



Tạp chí Khoa học và Kinh tế Phát triển
Trường Đại học Nam Cần Thơ

Website: jsde.nctu.edu.vn



Xây dựng quy trình bán định lượng saponin chính trong sâm Ngọc linh (*Panax vietnamensis*) bằng sắc ký lớp mỏng

Đào Thị Quỳnh Như¹, Huỳnh Công Thành¹, Nguyễn Tâm Long Quân¹, Vũ Huỳnh Kim Long^{1*}

¹Khoa Dược, Trường Đại học Tôn Đức Thắng

*Người chịu trách nhiệm bài viết: Vũ Huỳnh Kim Long (email: vuhuynhkimlong@tdtu.edu.vn)

Ngày nhận bài: 10/11/2023

Ngày phản biện: 10/12/2023

Ngày duyệt đăng: 5/1/2024

Title: Developing a semi-quantitative process for main saponins in Ngọc Linh ginseng (*Panax vietnamensis*) using thin layer chromatography

Keywords: Ngọc Linh ginseng, semi-quantitative determination, thin-layer chromatography

Từ khóa: bán định lượng, sâm Ngọc Linh, sắc ký lớp mỏng

ABSTRACT

Vietnamese Ginseng (*Panax vietnamensis*, họ Araliaceae) or Ngọc Linh Ginseng is a precious and endemic *Panax* species of Vietnam which was discovered in 1973 on Ngọc Linh mountain, Central of Vietnam belong to Quang Nam province. The chemical compositions of Ngọc Linh Ginseng are saponin in protopanaxadiol, protopanaxatriol and especially ocotillol-type saponin with the very high content. The most popular method for quantitative determination of saponin in Ngọc Linh Ginseng is HPLC-UV. However, UV detector cannot effectively detect ocotillol-type saponins due to the lack of chromophore. Therefore, in this study, we developed a thin-layer chromatography method to semi-determination saponin in Ngọc Linh Ginseng. The developed method was validated with the regression ($R^2 \geq 0,99$); reproducibility (%RSD < 10%) and recovery (80-120%). The developed method is low cost, simple which could effectively determine saponin content in Ngọc Linh Ginseng.

TÓM TẮT

Sâm Việt Nam (*Panax vietnamensis*, họ Araliaceae) hay còn gọi là Sâm Ngọc Linh là một loài sâm quý và đặc hữu của Việt Nam được phát hiện năm 1973 tại vùng núi Ngọc Linh, miền Trung Việt Nam thuộc tỉnh Quảng Nam. Thành phần hóa học chính của Sâm Ngọc Linh là các saponin thuộc khung protopanaxadiol, protopanaxatriol và đặc biệt khung ocotillol với hàm lượng rất cao. Để định lượng saponin trong Sâm Ngọc Linh, hiện nay phương pháp phổ biến là HPLC-UV. Tuy nhiên đầu dò UV ở bước sóng thấp vẫn không phát hiện hiệu quả saponin khung ocotillol

vốn không có liên kết đôi trong phân tử. Vì vậy nghiên cứu nhằm phát triển phương pháp bán định lượng saponin trong Sâm Ngọc Linh bằng sắc ký lớp mỏng. Phương pháp xây dựng được thẩm định có độ tuyến tính với $R^2 \geq 0,99$; độ lặp lại có %RSD < 10% và độ phục hồi trong khoảng 80-120%. Phương pháp xây dựng đơn giản, rẻ tiền và có thể định lượng hàng loạt mẫu Sâm Ngọc Linh trên thị trường.

