



ĐỊNH LƯỢNG SAPONIN TRONG QUẢ MƯỚP ĐẮNG (*Momordica charantia*) BẰNG HPLC-PDA

Đinh Thị Quỳnh Anh¹, Phạm Quốc Tuấn¹, Nguyễn Quốc Tuấn^{1*}

¹Trung tâm Nghiên cứu và Chuyển giao Công nghệ Dược,
Trường Cao đẳng Y Dược Phú Thọ, Phú Thọ

Ngày nhận bài: 11/5/2021; Ngày chỉnh sửa: 28/7/2021; Ngày duyệt đăng: 30/7/2021

Tóm tắt

Trong nghiên cứu này, hai hoạt chất saponin momordicosid-g (1), goyaglycosid-d (2) trong các mẫu quả mướp đắng thu hái tại các địa điểm khác nhau trong tỉnh Phú Thọ được định lượng bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao. Phương pháp có độ lặp lại, độ đúng và độ chính xác cao. Kết quả hàm lượng momordicosid-g dao động từ 0,595 - 0,637 mg/g và hàm lượng goyaglycosid-d dao động từ 0,508 - 0,609 mg/g tính theo khối lượng dược liệu khô kiệt.

Từ khóa: *Momordica charantia*, saponin, momordicosid-g, goyaglycosid-d.

1. Đặt vấn đề

Saponin là một nhóm chất glycosid tự nhiên có nhiều trong thực vật và trong một số động vật. Saponin được cấu tạo từ sapogenin và phân đường (thường gặp D-glucose, D-galactose, L-arabiose, L-rhamnose,...). Theo những công bố gần đây cho thấy trong cây mướp đắng có chứa nhiều saponin trong quả [1-2] và có tiềm năng làm giảm đường huyết [3]. Trong một nghiên cứu về điều trị bệnh đái tháo đường trên chuột gây ra bởi streptozotocin bằng nước ép quả mướp đắng, Mahmond và cộng sự kết luận rằng quả mướp đắng là nguồn tuyệt vời cho phòng và điều trị bệnh Đái tháo đường [4]. Để làm rõ hơn thành phần saponin có tác dụng hạ đường huyết trong điều trị Đái tháo đường của cao chiết từ quả mướp đắng. Keller và các cộng sự đã phân lập saponin theo định hướng sinh học trong việc chống bệnh Đái tháo đường của phân đoạn giàu saponin từ cao chiết quả Mướp đắng [5], cả phân đoạn

giàu saponin và các saponin phân lập được đều có tác dụng kích thích bài tiết insulin [5]. Một vài nghiên cứu khác còn cho thấy hợp chất saponin phân lập từ quả của Mướp đắng còn có tác dụng oxy hóa axit béo và làm giảm đường huyết trong chuột [6]. Xuất phát từ những nghiên cứu về quả mướp đắng, chúng tôi tiến hành định lượng saponin trong quả mướp đắng, hướng tới xây dựng tiêu chuẩn hóa nguyên liệu mướp đắng trong sản xuất các sản phẩm bảo vệ sức khỏe.

2. Phương pháp nghiên cứu

2.1. Nguyên liệu, hóa chất, thiết bị

2.1.1. Nguyên liệu

Mẫu nghiên cứu là quả của cây mướp đắng được thu hái tại một số địa điểm trong tỉnh Phú Thọ, vào tháng 6/2020. Mẫu cây được thẩm định tên khoa học là *Momordica charantia* bởi ThS. Phạm Thị Tuyết Lan, Bộ môn Dược liệu - Cao đẳng Y Dược Phú Thọ.

*Email: quoctuan301281@gmail.com

Các mẫu mướp đắng được rửa sạch sau thu hái, sấy khô (âm ≤ 10%), xay thành bột, đóng túi PE, buộc kín.

Mẫu dùng để xây dựng phương pháp là mẫu được thu hái tại xã Tuy Lộc, huyện Cẩm Khê, tỉnh Phú Thọ.

2.1.2. Hóa chất, dung môi

Các dung môi sử dụng: methanol (MeOH), ethanol (EtOH), acetonitril (ACN), nước cất (H₂O).

Các chất đối chiếu gồm: momordicosid-g (1), goyaglycosid-d (2) do Trung tâm Nghiên cứu và Chuyển giao công nghệ Dược cung cấp, độ tinh khiết 98% (HPLC).

