Ngô Thị Phương\**, *Phạm Thị Nhung\**, *Phương Văn Thu\**,  
*Lưu Văn Chính\**, *Đỗ Thị Thanh Huyền\**, *Lê Ngọc Hùng†*

Ngày tòa soạn nhận được bài báo: 03/03/2022

Ngày nhận kết quả phản biện đánh giá: 05/09/2022

Ngày bài báo được duyệt đăng: 28/09/2022

**Tóm tắt:** Bacoside là nhóm hợp chất triterpene glycosid có cấu trúc nhân dammarane, được biết đến là thành phần hóa học chính, sở hữu nhiều hoạt tính sinh học quý báu, đặc biệt là tác dụng trên hệ thần kinh giúp cải thiện trí nhớ, tăng cường khả năng nhận thức, học hỏi của rau đắng biển (*Bacopa monnieri*). Bacoside A3 là một trong những hợp chất bacoside chính được tìm thấy trong rau đắng biển, chịu trách nhiệm cho hoạt tính của nhóm chất bacoside và được sử dụng như chất chuẩn để phân tích xác định hàm lượng bacoside tổng trong dược liệu hoặc cao chiết rau đắng biển. Tuy nhiên hiện nay ở Việt Nam, chất chuẩn Bacoside A3 chưa có sẵn mà phải nhập khẩu từ nước ngoài với giá rất cao và thời gian đặt hàng kéo dài. Vì vậy để chủ động trong việc tự tạo nguồn nguyên liệu chất chuẩn trong nước, trong bài báo này chúng tôi trình bày kết quả điều chế, thiết lập chất chuẩn bacoside A3 (với độ sạch cao  $\geq 98\%$ , hiệu suất đạt 0,006% so với dược liệu mẫu khô) từ dược liệu rau đắng biển thu tại Thanh Hoá. Đồng thời xây dựng quy trình định lượng bacoside tổng (tính theo tổng hàm lượng của 5 hợp chất bacoside chính là: bacoside A3, bacopaside I, bacopaside II, bacopaside X, và bacopasaponin C) theo chất chuẩn bacoside A3. Quy trình phân tích có độ lặp lại, độ chính xác và độ nhạy cao, được áp dụng để đánh giá chất lượng cao chiết rau đắng biển Việt Nam ở các điều kiện chiết xuất khác nhau. Kết quả cho thấy phương pháp chiết 5 (ngâm dược liệu rau đắng biển khô với nước ở nhiệt độ phòng 8 giờ sau đó loại nước và chiết mẫu với cồn 96 độ ở 60°C) tạo ra cao chiết có hàm lượng bacoside tổng là cao nhất (10,6%). Đây là lần đầu tiên hợp chất bacoside A3 được điều chế và thiết lập làm chất chuẩn từ dược liệu rau đắng biển của Việt Nam và được áp dụng để đánh giá chất lượng của các cao chiết rau đắng biển ở các điều kiện chiết xuất khác nhau.

---

\* Viện Hóa học các hợp chất thiên nhiên, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam (VAST)

† Trung tâm nghiên cứu và chuyển giao công nghệ (VAST)

**Từ khóa:** Rau đắng biển, *Bacopa monnieri*, hàm lượng bacoside tổng, bacoside A3, HPLC, định lượng.

**Abstract:** Bacoside is the name of triterpene glycosides with dammarane structure, known to be the main chemical constituent in *Bacopa monnieri*, which possesses many valuable biological activities, especially effects on the nervous system to help improve memory, enhance cognition and learning. Bacoside A3 is one of the major bacosides found in *B. monnieri*, which is considered to be the main component responsible for the activity of bacosides and has been used as a standard to determine the total bacoside content in *B. monnieri* raw material and extracts. However, currently in Vietnam, bacoside A3 is not available and must be imported from abroad with a very high price and long order time. Therefore, in order to be proactive in creating a domestic source of bacoside A3, in this article we present the results of preparation and establishment of the standard bacoside A3 (with high purity  $\geq 98\%$ , yield of 0.006% compared to dry sample) from *B. monnieri* collected in Thanh Hoa province. Simultaneously, the process of quantitative analysis of total bacosides (the total content of five major bacosides: bacoside A3, bacopaside I, bacopaside II, bacopaside X, và bacopasaponin C) according to bacoside A3 was developed. The analytical procedure had high reproducibility, accuracy and sensitivity, was applied to evaluate the quality of *B. monnieri* extracts under different extraction conditions. The results showed that the extraction method 5 (soaking dried *B. monnieri* powder in water at room temperature for 8 hours and then removing water and extracting with alcohol (96 degrees) at 60°C produced the extract with the highest total bacoside content (10.6%). This is the first time that bacoside A3 has been prepared and established as a standard from Vietnamese *B. monnieri* and was applied to evaluate the quality of *B. monnieri* extracts under different extraction conditions.

**Keywords:** *Bacopa monnieri*, total bacoside content, bacoside A3, HPLC, quantitative analysis.

## I. Đặt vấn đề

Rau đắng biển hay còn gọi là rau sam trắng, rau sam đắng, cây ruột gà, có tên khoa học là *Bacopa monnieri* (L.) Wettst., thuộc họ Hoa mõm chó (Scrophulariaceae). Rau đắng biển là loại thảo mộc thân bò lâu năm, phân bố rộng rãi khắp các vùng đồng bằng và Trung du miền Bắc và miền Nam nước ta và được sử dụng như một loại rau ăn hoặc để chữa bệnh suy nhược thần kinh, mất trương lực cơ, động kinh, viêm phế quản, ho, hen, viêm gan, thấp khớp và một số bệnh ngoài da. Đặc biệt, rau đắng biển được sử dụng trong y học Ấn Độ từ ít nhất 3000 năm trước để cải thiện trí nhớ và khả năng nhận thức. Trong y học hiện đại, rau