1. GIỚI THIỆU

Sâm Việt Nam hay còn gọi là Sâm Ngọc Linh (SNL) là một loài sâm quý và đặc hữu của Việt Nam. Trước khi được phát hiện vào năm 1973, SNL là cây “thuốc giầu” của đồng bào dân tộc Xê Đăng sống dọc dãy Trường Sơn được dùng để hồi phục sức lực trong những chuyến đi rừng dài ngày. Nghiên cứu về mặt hóa học cho thấy SNL có thành phần chính là các saponin thuộc khung protopanaxadiol (PPD), protopanaxatriol (PPT) và hàm lượng rất cao saponin khung ocotillol (OT), đặc biệt là hợp chất majonosid R2 (M-R2) với hàm lượng trên 50% saponin toàn phần (Vu-Huynh et al., 2020) [1]. SNL đã được chứng minh có các tác dụng như chống oxy hóa, chống stress, chống trầm cảm, chống ung thư, bảo vệ gan, bảo vệ thận (Huong & Cúc, 2006; Huong et al., 2002; Vu-Huynh et al., 2019) [2],[3],[4].

Để định lượng các saponin chính trong SNL, hiện nay phương pháp phổ biến nhất là HPLC-UV ở bước sóng rất thấp (196 nm) và đã được đưa vào Dược điển Việt Nam (Bộ Y tế, 2017) [5]. Mặc dù ở bước sóng rất thấp nhưng mức độ đáp ứng của đầu dò UV với các saponin khung OT vẫn rất kém do trong cấu trúc các saponin này thiếu các nhóm mang màu. Vì vậy, nhiều đầu dò vạm năng đã được nghiên cứu để định lượng như đầu dò Tán xạ ánh sáng bay hơi (Evaporative Light-Scattering Detector – ELSD) (Vu-Huynh et al., 2020) [1]; đầu dò Khí

dung tích điện (Charged Aerosol Detector – CAD) (Nguyen et al., 2021) [6]. Tuy nhiên các đầu dò này ít phổ biến và giá thành cao. Ngoài ra, phương pháp HPLC cho thời gian phân tích một mẫu khá dài (trên 60 phút) làm giảm hiệu suất phân tích mẫu. Trong nghiên cứu này, chúng tôi phát triển phương pháp bán định lượng các saponin trong SNL bằng phương pháp sắc ký lớp mỏng. Phương pháp có ưu điểm giá thành rẻ, thông dụng, dễ thực hiện và có thể sàng lọc hàng loạt mẫu SNL trên thị trường.

2. PHƯƠNG TIỆN VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1 Phương tiện

Sâm Ngọc Linh (n=17) được cung cấp bởi Công ty Cổ phần Sâm Ngọc Linh Kontum K5 Kon Tum (VINGIN JSC). Nghiên cứu được thực hiện tại Khoa Dược, Trường Đại học Tôn Đức Thắng Các chất chuẩn M-R2 (98,86%), ginsenoside Rg1 (G-Rg1, 96,43%), ginsenoside Rb1 (G-Rb1, 99,17%) được cung cấp bởi Trung tâm Khoa học và Công nghệ Dược Sài Gòn, Đại học Y Dược Thành phố Hồ Chí Minh.

2.2 Phương pháp

2.2.1 Lựa chọn hệ dung môi sắc ký

Khảo sát các hệ dung môi pha động, pha các hệ dung môi pha động gồm:

- n-Butanol – Nước – Acetic acid (4:5:1, lớp trên);
- Chloroform – Methanol – Nước (65:35:10, lớp dưới);
- Chloroform – Ethyl acetate – Methanol – Nước (15:40:20:10, lớp dưới).

Chuẩn bị 3 bảng mỏng, chấm đồng lượng (10 μ L) lên mỗi bản 4 vết, gồm: các chất chuẩn G-Rg₁, M-R2, G-Rb₁ và một mẫu thử chiết từ Sâm Việt Nam. Sau đó, thực hiện triển khai sắc ký với 3 hệ dung môi trên và hiện màu bằng cách nhúng thuốc thử acid sulfuric 10% trong ethanol và sấy ở 110 °C đến khi hiện vết. Lặp lại trên nhiều bảng mỏng để chọn hệ dung môi nào có khả năng tách hiệu quả và ổn định nhất.