2.1.3. Thiết bị

Hệ thống HPLC: CBM-20A (Shimadzu, Nhật Bản) detector Diode Array SPD-M₂₀A, cột sắc ký Phenomenex C-18, 250 x 4,6 mm I.D (S-5 μm, 12 nm); bể chiết siêu âm D-78224 (Germany); cân phân tích AUW₂₂₀D (Shimadzu, Nhật Bản).

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Điều kiện sắc ký: Điều kiện sắc ký được lựa chọn sử dụng cột Phenomenex C-18, 250 x 4,6 mm I.D (S-5 μm, 12 nm), detector PDA: 205 nm; nhiệt độ buồng cột: 30°C; tốc độ dòng: 0,8 ml/phút; thể tích tiêm 10 μl; pha động: động MeCN-H₂O, rửa giải gradient từ 50 -100% MeCN trong thời gian 70 phút.

Khảo sát phương pháp xử lý mẫu: khảo sát hệ dung môi chiết EtOH và H₂O, phương pháp chiết, thời gian chiết, nhiệt độ chiết.

Chuẩn bị dung dịch chất đối chiếu: cân và pha chính xác lượng chất đối chiếu 1, 2 trong MeOH để được dung dịch chuẩn.

Chuẩn bị dung dịch mẫu thử: cân chính xác khoảng 1 gam bột dược liệu, đã được xác định độ ẩm, thêm 50 mL EtOH 80%, siêu âm trong 20 phút, sau đó thêm lượng cồn 80% đã hao hụt. Dung dịch trên được lọc qua màng lọc 0,45 μm trước khi chạy sắc ký.

Thẩm định phương pháp: Phương pháp phân tích được thẩm định dựa trên hướng dẫn của ICH [7].

Tính kết quả: Hàm lượng 1, 2 được tính theo được liệu khô kiệt:

$$\text{Hàm lượng (\%)} = \frac{C \times V \times 100}{10^6 \times m \times (100 - B)} \times 100$$

Trong đó:

- C là nồng độ của 1, 2 có trong dung dịch mẫu thử (μg/mL) được tính từ đường chuẩn;
- V: là thể tích pha mẫu thử (mL);
- m: là khối lượng mẫu thử (g);
- B: là hàm ẩm của mẫu thử (%).

3. Kết quả nghiên cứu và thảo luận

3.1. Kết quả khảo sát lựa chọn dung môi chiết

Nguyên liệu mướp đắng được chiết xuất với dung môi là EtOH ở các nồng độ 96%, 80%, 60%, với các tỷ lệ dung môi/dược liệu là 50 ml/g, thời gian siêu âm lần lượt là 10, 15 và 20 phút. Kết quả được ghi ở Bảng 1.

Bảng 1. Kết quả khảo sát dung môi

Cồn %	Thời gian chiết (phút)	Diện tích pic (mAU.s)	
		Momordicosid-g (1)	Goyaglycosid-d (2)
96	10	916312	908438
	20	1328340	1243267
	30	1326701	1008135
80	10	9225302	1077022
	20	3140507	3014945
	30	1839907	1984461
60	10	1819705	1654367
	20	1828103	1663314
	30	1829206	1707022

Kết quả khảo sát dung môi chiết được đánh giá hàm lượng các chất 1 và 2 thông qua diện tích pic của các chất trong sắc ký đồ HPLC. Kết quả cho thấy tại thời gian chiết 20 phút với dung môi chiết là EtOH 80% tất các chất đều cho diện tích pic lớn. Qua đó, dung môi chiết EtOH 80% và thời gian chiết siêu âm 20 phút được lựa chọn.