đắng biển được sử dụng để làm giảm và ngăn ngừa sự căng thẳng, tăng sự tập trung, cải thiện trí nhớ và chức năng nhận thức khác, có thể hỗ trợ khả năng nhận thức ở người già, rất tốt cho bệnh nhân Alzheimer, thiếu năng tuần hoàn não, tai biến mạch máu não. [1,2]

Các nghiên cứu đã chỉ ra thành phần hóa học của rau đắng biển bao gồm các nhóm chất triterpen glycoside, sterol, sterol glycosid, các phenylethan glycosid, cucurbitacin, alkaloid và flavonoid. Trong đó thành phần quan trọng được cho là chịu trách nhiệm chính cho tác dụng dược lý của rau đắng biển là các hợp chất triterpene glycosid nhóm dammaran

(bacoside), trong đó có bacoside A3. [3] Do đó, chất lượng dược liệu rau đắng biển có thể được đánh giá bằng cách xác định hàm lượng của nhóm hoạt chất bacoside có trong dược liệu. Hơn 30 hợp chất bacoside khác nhau chủ yếu thuộc hai bộ khung jujubogenin và pseudojujubogenin đã được phân lập từ rau đắng biển. [4] Theo Dược điển Anh và Dược điển Mỹ, hàm lượng bacoside tổng được tính theo tổng hàm lượng của 5 hợp chất bacoside chính là: bacoside A3, bacopaside I, bacopaside II, bacopaside X, và bacopasaponin C. Dược điển Mỹ sử dụng bacoside A3 làm chất chuẩn trong định lượng bacoside tổng trong rau đắng biển. [5,6] Tuy nhiên, Dược điển Việt Nam V chưa đề cập đến hàm lượng bacoside và bacoside A3 trong dược liệu rau đắng biển cũng như các cao chiết xuất rau đắng biển. Hiện nay ở Việt Nam, chất chuẩn Bacoside A3 chưa có sẵn mà phải nhập khẩu từ nước ngoài với giá rất cao và thời gian đặt hàng kéo dài. Vì vậy để chủ động trong việc tự tạo nguồn nguyên liệu chất chuẩn trong nước, trong bài báo này chúng tôi trình bày kết quả điều chế, thiết lập chất chuẩn bacoside A3 từ dược liệu rau đắng biển thu tại Thanh Hoá. Đồng thời xây dựng quy trình định lượng bacoside tổng theo chất chuẩn bacoside A3. Quy trình này được áp dụng để đánh giá chất lượng cao chiết rau đắng biển Việt Nam ở các điều kiện chiết xuất khác nhau qua đó nhằm đánh giá hiệu quả của các phương pháp chiết.

## II. Nguyên liệu và phương pháp nghiên cứu

### 2.1. Nguyên liệu

Toàn cây rau đắng biển được thu hái tại tỉnh Thanh Hóa, Việt Nam vào tháng

2 năm 2022. Mẫu cây đã được giám định bởi Tiến sĩ Nguyễn Thị Phương Trang – Viện sinh thái và Tài nguyên Sinh vật, VAST. Mẫu tiêu bản số RDB-22 được lưu trữ tại Viện Hoá học các hợp chất thiên nhiên, VAST.

### 2.2. Hoá chất và thiết bị

Sắc ký lớp mỏng (TLC): Sắc ký lớp mỏng được thực hiện trên bảng mỏng trắng sẵn DC-Aluofolien 60 F<sub>245</sub> (Merck), RP-18 F254s (Merck). Phát hiện vết chất bằng đèn tử ngoại ở hai bước sóng 254nm và 368nm và thuốc thử là dung dịch H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 10% trong cồn, hơi nóng từ trên bếp điện đến khi hiện màu.

Sắc ký cột (CC): Sắc ký cột được tiến hành với chất hấp phụ là silica gel pha thường (0,040-0,063 mm, Merck) và pha đảo RP-18 (0,040 mm, Merck), nhựa diaion™ HP20 (Misubishi).

Phổ cộng hưởng từ hạt nhân <sup>1</sup>H-(500 MHz) và <sup>13</sup>C-(125MHz) được đo trên máy Bruker AM500-FT-NMR sử dụng TMS làm chất nội chuẩn.

Phương pháp định lượng được thực hiện trên hệ thống phân tích HPLC Agilent 1260 với cột Eclipse XDB-C8 (4,6 x 150mm, 5µm) và detector UV-Vis. Acetonitrile, methanol (tiêu chuẩn HPLC), acid formic (Fa) độ sạch 99% được mua từ hãng Merck, Đức.

### 2.3. Điều chế, thiết lập chất chuẩn bacoside A3

Mẫu cây rau đắng biển sau thu hái, phơi sấy khô, nghiền thành bột mịn. Bột mẫu rau đắng biển (1,5 kg) sau đó được ngâm chiết với cồn 96 độ ở 50°C, (3 lần, mỗi lần 24 giờ). Dịch chiết được gom lại, lọc qua giấy lọc và cất loại dung môi dưới