2.2.2 Lựa chọn các thông số của quy trình chiết xuất

Thời gian chiết xuất:

Chuẩn bị 6 mẫu bằng cách cân chính xác 40 mg SVN vào bình định mức 2 ml, thêm MeOH 80% đến vạch. Tiến hành chiết siêu âm 10, 20, 30, 40, 50, 60 phút. Tiến hành chấm đồng lượng 10 μ l mỗi mẫu lên cùng 1 bảng mỏng, mỗi vết trên bảng mỏng tương ứng với 1 lần chiết. Khai triển bằng dung môi đã lựa chọn. Khảo sát thời gian chiết tối ưu khi diện tích vết của các saponin quan tâm không tăng nữa.

Số lần chiết xuất:

Cân 40 mg SVN vào eppendorf, thêm chính xác 2 mL MeOH 80% vào eppendorf 5 ml và siêu âm trong thời gian tối ưu cho một lần chiết. Dịch chiết được ly tâm ở tốc độ 3.000 vòng/5 phút. Dịch nổi được hút cho vào eppendorf 1. Phần cặn được chiết thêm 2 lần nữa và dịch chiết lần 2 và lần 3 được cho vào eppendorf 2, 3. Tiến hành kiểm tra bằng sắc ký lớp mỏng số lần chiết để không còn phát hiện vết trên bảng mỏng sắc ký.

2.2.3 Phương pháp xử lý số liệu

Bảng mỏng sau khi hiện màu được chuyển sang hình trắng đen ở độ sâu màu 8 bit với định dạng TIFF bằng phần mềm ImageJ (<https://imagej.nih.gov/>). File hình ảnh sau đó được đưa vào phần mềm Image Lab (BioRad) để chuyển sang dạng sắc đồ và tính toán diện tích vết.

2.3 Đánh giá phương pháp

Phương pháp bán định lượng được đánh giá với các chỉ tiêu: tính tương thích hệ thống, tính đặc hiệu, tính tuyến tính, giới hạn phát hiện, giới hạn định lượng, độ chính xác, độ đúng theo hướng dẫn của ICH (Agency, 2022) [7].

2.3.1 Tính tương thích hệ thống

Tiến hành chấm đồng lượng (10 μ L) 6 vết của cùng một mẫu thử lên bảng mỏng và khai triển ở điều kiện đã chọn lựa. Đánh giá độ lặp lại của phương pháp sắc ký lớp mỏng thông qua giá trị %RSD của R_f và diện tích vết

2.3.2 Tính đặc hiệu

Chấm đồng lượng (10 μ L) lên bảng mỏng lần lượt mẫu trắng, hỗn hợp chuẩn, mẫu thử và mẫu thử thêm chuẩn để đánh giá tính đặc hiệu. Khai triển và hiện màu bằng mỏng theo quy trình đã nghiên cứu. Mẫu trắng không được có các vết tương ứng với mẫu thử. Mẫu thử và mẫu chuẩn phải có các vết cùng R_f. Khi thêm chuẩn vào thử, diện tích các vết phải tăng lên.

2.3.3 Tính tuyến tính

Cân các chuẩn G-Rg₁ (4,06 mg), M-R2 (4,12 mg), G-Rb₁ (4,04 mg) vào từng bình định mức 2 ml rồi thêm MeOH 80 % đến vạch. Pha loãng hỗn hợp chuẩn thành giai mẫu chuẩn có nồng độ trình bày tại Bảng 1. Khai triển và hiện màu bằng mỏng theo quy trình đã nghiên cứu. Xây dựng đường tuyến tính tương quan giữa logarit tự nhiên (ln) của hàm lượng và diện tích vết.

Bảng 1. Nồng độ các chuẩn khi xây dựng đường tuyến tính

Hỗn hợp chuẩn	Nồng độ (mg/mL)		
	G-Rg ₁	M-R2	G-Rb ₁
1	2,030	2,060	2,020
2	1,015	1,030	1,010
3	0,508	0,515	0,505
4	0,254	0,258	0,253
5	0,127	0,129	0,126

2.3.4 Độ chính xác trong ngày

Chuẩn bị 6 mẫu thử chiết theo quy trình đã nghiên cứu. Chấm đồng lượng 6 mẫu thử và giai mẫu chuẩn (6 nồng độ) lên bảng mỏng. Khai triển và hiện màu bảng mỏng theo quy trình đã nghiên cứu. Đánh giá độ chính xác trong ngày thông qua %RSD G-Rg₁, M-R2 và G-Rb₁.