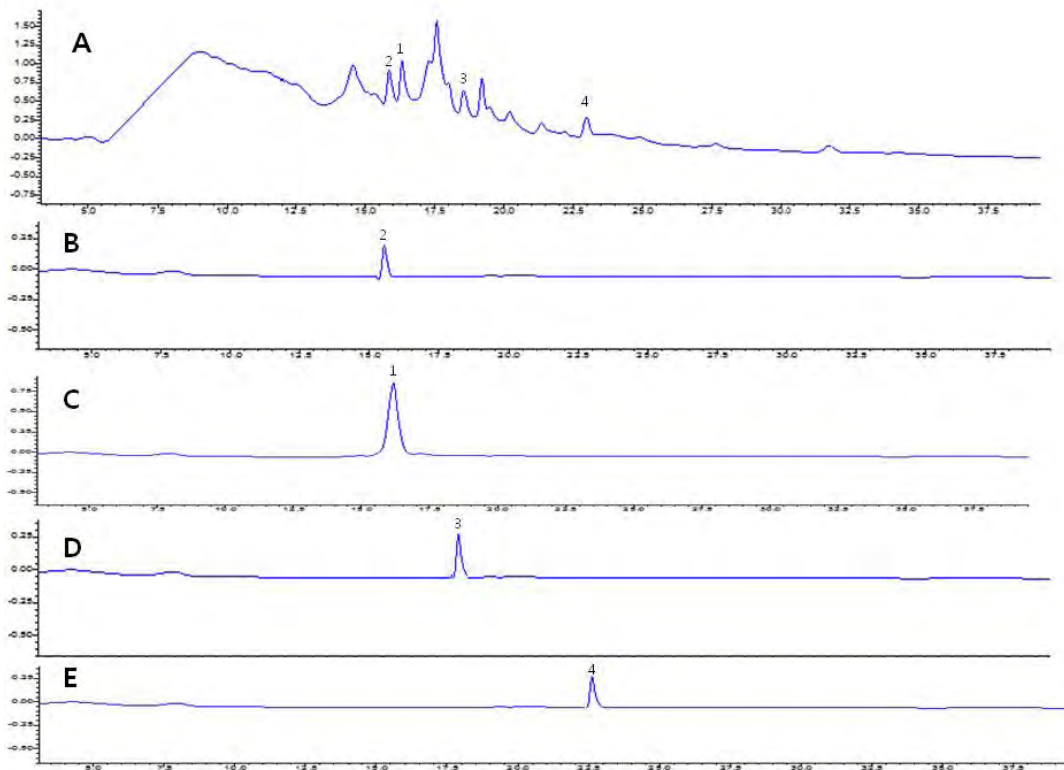
3.2. Tính thích hợp của hệ thống

Để đánh giá tính thích hợp của hệ thống sắc ký, chúng tôi pha mẫu chuẩn 1 (150 µg/ml) và 2 (200 µg/ml), tiêm 6 lần mẫu

chuẩn vào hệ thống HPLC với điều kiện sắc ký như đã chọn. Kết quả khảo sát tính thích hợp của hệ thống được ghi ở Bảng 2 và Hình 1.

Bảng 2. Kết quả khảo sát tính thích hợp của hệ thống

Lần tiêm mẫu	Thời gian lưu (phút)		Diện tích pic (mAU.s)	
	Momordicosid-g (1)	Goyaglycosid-d (2)	Momordicosid-g (1)	Goyaglycosid-d (2)
1	16,51	16,24	806372	896758
2	16,62	16,05	805957	896832
3	16,53	16,26	805899	895879
4	16,62	16,12	806571	897425
5	16,48	16,15	806441	896318
6	16,56	16,12	805967	896250
TB	16,55	16,16	806201	896577
RSD (%)	0,35	0,49	0,04	0,06



Hình 1. Hình ảnh sắc ký đồ của dịch chiết (A) và chất chuẩn 1 (C) và 2 (B)

Kết quả khảo sát cho thấy các điều kiện sắc ký đã lựa chọn và hệ thống HPLC là phù

hợp và đảm bảo sự ổn định cho định lượng 1, 2 trong quả mướp đắng.

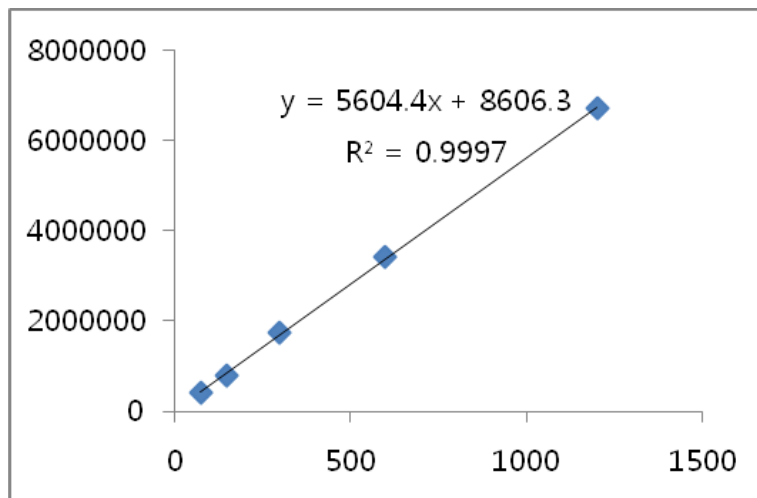
3.3. Khoảng tuyến tính

Chuẩn bị một dãy dung dịch chuẩn: chất 1 có nồng độ từ 75 - 1200 $\mu\text{g/ml}$; chất 2 có