áp suất giảm thu được 125 g cặn chiết tổng RDB/cồn. Cặn RDB/cồn sau đó được phân tán trong 200 ml nước cất ở nhiệt độ phòng rồi tiến hành chiết phân bố lần lượt bằng *n*-hexan, ethyl acetate. Mỗi dung môi chiết lặp lại 3 lần. Phần dịch nước đem cô quay còn ½ thể tích sau đó được tiến hành phân tách bởi chất hấp phụ dianion, rửa giải bằng hệ dung môi metanol : nước tỷ lệ (0:100, 25:75, 50:50, 75:50, 100:0). Phần dịch rửa giải bằng hệ metanol : nước (100:0) cô quay để loại dung môi thu được 15 g cặn chiết methanol. Cặn methanol sau đó được phân tách trên sắc ký cột silica gel với hệ dung môi rửa giải Diclometan/methanol/nước (10:1:1) thu được 5 phân đoạn ký hiệu là M1 đến M5. Phân đoạn M2 tiếp tục được phân tách bởi sắc ký cột pha đảo RP18, rửa giải bằng hệ dung môi methanol/nước (4:1) thu được 4 phân đoạn M2.1 đến M2.4. Phân đoạn M2.2 tiếp tục được phân tách bằng sắc ký cột silicagel pha thường với dung môi rửa giải là Diclometan/methanol/nước (5:1:0,5) thu được 4 phân đoạn là M2.2.1 đến M2.2.4. Tinh chế phân đoạn M2.2.3 bằng sắc ký cột pha đảo với hệ dung môi rửa giải là methanol/nước (3:1) thu được hợp chất sạch ký hiệu là RDB-1 (95 mg, hiệu suất đạt 0,006 % so với khối lượng được liệu khô).

**Hợp chất RDB-1:** Bột vô định hình, màu trắng.

**<sup>1</sup>H-NMR (500MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ (ppm):** 0,76 (1H, d, *J* = 9,5 Hz, H-5); 0,88 (3H, s, H-29); 0,90 (3H, s, H-19); 1,03 (1H, d, *J* = 5,5 Hz, H-17); 1,08 (3H, s, H-28); 1,15 (3H, s, H-18); 1,16 (3H, s, H-21); 1,20 (1H, d, *J* = 7,5 Hz, Ha-7); 1,40 (1H, dd, *J* = 9,5, 11,5 Hz, Ha-22); 1,49 (1H, dd, *J* = 9,5, 11,5 Hz, Hb-22);

1,71 (3H, s, H-26); 1,74 (3H, s, H-27); 2,08 (1H, d, *J* = 7,5 Hz, Hb-7); 2,50 (1H, m, H-13); 3,17 (1H, m, H-3); 3,94 (1H, m, Ha-30); 4,04 (1H, m, Hb-30); 4,69 (1H, td, *J* = 9,0, 1,5 Hz, H-23); 5,18 (1H, m, H-24); 4,60 (1H, d, *J* = 6,5 Hz, H-1'); 3,26 (1H, m, H-2''); 3,37 (1H, m, H-3''); 3,29 (1H, m, H-4''); 3,37 (1H, m, H-5''); 3,64 (1H, m, Ha-6''); 3,92 (1H, m, Hb-6''); 4,47 (1H, d, *J* = 6,5 Hz, H-1'''); 3,51 (1H, m, H-2'''); 3,70 (1H, m, H-3'''); 3,44 (1H, m, H-4'''); 3,30 (1H, m, H-5'''); 3,70 (1H, m, Ha-6'''); 3,86 (1H, m, Hb-6'''); 5,46 (1H, d, *J* = 2,0 Hz, H-1'''''); 4,13 (1H, m, H-1'''''); 3,95 (1H, m, H-1'''''); 4,04 (1H, m, H-1'''''); 3,62 (1H, m, H-1'''''); 3,70 (1H, m, H-1''''').

**<sup>13</sup>C-NMR (125MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ (ppm):** 16,79 (C-29); 16,83 (C-19); 18,38 (C-26); 19,12 (C-6); 19,18 (C-18); 22,53 (C-11); 25,74 (C-27); 27,27 (C-2); 28,24 (C-28); 29,18 (C-12); 29,59 (C-21); 36,89 (C-15); 37,11 (C-7); 38,05 (C-13); 38,25 (C-8); 38,49 (C-10); 39,82 (C-1); 40,54 (C-4); 45,36 (C-22); 54,15 (C-9); 54,39 (C-17); 54,62 (C-14); 57,46 (C-5); 66,85 (C-30); 69,45 (C-20); 69,68 (C-23); 90,72 (C-3); 111,40 (C-16); 126,27 (C-24); 136,73 (C-25); 104,2 (C-1'); 75,51 (C-2''); 78,21 (C-3''); 71,66 (C-4''); 78,10 (C-5''); 62,62 (C-6''); 105,53 (C-1'''); 80,07 (C-2'''); 87,41 (C-3'''); 70,25 (C-4'''); 77,20 (C-5'''); 62,70 (C-6'''); 109,93 (C-1'''''); 83,61 (C-2'''''); 77,57 (C-3'''''); 84,69 (C-4'''''); 62,10 (C-5''''').

#### 2.4. Các phương pháp chiết xuất cao rau đắng biển

##### Phương pháp 1:

500 gam bột rau đắng biển khô được ngâm chiết với nước ở 60°C trong 4 giờ sau đó chiết để thu dịch lọc. Quá trình

chiết lặp lại 3 lần. Gôm các dịch chiết và cất loại dung môi dưới áp suất giảm đến khô kiệt thu được 91,5 gam cao chiết. Hiệu suất chiết đạt 18,3 % so với khối lượng dược liệu khô.

### **Phương pháp 2:**

500 gam bột rau đắng biển khô được ngâm chiết với cồn 96 độ ở nhiệt độ phòng trong 24 giờ sau đó chiết để thu dịch lọc. Quá trình chiết lặp lại 3 lần. Gôm các dịch chiết và cất loại dung môi dưới áp suất giảm đến khô kiệt thu được 99 gam cao chiết. Hiệu suất chiết đạt 19,8 % so với khối lượng dược liệu khô.

### **Phương pháp 3:**

500 gam bột rau đắng biển khô được ngâm chiết với cồn 96 độ ở 60°C trong 4 giờ sau đó chiết để thu dịch lọc. Quá trình chiết lặp lại 3 lần. Gôm các dịch chiết và cất loại dung môi dưới áp suất giảm đến khô kiệt thu được 108,5 gam cao chiết. Hiệu suất chiết đạt 21,7 % so với khối lượng dược liệu khô.