2.3.5 Độ chính xác liên ngày

Chiết 3 mẫu thử theo quy trình đã nghiên cứu và tiến hành định lượng theo quy trình. Thực hiện trong 3 ngày khác nhau, mỗi ngày thực hiện 3 mẫu. Đánh giá độ chính xác liên ngày thông qua %RSD G-Rg₁, M-R2 và G-Rb₁.

2.3.6 Độ đúng

Chuẩn bị mẫu như mẫu thử, các mẫu được thêm các chuẩn G-Rg₁, M-R2 và G-Rb₁ với lượng tương ứng 20%, 30% và 50% lượng chất

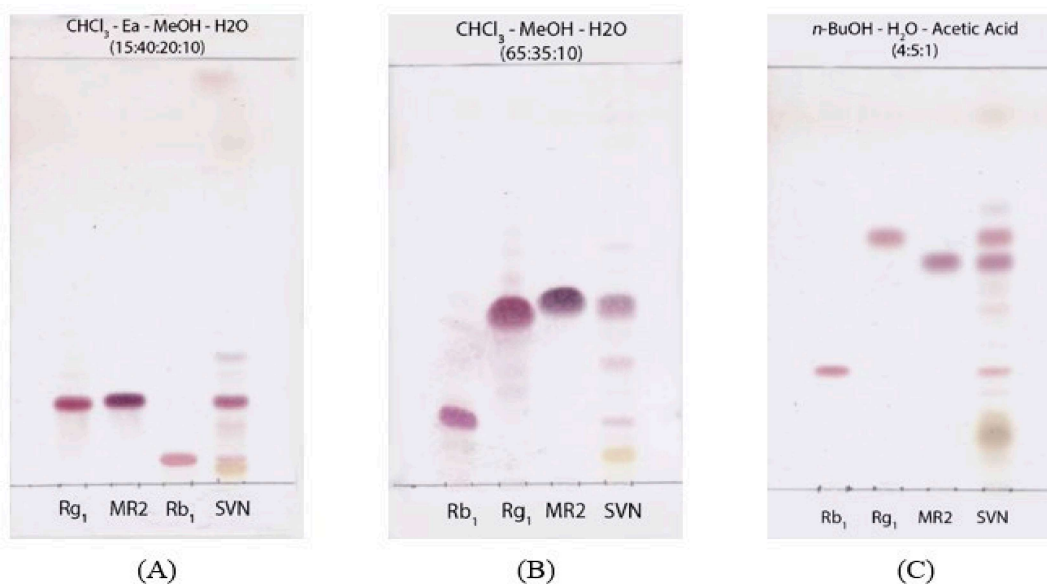
có sẵn trong mẫu. Triển khai sắc ký với điều kiện như mẫu thử. Đánh giá độ đúng thông qua độ phục hồi của các saponin quan tâm.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1 Xây dựng quy trình định lượng

3.1.1 Lựa chọn hệ dung môi

Khả năng tách của ba hệ dung môi được thể hiện trong Hình 1. Kết quả cho thấy hệ dung môi A và B không tách được G-Rg₁ và M-R2, trong đó hệ dung môi A có R_f của các vết khá thấp làm cho vết của G-Rb₁ lẫn vào vết của tạp phân cực. Hệ dung môi C cho các vết ở giữa bảng mỏng, tách tốt vết của G-Rg₁ và M-R2 đồng thời tách tốt vết của G-Rb₁ khỏi tạp phân cực. Vì vậy hệ dung môi n-butanol – nước – acid acetic (4:5:1, lớp trên) được chọn cho các bước phân tích tiếp theo.