nồng độ từ 100 - 1600 $\mu\text{g/ml}$. Tiến hành chạy sắc ký như đã lựa chọn. Kết quả khảo sát khoảng tuyến tính được trình bày trong các bảng và hình bên dưới.

Bảng 3. Khoảng tuyến tính của momordicosid-g (1)

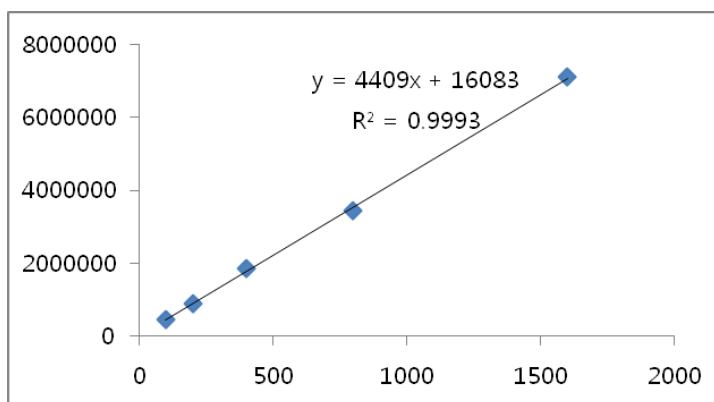
Dung dịch	Nồng độ ($\mu\text{g/ml}$)	Diện tích pic
1	75	405619
2	150	806372
3	300	1732538
4	600	3426052
5	1200	6702582
Phương trình hồi quy	$Y = 5604.4x + 8606.3$	
Hệ số tương quan R^2	0,9997	



Hình 2. Khoảng tuyến tính của momordicosid-g (1)

Bảng 4. Kết quả khảo sát tuyến tính của goyaglycosid-d (2)

Dung dịch	Nồng độ ($\mu\text{g/ml}$)	Diện tích pic
1	100	443879
2	200	896758
3	400	1865516
4	800	3441032
5	1600	7101064
Phương trình hồi quy	$Y = 4409x + 16083$	
Hệ số tương quan R^2	0,9993	



Hình 3. Khoảng tuyến tính goyaglycosid-d (2)

3.4. Giới hạn phát hiện (LOD) và giới hạn định lượng (LOQ)

Giới hạn phát hiện và giới hạn định lượng được bằng cách pha loãng giảm dần dung dịch chất chuẩn 1 và 2 cho tới khi chiều cao của pic hoạt chất gấp 2 - 3 lần (đối với LOD) và gấp 10 lần (đối với LOQ)

so với độ nhiễu đường nền. Kết quả xác định được LOD của các chất 1 và 2 lần lượt 0,75 và 0,85. LOQ được xác định lần lượt là 2,50 và 2,81 $\mu\text{g/mL}$.

3.5. Độ lặp lại

Tiến hành định lượng 6 lần mẫu quả mướp đắng thu được kết quả ở Bảng 5.

Bảng 5. Kết quả đánh giá độ lặp lại

Số TT	Hàm lượng (mg/g)	
	(1)	(2)
1	0,615	0,564
2	0,620	0,560
3	0,618	0,570
4	0,625	0,559
5	0,613	0,561
6	0,611	0,568
TB	0,620	0,560
RSD (%)	0,83	0,80

Từ Bảng 5 cho thấy với $\text{RSD} (\%) < 1\%$ đối với kết quả phân tích định lượng hai chất 1 và 2. Như vậy phương pháp phân tích đảm bảo độ ổn định và độ lặp lại.