### **Phương pháp 4:**

500 gam bột rau đắng biển khô được ngâm với nước ở nhiệt độ phòng trong 8 giờ. Loại bỏ dịch nước, bã dược liệu tiếp tục được ngâm chiết với cồn 96 độ ở nhiệt độ phòng trong 24 giờ sau đó chiết để thu dịch lọc. Quá trình chiết với cồn lặp lại 3 lần. Gôm các dịch chiết và cất loại dung môi dưới áp suất giảm đến khô kiệt thu được 69 gam cao chiết. Hiệu suất chiết đạt 13,8 % so với khối lượng dược liệu khô.

### **Phương pháp 5:**

500 gam bột rau đắng biển khô được ngâm với nước ở nhiệt độ phòng trong 8 giờ. Loại bỏ dịch nước, bã dược

liệu tiếp tục được ngâm chiết với cồn 96 độ ở 60°C trong 4 giờ sau đó chiết để thu dịch lọc. Quá trình chiết với cồn lặp lại 3 lần. Gôm các dịch chiết và cất loại dung môi dưới áp suất giảm đến khô kiệt thu được 97,5 gam cao chiết. Hiệu suất chiết đạt 19,5 % so với khối lượng dược liệu khô.

## **2.5. Xây dựng quy trình phân tích hàm lượng bacoside tổng theo bacoside A3 bằng HPLC**

### **2.5.1. Chuẩn bị mẫu**

Chuẩn bị dung dịch chuẩn: Hòa tan 10 mg bacoside A3 trong 10 ml methanol để thu được dung dịch chuẩn gốc có nồng độ 1000 µg/ml. Tiếp tục pha loãng tới các nồng độ 100, 200, 500, và 600 µg/ml. Các dung dịch chuẩn được lọc qua màng lọc 0,45 µm trước khi được tiêm vào hệ thống sắc ký.

Chuẩn bị dung dịch thử: Cân chính xác khoảng 15 mg các cao chiết rau đắng biển và hòa tan trong 10 ml methanol. Dung dịch thử sau đó được lọc qua màng lọc 0,45 µm trước khi được tiêm vào hệ thống sắc ký.

### **2.5.2. Điều kiện định lượng**

Sự định lượng được tiến hành trên hệ thống thiết bị HPLC 1260 với cột Eclipse XDB-C8 (4,6 x 150mm, 5µm) và detector UV-Vis được cài đặt ở bước sóng 205 nm. Dung môi pha động kênh A: dung dịch nước 0,1% acid formic, kênh B: acetonitrile. Tốc độ dòng 1,0 mL/min. Nhiệt độ cột duy trì ở 25°C. Thể tích tiêm mẫu 10 µL. Pha động được rửa giải theo chương trình gradient như sau (bảng 1):

Bảng 1. Chương trình gradient

Thời gian (phút)	% Kênh A	% Kênh B
0-15	80-70	20-30
15-38	70	30
38-40	70-80	30-20
40-45	80	20

### 2.5.3. Phương pháp xác định hàm lượng tổng bacoside trong cao chiết rau đắng biển

Chúng tôi tham khảo Dược điển Mỹ [6] để đưa ra phương pháp xác định hàm lượng bacoside tổng trong cao chiết rau đắng biển bằng cách tính tổng diện tích các pic của 5 hợp chất bacoside chính và quy đổi tương đương theo phương trình đường chuẩn của chất chuẩn bacoside A3. Theo Dược điển Mỹ, ở các điều kiện phân tích đã chọn thì các bacoside chính: bacopaside I, bacoside A3, bacopaside II, bacopaside X, và bacopasaponin C sẽ lần lượt xuất hiện theo thời gian lưu tăng dần. Dựa trên cơ sở này, chúng tôi có thể định vị các pic bacoside chính trên sắc ký đồ khi phân tích các mẫu cao chiết rau đắng biển khi áp dụng các điều kiện phân tích tương tự.

## III. Kết quả và thảo luận

### 3.1. Kết quả thiết lập chất chuẩn Bacoside A3 (RDB-1)

Hợp chất RDB-1 thu được dưới dạng bột vô định hình màu trắng. Phổ cộng hưởng từ hạt nhân  $^{13}\text{C-NMR}$  của hợp chất RDB-1 cho thấy tín hiệu của 47 nguyên tử cacbon. Trong đó, 30 nguyên tử C có độ chuyển dịch hóa học  $\delta_{\text{C}}$  hoàn toàn trùng khớp với độ chuyển dịch hóa học  $\delta_{\text{C}}$  của bộ khung jujubogenin trong tài liệu tham khảo [7]. 17 nguyên tử C còn lại có độ chuyển dịch hóa học  $\delta_{\text{C}}$  nằm