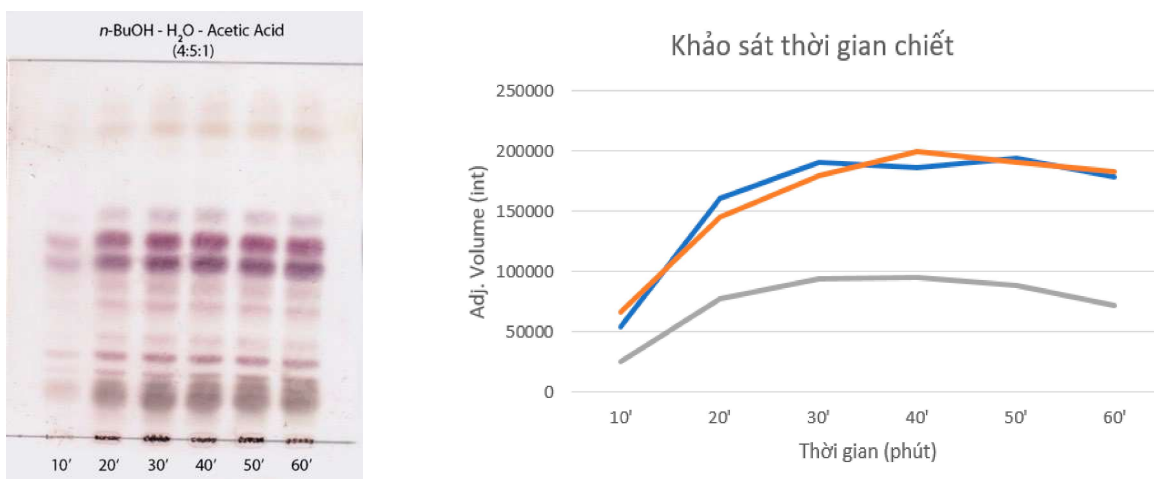


Hình 1. Bảng mỏng sắc ký thăm dò hệ dung môi

3.1.2 Lựa chọn thời gian cho một lần chiết

Kết quả ở Hình 2 cho thấy nồng độ chất chiết trong dung môi tăng dần trong thời gian

10-30 phút sau đó thay đổi không đáng kể. Vì vậy thời gian 30 phút cho mỗi lần chiết được lựa chọn.

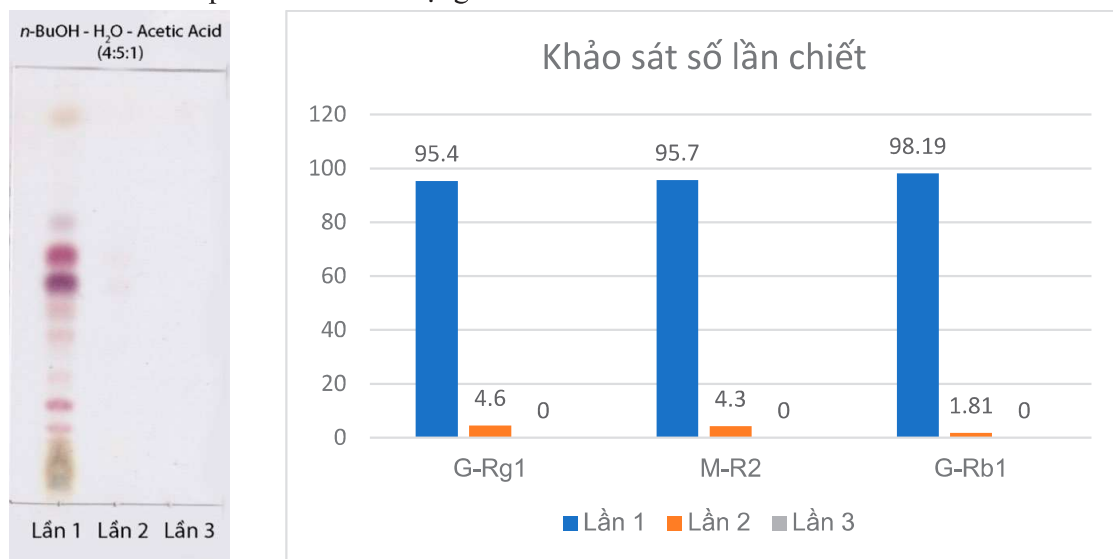


Hình 2. Bảng mỏng và đồ thị đánh giá sự thay đổi nồng độ saponin trong quá trình chiết

3.1.3 Lựa chọn số lần chiết xuất

Kết quả ở Hình 3 cho thấy lần chiết thứ nhất có thể thu được trên 95% tổng saponin có trong mẫu và lần thứ 2 saponin chỉ còn ở dạng vết. Ở

lần thứ 3 không còn phát hiện vết saponin trên bảng mỏng. Do đó, 2 lần chiết được chọn để chiết kiệt saponin trong mẫu.