3.6. Độ đúng, độ chính xác

Độ đúng và độ chính xác được xác định bởi phân tích 6 mẫu độc lập tại 3 nồng độ

khác nhau (Bảng 6). Kết quả phân tích cho thấy độ đúng của 1 và 2 của mẫu phân tích trong ngày từ 95 - 105%. Đối với độ chính xác 1,7 - 2,7% của mẫu phân tích trong các ngày liên tiếp. Kết quả trên cho thấy phương pháp phân tích có độ đúng và chính xác cao.

Bảng 6. Kết quả của độ đúng và độ chính xác

Chất phân tích	Chuẩn thêm vào	Nồng độ mẫu (µg/ml)	Trong các ngày (n=6)			
			Nồng độ thu được (µg/ml)	SD	Độ đúng (%)	Độ chính xác RSD%
1	2	58,4	60,4	0,05	100,0	2,7
	50	58,4	109,4	0,09	102,0	2,5
	100	58,4	157,8	0,09	99,0	1,7
2	2	52,7	54,8	0,04	105,0	2,0
	50	52,7	103,2	0,08	101,0	2,6
	100	52,7	151,9	0,07	99,2	2,1

3.7. Kết quả xác định hàm lượng saponin chính trong quả mướp đắng

Quả mướp đắng được thu hái tại các huyện thuộc tỉnh Phú Thọ, mẫu được chuẩn bị như đã khảo sát. Dịch chiết sau khi thu

được tiến hành tiêm vào hệ thống sắc ký HPLC như đã lựa chọn. Kết quả hàm lượng hoạt chất saponin 1 và 2 được tính dựa vào khoảng tuyến tính xây dựng được. Kết quả được trình bày ở Bảng 7.

Bảng 7. Hàm lượng saponin chính trong quả mướp đắng

Địa điểm thu hái	Khối lượng mẫu (g)	Độ ẩm (%)	Hàm lượng (mg/g)	
			(1)	(2)
Tân Trung - Lâm Thao	1,0079	8,71	0,608 ± 0,005	0,515 ± 0,006
Thùy Nhật - Lâm Thao	1,0106	8,42	0,619 ± 0,008	0,559 ± 0,005
Tuy Lộc - Cẩm Khê	1,0451	8,63	0,615 ± 0,01	0,564 ± 0,009
Yên Nội - Thanh Ba	1,0353	8,91	0,626 ± 0,007	0,602 ± 0,010
Quảng Nạp - Thanh Ba	1,1156	8,67	0,619 ± 0,010	0,597 ± 0,007
Trung Nghĩa - Thanh Thủy	1,0091	8,72	0,593 ± 0,008	0,512 ± 0,005
Trị trấn Đoan Hùng	1,1054	8,85	0,611 ± 0,005	0,531 ± 0,010
Bãi Bằng - Phù Ninh	1,1054	8,19	0,637 ± 0,009	0,529 ± 0,01
Minh Đài - Thanh Sơn	1,1360	8,28	0,595 ± 0,010	0,510 ± 0,008
Xuân Sơn - Tân Sơn	1,0580	8,86	0,598 ± 0,006	0,508 ± 0,005
Vân Cờ - Việt Trì	1,0364	8,73	0,612 ± 0,006	0,609 ± 0,010

Kết quả định lượng hai hoạt chất saponin momordicosid-g (1) và goyaglycosid-d (2) trong quả mướp đắng cho thấy hàm lượng các saponin trong quả mướp đắng tại các huyện trong tỉnh Phú Thọ tương đối đồng đều, không có sự chênh lệch nhiều về hàm lượng giữa các địa phương. Hàm lượng momordicosid-g (1) dao động giữa các địa phương từ 0,595-0,637 mg/g; hàm lượng goyaglycosid-d (2) dao động từ 0,508-0,609 mg/g.

Mướp đắng là một loại cây thực phẩm được trồng nhiều ở các làng quê Việt Nam. Hiện nay, mướp đắng đang được dùng làm nguyên liệu sản xuất thực phẩm bảo vệ sức

khỏe với tác dụng hỗ trợ điều trị hạ đường huyết cho người mắc bệnh đái tháo đường. Các nghiên cứu khoa học cũng chỉ ra rằng cao chiết và chất phân lập từ quả mướp đắng có tác dụng như: sự ức chế α -glucosidase làm cho giảm hấp thu glucose ở đường ruột, dẫn tới làm giảm mức độ đường trong máu [8]. Sự bảo vệ và phục hồi tế bào β (β -cell) dẫn tới tăng bài tiết insulin và giảm mức độ đường trong máu [8]. Hơn nữa, trong Dược điển Việt Nam V vẫn chưa có tiêu chuẩn cho quả mướp đắng theo hoạt chất saponin, kết quả định lượng này góp phần cơ sở cho việc gợi ý xây dựng tiêu chuẩn nguyên liệu quả mướp

đăng phục vụ trong sản xuất các sản phẩm bảo vệ sức khỏe.