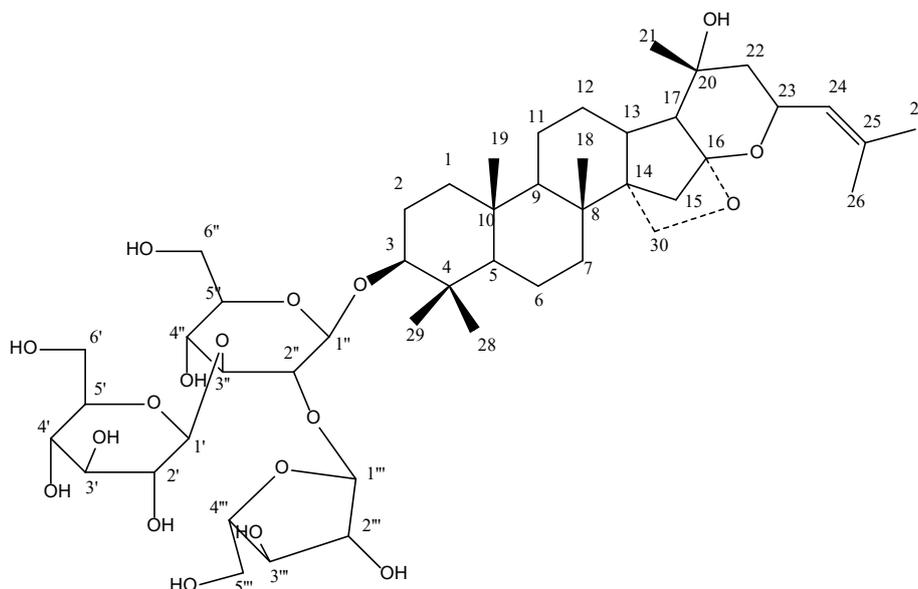
trong khoảng 62,10 tới 109,93 gợi ý sự có mặt của 3 đơn vị đường với 3 nguyên tử cacbon anomeric có  $\delta_{\text{C}}$  lần lượt là 109,93, 105,53 và 104,22 ppm.

Phân tích dữ liệu phổ  $^1\text{H-NMR}$ ,  $^{13}\text{C-NMR}$  kết hợp với phổ hai chiều HSQC của hợp chất RDB-1 cho thấy tín hiệu của 7 nhóm methyl dạng singlet tại  $\delta_{\text{H}}$  0,88, 0,90, 1,08, 1,15, 1,16, 1,71 và 1,74 ppm, 7 nhóm metin tại  $\delta_{\text{C}}$  126,27, 90,72, 69,68, 57,46, 54,39, 54,15, 38,05 ppm, 9 nhóm metylen tại  $\delta_{\text{C}}$  66,85, 45,36, 39,82, 37,11, 36,89, 29,18, 27,27, 22,53, 19,12 ppm và 7 nguyên tử cacbon bậc 4 tại  $\delta_{\text{C}}$  136,73, 111,4, 69,45, 54,62, 40,54, 38,49, 38,25 ppm thuộc bộ khung jujubogenin. Ba proton anomeric tương ứng với ba nguyên tử cacbon anomeric có  $\delta_{\text{C}}$  là 109,93, 105,53 và 104,22 ppm có độ chuyển dịch hóa học  $\delta_{\text{H}}$  4,60 (1H, d,  $J = 6,5$  Hz), 4,47 (1H, d,  $J = 6,5$  Hz), 5,46 (1H, d,  $J = 2,0$  Hz). Dựa vào các dữ kiện thu được từ phổ  $^1\text{H-NMR}$ ,  $^{13}\text{C-NMR}$ , HSQC kết hợp với dữ kiện phổ thu được từ phổ hai chiều HMBC và COSY cho phép dự đoán sự có mặt của 2 phân tử đường glucopyranose và 1 phân tử đường arabinofuranose trong phân tử RDB-1. Tương tác xa HMBC giữa H-1'' ( $\delta_{\text{H}}$  4,47) và C-3 ( $\delta_{\text{C}}$  90,72) gợi ý phân tử glucose được gắn vào vị trí C-3 của khung jujubogenin. Hằng số tương tác  $J = 6,5$  Hz gợi ý đây là liên kết  $\beta$ -glycoside. Tương tác HMBC giữa H-1' ( $\delta_{\text{H}}$  4,60) và C-3'' ( $\delta_{\text{C}}$  90,72) gợi ý phân tử glucose thứ hai được gắn vào vị trí C-3'' của phân tử glucose thứ nhất thông qua liên kết  $\beta$ -glycoside (hằng số tương tác  $J = 6,5$  Hz). Tương tác HMBC giữa H-1''' ( $\delta_{\text{H}}$  5,46) và C-2'' ( $\delta_{\text{C}}$  80,07) gợi ý phân tử đường arabinofuranose gắn vào vị trí C-2'' của phân tử đường glucose thứ nhất. Hằng số tương tác  $J = 2,0$  Hz gợi

ý hai phân tử đường được nối với nhau thông qua liên kết  $\alpha$ -glycoside.

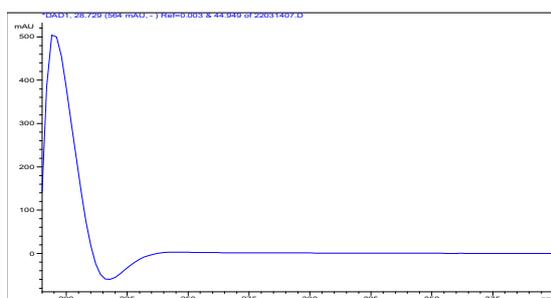
So sánh dữ kiện phổ thu được của hợp chất RDB-1 với dữ kiện phổ của bacoside A3 trong tài liệu tham khảo [8] thấy hoàn toàn trùng khớp. Do đó hợp chất

RDB-1 được xác định là bacoside A3 hay 3- $\beta$ -[O- $\beta$ -D-glucopyranosyl (1 $\rightarrow$ 3)-O- $\alpha$ -L-arabinofuranosyl (1 $\rightarrow$ 2)]-O- $\beta$ -D-glucopyranosyl)-oxy] jujubogenin (hình 1). Hợp chất RDB-1 hay bacoside A3 đạt độ sạch  $\geq 98\%$  khi phân tích trên HPLC.