Hình 3. Bảng mỏng và đồ thị thể hiện lượng saponin chiết được trong các lần chiết

3.1.4 Quy trình bán định lượng saponin trong Sâm Ngọc Linh hoàn chỉnh

- Pha tĩnh: Bảng mỏng Silica gel 60 F₂₅₄ (Merck).
- Pha động: *n*-Butanol – Nước – Acetic acid (4:5:1, lớp trên).
- Chuẩn bị mẫu thử: Cân 40 mg SVN vào eppendorf 5 ml, thêm chính xác 2 mL MeOH

80% và chiết siêu âm trong 30 phút. Dịch chiết được ly tâm ở tốc độ 3000 vòng/5 phút. Dịch nổi được hút cho vào bình định mức 5 mL. Phần cặn được chiết thêm một lần nữa, ly tâm dịch chiết cho vào bình định mức 5 mL. Sau đó, thêm MeOH 80% tới vạch.

- Chuẩn bị mẫu chuẩn: Cân 4 mg các chuẩn G-Rg₁, M-R₂, G-Rb₁ vào từng bình định mức 2 mL

rồi thêm MeOH 80 % đến vạch. Pha loãng hỗn hợp chuẩn thành giai mẫu chuẩn có nồng độ giảm dần. Xây dựng phương trình tuyến tính có dạng $S=a \times \ln(C)+b$ với S là diện tích vết, C là nồng độ của chuẩn.

- Cách phát hiện: Nhúng bảng mỏng vào thuốc thử acid sulfuric 10% trong cồn, sấy ở nhiệt độ 110°C đến khi hiện màu.

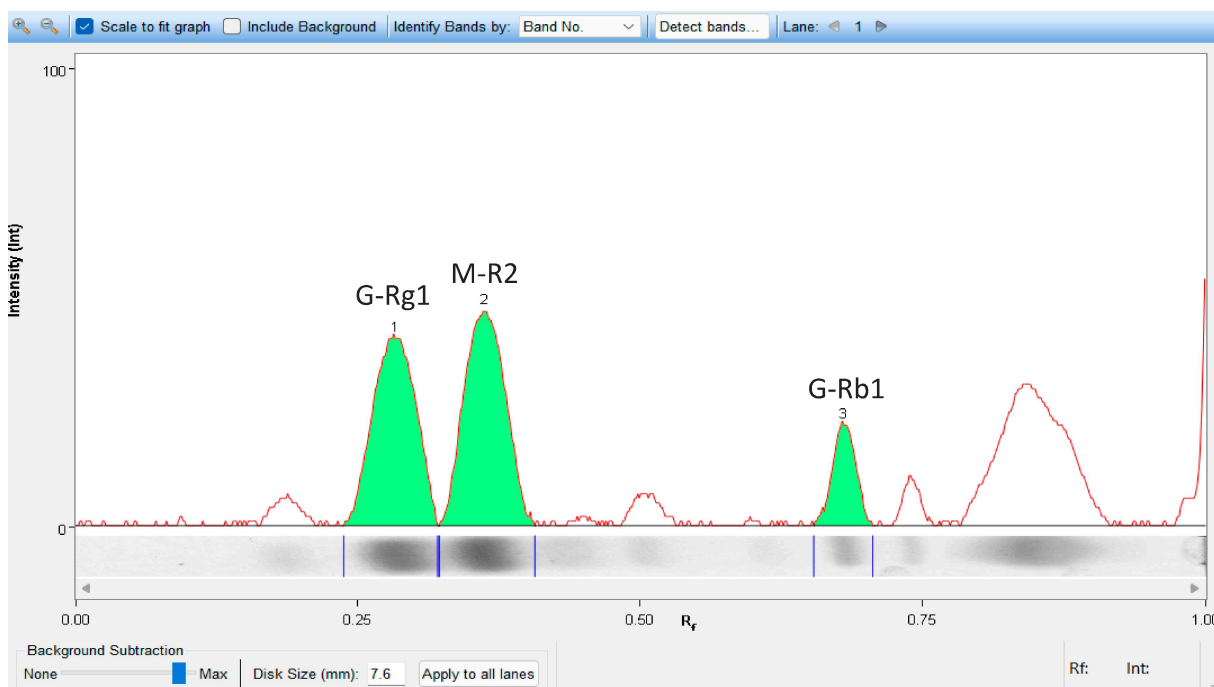
- Xử lý số liệu: Sau khi bảng mỏng hiện màu, đặt bảng mỏng lên thiết bị Scan và dùng phần mềm Canon IJ Scan Utility để thực hiện scan bảng mỏng thành hình có định dạng .png. Sau đó dùng phần mềm ImageJ để chuyển hình bảng