4. Kết luận

Trong nghiên cứu này, đã tiến hành định lượng hai hoạt chất saponin trong quả mướp đắng bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao với detector PDA phát hiện tại bước sóng 205 nm. Phương pháp có độ lặp lại, độ đúng, độ chính xác và khoảng tuyến tính tốt, đảm bảo tính chính xác cho kết quả định lượng 11 mẫu quả mướp đắng thu hái tại các địa điểm khác nhau trong tỉnh Phú Thọ. Hàm lượng momordicosid-g dao động từ 0,595-0,637 mg/g và hàm lượng goyaglycosid-d dao động từ 0,508-0,609 mg/g tính theo khối lượng dược liệu khô kiệt.

Tài liệu tham khảo

- [1] Toshiyuki M., Akihito E., Hisashi M. & Masayuki Y. (2001). Medicinal Foodstuffs. XXI. Structures of New Cucurbitane-Type Triterpene Glycosides, Goyaglycosids-a,-b,-c,-e,-f,-g, and -h, and New Oleanane-Type Triterpene Saponins, Goyasaponins I, II, and III, from the Fresh Fruit of Japanese *Momordica charantia* L. Chem. Pharm. Bull., 49, 54-63.
- [2] Hikadu O., Yumi M. & Tatsuo Y. (1982). Studies on the Constituents of *Momordica charantia* L. III,2) Characterization of New Cucurbitacin Glycosides of the Immature Fruits. (1). Structures of Momordicosids G, F₁, F₂ and I. Chem. Pharm. Bull., 30, 3977-3986.
- [3] Tahira S. & Hussain F. (2014). Antidiabetic evaluation of *Momordica charantia* L fruit extracts. West Indian Med. Journal., 63, 294-299.
- [4] Mona F. M., Fatma E. Z. A., Nabila N. E. M. & Ahmed F. (2017). Studies on the antidiabetic activities of *Momordica charantia* fruit juice in streptozotocin-induced diabetic rats. Pharmaceutical Biology, 55, 758-765.
- [5] Amy C. K., Jun M., Adam K., Kan H., Anne-Marie B. B. & Edward J. K. (2011). Saponin from the traditional medicinal plant *Momordica charantia* stimulate insulin secretion in vitro. Phytomedicine, 19, 32-37.
- [6] Min-Jia T., Ji-Ming Y., Nigel T., Cordula H. B., Chang Q. K., Chun P. T., Tong C., Hans C. W., Ernst R. G., Alex R., David E. J. & Yang Y. (2008). Antidiabetic activities of triterpenoids isolated from Bitter melon associated with activation of the AMPK pathway. Chemistry & Biology, 15, 263-273.
- [7] ICH (2005). Validation of analytical procedure: Text and methodology Q₂ (R₁), 1-13.
- [8] Sandra D. H., Christine L., Ray-yu Y. & Michael B. K. (2014). *Momordica charantia* and Type 2 Diabetes: From in vitro to human studies. Current Diabetes Reviews, 10, 48-60.

QUANTIFICATION OF SAPONINS IN THE FRUITS OF MOMORDICA CHARANTIA BY HPLC-PDA METHOD

Dinh Thi Quynh Anh¹, Pham Quoc Tuan¹, Nguyen Quoc Tuan¹

¹Center for Drug Research and Technology Transfer,
Phu Tho College of Medicine and Pharmacy, Phu Tho

Abstract

In this study, momordicosid-g (1) and goyaglycosid-d (2) in the fruits of *Momordica charantia* were analyzed by high-performance liquid chromatography, which harvested at different locations in Phu Tho province. The method has high repeatability, accuracy, and precision. The results showed that the content of momordicosid-g ranged from 0.595 to 0.637 mg/g and the content of goyaglycoside-d ranged from 0.558 to 0.609 mg/g calculated by the weight of dry medicinal herbs.

Keywords: *Momordica charantia*, saponin, momordicosid-g, goyaglycosid-d.