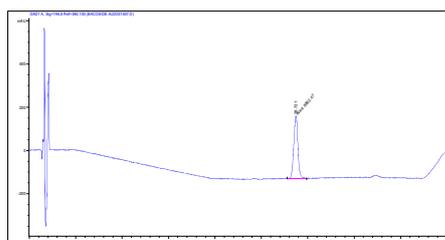


Hình 1. Cấu trúc hợp chất bacoside A3 phân lập từ rau đắng biển

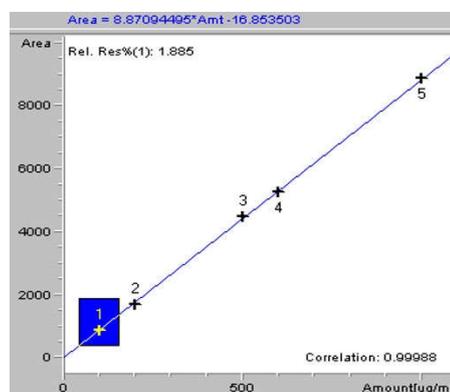
### 3.2. Xây dựng đường chuẩn bacoside A3



Hình 2. Phổ UV của chất chuẩn bacoside A3



Hình 3. Sắc kí đồ của chất chuẩn bacoside A3



Hình 4. Đường chuẩn định lượng bacoside A3

Bacoside A3 được phát hiện bởi detector UV-Vis/DAD ở bước sóng 205 nm (bước sóng này được chọn thông qua thí nghiệm quét khoảng hấp thụ cực đại UV của bacoside A3 kết hợp với việc tham khảo các tài liệu đã công bố [6,9,10]). Phổ UV của chất chuẩn bacoside A3 được thể hiện ở hình 2. Píctín hiệu của bacoside A3

được phát hiện một cách ổn định tại thời gian lưu Rt khoảng 28,7 phút (hình 3).

Đường chuẩn định lượng bacoside A3 (hình 4) được thiết lập dựa trên thang nồng độ 100-1000 µg/ml, mỗi nồng độ được phân tích lặp lại 3 lần. Diện tích pic trung bình thu được sẽ là số liệu để dựng đường chuẩn biểu diễn sự phụ thuộc của diện tích pic vào nồng độ. Kết quả thu được phương trình đường chuẩn  $y = 8,87094495x - 16,853503$  có hệ số  $R^2 = 0,99988$ . Điều này chứng tỏ rằng giữa nồng độ bacoside A3 và diện tích pic có sự tương quan tuyến tính tốt.

### 3.3. Tính thích hợp của hệ thống

Bảng 2. Kết quả đánh giá tính thích hợp của hệ thống

STT	Thời gian lưu (phút)	Diện tích pic
1	28,712	4495
2	28,721	4487
3	28,689	4498
4	28,703	4486
5	28,695	4505
6	28,685	4510
<b>Trung bình</b>	<b>28,701</b>	<b>4496,83</b>
<b>SD</b>	<b>0,014</b>	<b>9,58</b>
RSD (%)	0,05	0,21

Bảng 3. Kết quả đánh giá độ lặp lại của phương pháp

STT	Khối lượng cao chiết (mg)	Diện tích pic	Nồng độ (µg/ml)	Hàm lượng bacoside tổng trong cao chiết rau đắng biển (%)
1	15,0022	1397	159,38	10,62
2	15,0011	1395	159,15	10,61
3	15,0013	1392	158,82	10,59
4	15,0018	1400	159,72	10,65
5	15,0028	1398	159,49	10,63
6	15,0007	1401	159,83	10,65
<b>Trung bình</b>				<b>10,63</b>
<b>SD</b>				<b>0,025</b>
<b>RSD (%)</b>				<b>0,23</b>

Tiến hành sắc ký đối với dung dịch chuẩn bacoside A3 ở nồng độ 500 µg/ml ở điều kiện đã chọn lặp lại 6 lần. Thời gian lưu và diện tích pic tương ứng được thể hiện trong bảng 2. Độ lệch chuẩn tương đối của thời gian lưu và diện tích pic lần lượt là 0,05% và 0,21% (< 2%) chứng tỏ hệ thống sắc ký và các điều kiện phân tích là phù hợp cho việc phân tích định lượng.

### 3.4. Độ lặp lại của phương pháp

Độ lặp lại của phương pháp được xác định trên cùng một mẫu thử cao chiết rau đắng biển bằng cách xác định hàm lượng bacoside tổng theo phương pháp đã mô tả ở mục 2.5. Phép phân tích được lặp lại 6 lần. Tính toán độ lệch chuẩn tương đối của hàm lượng bacoside tổng. Kết quả phân tích được thể hiện trong bảng 3. Độ lệch chuẩn tương đối của hàm lượng bacoside tổng là 0,23 % (< 1,5 %). Do đó phương pháp phân tích đã xây dựng có độ lặp lại cao, có thể ứng dụng để đánh giá hàm lượng bacoside tổng trong cao chiết rau đắng biển.

### 3.5. Độ chính xác của phương pháp

Độ chính xác của phương pháp được xác định bằng phương pháp thêm chuẩn. Cân chính xác khoảng 15 mg mẫu thử cao chiết rau đắng biển và tiến hành xử lý mẫu theo quy trình đã nêu ở mục 2.5.1. Tiến hành thêm chuẩn bacoside A3 ở ba mức 1 mg, 2 mg, 4 mg vào mỗi 10 ml dịch chiết mẫu thử. Phân tích định lượng bacoside

tổng trong các mẫu trước và sau khi thêm chuẩn. Kết quả được thể hiện trong bảng 4. Kết quả độ thu hồi trung bình của phương pháp định lượng bacoside tổng trong cao chiết rau đắng biển bằng phương pháp HPLC dao động từ 100,44% – 100,91% (nằm trong khoảng 98% - 102%). Điều này chứng tỏ phương pháp phân tích đã xây dựng có độ chính xác cao.