mỏng từ định dạng .png sang dạng .tiff. Cuối cùng là dùng phần mềm Image Lab để thực hiện đo cường độ màu các vết trên bảng mỏng, cắt peak và lấy số liệu diện tích peak (Hình 4). Dùng phần mềm Microsoft Excel 365 để thực hiện tính toán số liệu thu được và đưa ra kết quả theo công thức:

$$\% (kl/kl) = \frac{e^{\frac{(S-b)}{a}} \times 5}{m} \times 100$$

Trong đó: S: diện tích vết

m: khối lượng mẫu thử



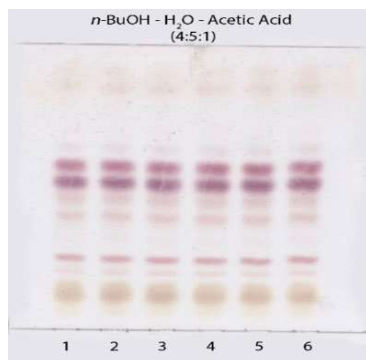
Hình 4. Sắc ký đồ sau khi xử lý bằng phần mềm Image Lab

3.2 Đánh giá phương pháp bán định lượng

3.2.1 Tính tương thích hệ thống

Bảng mỏng đánh giá tính tương thích hệ thống được thể hiện ở Hình 5 và dữ liệu được

trình bày ở Bảng 2. Kết quả cho thấy phương pháp sắc ký lớp mỏng cho độ lặp lại diện tích vết tương đối tốt với %RSD < 7,5%.



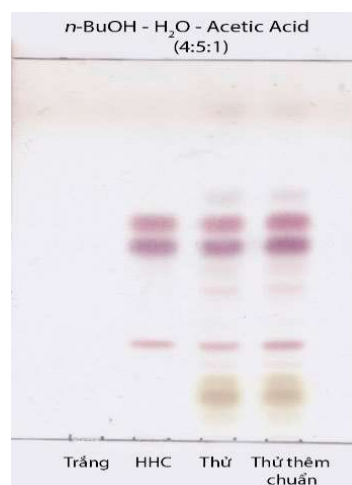
Hình 5. Bảng mỏng khảo sát tính tương thích hệ thống

Bảng 2. Dữ liệu khảo sát tính tương thích hệ thống

	G-Rg ₁		M-R2		G-Rb ₁	
	R _f	Diện tích vết	R _f	Diện tích vết	R _f	Diện tích vết
Trung bình	0,57	120723	0,51	151108	0,25	67773
Độ lệch chuẩn (SD)	0,0056	3781,58	0,0053	4450,92	0,0052	4917,34
RSD (%)	0,983	3,132	1,040	2,946	2,081	7,256