Bảng 4. Kết quả đánh giá độ chính xác của phương pháp

Khối lượng cao chiết (mg)	Thể tích mẫu thử (ml)	Chuẩn thêm vào (mg)	Nồng độ bacoside tổng sau thêm chuẩn (µg/ml)	Trung bình (µg/ml)	Độ thu hồi trung bình (%)
15,0012	10	0	159,49	159,57	0
15,0022	10	0	160,28		
15,0010	10	0	158,93		
15,0021	10	1	259,14	260,01	100,44
15,0016	10	1	260,05		
15,0026	10	1	260,84		
15,0013	10	2	362,06	361,39	100,91
15,0005	10	2	360,60		
15,0012	10	2	361,50		
15,0009	10	4	560,80	561,48	100,48
15,0008	10	4	562,16		
15,0017	10	4	561,48		

### 3.6. Giới hạn phát hiện và giới hạn định lượng

Giới hạn phát hiện (LOD) và giới hạn định lượng (LOQ) được xác định dựa vào đường chuẩn. Giới hạn phát hiện LOD được tính toán theo công thức  $3*SD/a$ , trong đó SD độ lệch chuẩn, a độ dốc của đường chuẩn. Giới hạn định lượng LOQ được tính toán theo công thức  $10*SD/a$ . Kết quả cho thấy giá trị LOD và LOQ của bacoside A3 được xác định lần lượt là 3,2 µg/ml và 10,8 µg/ml.

### 3.7. Áp dụng xác định hàm lượng bacoside tổng trong các cao chiết rau đắng biển ở các điều kiện chiết xuất khác nhau

Sử dụng phương pháp định lượng đã xây dựng để đánh giá hàm lượng bacoside tổng trong các cao chiết rau đắng biển thu được theo các phương pháp chiết khác nhau được mô tả ở mục 2.4. Kết quả thu được (bảng 5) cho thấy phương pháp chiết 5 (ngâm dược liệu rau đắng biển khô với nước ở nhiệt độ phòng 8 giờ sau đó loại nước và chiết mẫu với cồn 96 độ ở 60°C 3 lần) tạo ra cao chiết có hàm lượng bacoside tổng là cao nhất (10,6%) với hiệu suất chiết cao (19,5%). Phương pháp chiết 4 (ngâm dược liệu rau đắng biển khô với nước ở nhiệt độ phòng 8 giờ sau đó loại nước và chiết mẫu với cồn 96% ở nhiệt độ phòng 3 lần) cho cao chiết có hàm lượng bacoside tổng cao thứ hai (9,98%) với hiệu

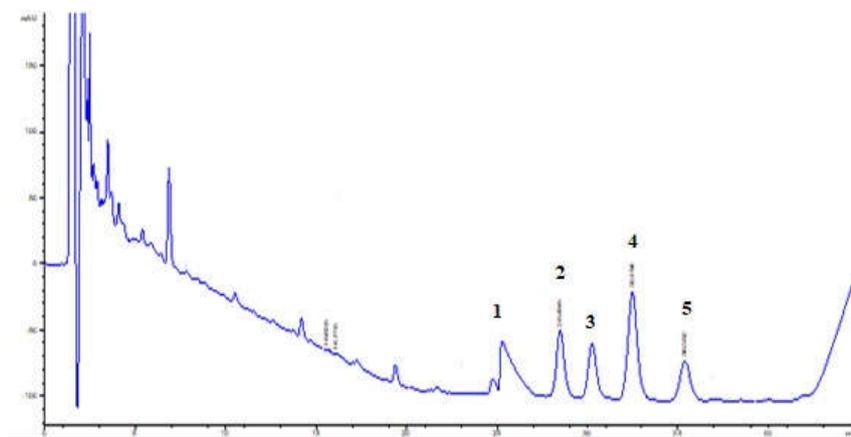
suất chiết đạt 13,8%. Phương pháp chiết 3 (chiết rau đắng biển với cồn 96 độ ở 60°C) cho hiệu suất chiết cao nhất (21,7%) với hàm lượng tổng bacoside trong cao chiết chỉ đạt 8,23%. Phương pháp chiết 2 (chiết với cồn 96 độ ở nhiệt độ phòng) cho hiệu suất chiết đạt 19,8% nhưng hàm lượng bacoside trong cao chiết lại thấp (6,18%). Phương pháp chiết 1 (chiết với nước ở 60°C) cho hiệu suất chiết tương đối cao (18,3%) nhưng hàm lượng bacoside tổng trong cao chiết lại rất thấp chỉ đạt 0,65%.

Căn cứ vào kết quả thu được (hiệu suất chiết, hàm lượng bacoside tổng trong cao chiết), chúng tôi nhận thấy phương pháp chiết 5 là tối ưu nhất, cho cao chiết có hàm lượng bacoside tổng cao nhất 10,60% (tính theo 5 bacoside chính),

hiệu suất chiết cao (19,5%). Việc ngâm dược liệu rau đắng biển với nước trước khi chiết với cồn giúp cho bột dược liệu mềm, trương nở để cho dung môi chiết dễ dàng xâm nhập và hòa tan các hoạt chất hơn. Mặt khác, việc loại bỏ dịch nước này sẽ giúp loại bỏ được một phần các tạp chất khỏi dược liệu trước khi chiết với dung môi cồn bao gồm chất đường, muối và chất nhầy dễ tan trong nước. Quy trình chiết đơn giản, dễ thực hiện, dung môi an toàn thân thiện môi trường, không đòi hỏi thiết bị phức tạp, có thể áp dụng ở quy mô sản xuất. Điều này gợi ý có thể áp dụng phương pháp chiết này để sản xuất cao chiết rau đắng biển làm nguyên liệu bào chế các sản phẩm thực phẩm bảo vệ sức khỏe.

*Bảng 5. Hàm lượng bacoside tổng trong cao chiết rau đắng biển ở các điều kiện chiết khác nhau*

TT	Ký hiệu mẫu	Phương pháp chiết/ dung môi/ nhiệt độ chiết	Hiệu suất chiết (%)	Hàm lượng bacoside tổng (tính cho 5 bacoside chính) trong cao chiết (%)
1	RĐB-1	1/ nước/60°C	18,3	0,65
2	RĐB-2	2/ cồn 96 độ/ nhiệt độ phòng	19,8	6,18
3	RĐB-3	3/ cồn 96 độ/ 60°C	21,7	8,23
4	RĐB-4	4/ chiết loại nước ở nhiệt độ phòng/ chiết cồn 96 độ nhiệt độ phòng	13,8	9,98
5	RĐB-5	5/ chiết loại nước ở nhiệt độ phòng/ chiết t cồn 96 độ ở 60°C	19,5	10,60



*Hình 5. Sắc ký đồ HPLC của mẫu dược liệu RĐB-5; (1) bacopaside I; (2) bacoside A3; (3) bacopaside II; (4) bacopaside X; (5) bacopasaponin C*

#### IV. Kết luận

Đây là lần đầu tiên hợp chất bacoside A3 được thiết lập làm chất chuẩn định lượng để đánh giá chất lượng dược liệu và cao chiết xuất rau đắng biển thông qua việc đánh giá hàm lượng bacoside tổng. Cấu trúc của bacoside A3 được xác định dựa vào phương pháp phổ cộng hưởng từ hạt nhân NMR một và hai chiều kết hợp so sánh với dữ liệu phổ trong tài liệu tham khảo. Hợp chất bacoside A3 được thiết lập làm chất chuẩn với độ sạch cao ( $\geq 98\%$ ). Quy trình định lượng bacoside tổng trong cao chiết rau đắng biển bằng HPLC có độ lặp lại, độ chính xác cao, độ nhạy tốt với giới hạn phát hiện và giới hạn định lượng lần lượt là 3,2 và 10,8  $\mu\text{g/ml}$ . Chúng tôi đã áp dụng phương pháp định lượng xây dựng được để đánh giá chất lượng cao chiết rau đắng biển Việt Nam theo 5 phương pháp chiết xuất khác nhau. Kết quả cho thấy phương pháp chiết 5 (ngâm dược liệu rau đắng biển khô với nước ở nhiệt độ phòng 8 giờ sau đó loại nước và chiết mẫu với cồn 96 độ ở 60°C 3 lần) là tối ưu nhất, tạo ra cao chiết có hàm lượng bacoside tổng là cao nhất (10,6%) (tính cho 5 bacoside chính), và có thể áp dụng phương pháp chiết này để sản xuất cao chiết rau đắng biển làm nguyên liệu bào chế các sản phẩm thực phẩm bảo vệ sức khỏe.

**Lời cảm ơn:** Nghiên cứu này được thực hiện với sự hỗ trợ kinh phí của đề tài mã số UDSXTN.01/22-23.

#### Tài liệu tham khảo:

- [1]. Võ Văn Chi, 2012. *Từ điển cây thuốc Việt Nam*. Nhà xuất bản Y học, Hà Nội, 511.
- [2]. Đỗ Huy Bích, Đặng Quang Trung, Bùi Xuân Chương, Nguyễn Thượng Đông, Đỗ Trung Đàm, Phạm Văn Hiền, Vũ Ngọc Lộ, Phạm Duy Mai, Phạm Kim Mãn, Đoàn Thị

Nhu, Nguyễn Tập, Trần Toàn, 2006. *Cây Thuốc và động vật làm thuốc ở Việt Nam*. Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật, 668-670.

[3]. Bhandari Pamita, Sendri Nitisha, Devidas Shinde Bhagatsing, 2020. *Dammarane triterpenoid glycosides in Bacopa monnieri: A review on chemical diversity and bioactivity*. Phytochemistry. 172, Article ID 112276.

[4]. Ashley Dowell, George Davidson, and Dilip Ghosh, 2015. *Validation of Quantitative HPLC Method for Bacosides in KeenMind*. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine. Article ID 696172, 8 pages <http://dx.doi.org/10.1155/2015/696172>.

[5]. British Pharmacopoeia, 2020. *Herbal Drugs, Herbal Drug Preparations and Herbal Medicinal Products*. Volume 4.

[6]. The United States Pharmacopoeia, 2018. *USP 41, NF 36*. Volume 3, 4456-4459.

[7]. Zhi Yu, Xie-Shu Wang & Ze-Hua Hu, 2014. *Dammarane-type saponins from Ziziphus jujube*. Journal of Asian Natural Products Research. 16(2), 200-205.

[8]. S Rastogi, R Pal, Kulshreshtha DK, 1994. *Bacoside A3--a triterpenoid saponin from Bacopa monniera*. Phytochemistry. 36(1), 133-137.

[9]. Watoo Phrompittayarat, Waraporn Putalun, Hiroyuki Tanaka, Kanchalee Jetiyanon Sakchai Wittaya-areekul and Kornkanok Ingkaninan, 2007. *Comparison of Various Extraction Methods of Bacopa monnieri*. Naresuan University Journal. 15(1), 29-34.

[10]. Watoo Phrompittayarat, Sakchai Wittaya-areekul, Kanchalee Jetiyanon, Waraporn Putalun, Hiroyuki Tanaka, Kornkanok Ingkaninan, 2008. *Stability Studies of Saponins in Bacopa monnieri Dried Ethanolic Extracts*. Planta Med. 74(14), 1756-1763.

**Địa chỉ tác giả: Viện Hóa học các hợp chất thiên nhiên, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam**

**Email: halm2vn@gmail.com**