3.2.2 Tính đặc hiệu

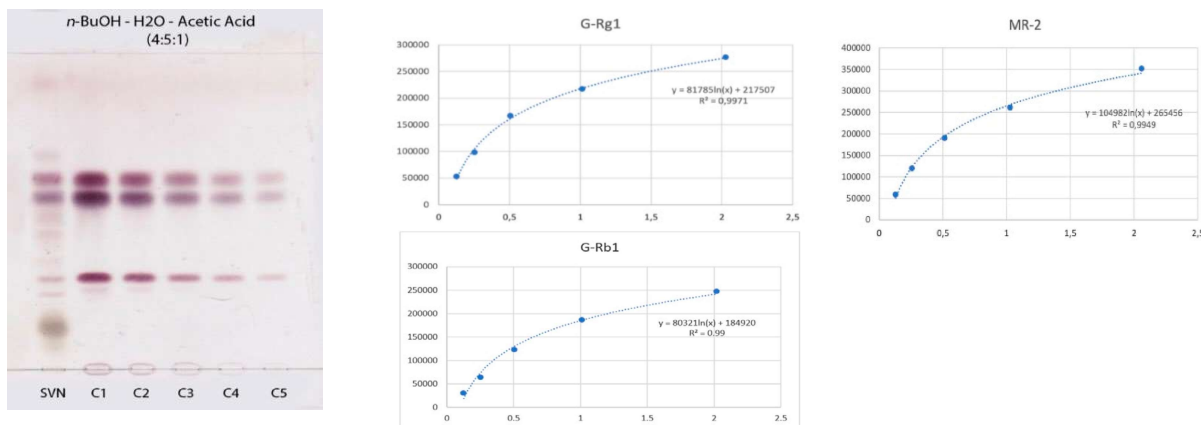
Bảng mỏng đánh giá độ đặc hiệu của phương pháp thể hiện trong Hình 6. Kết quả cho thấy Mẫu trắng không có các vết tương ứng với mẫu thử. Mẫu thử và mẫu chuẩn có các vết cùng R_f. Khi thêm chuẩn vào thử, diện tích của các vết đã tăng lên. Vì vậy, phương pháp đạt độ đặc hiệu



Hình 6. Bảng mỏng đánh giá độ đặc hiệu của phương pháp

3.2.3 Tính tuyến tính

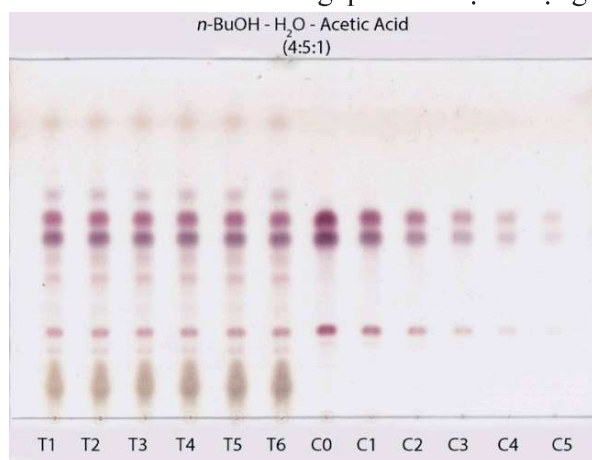
Tính tuyến tính của phương pháp thể hiện ở Hình 7 cho thấy mối tương quan giữa hàm lượng và diện tích vết theo hàm logarithm tự nhiên với $R^2 \geq 0,99$. Khoảng tuyến tính của cả 3 saponin nằm trong khoảng 0,126-2,02 mg/ml.



Hình 7. Bảng mỏng và phương trình thể hiện tính tuyến tính của phương pháp bán định lượng

3.2.4 Độ chính xác trong ngày

Bảng mỏng khảo sát độ chính xác trong ngày được trình bày ở Hình 8. Dữ liệu thống kê được thể hiện trong Bảng 3 cho thấy quy trình có độ chính xác tương đối tốt với %RSD < 10% (n=6). Do mối tương quan không là tuyến tính nên khi định lượng khảo sát mẫu thử kèm với giai mẫu chuẩn để tránh sai số trong quá trình định lượng.



Hình 8. Bảng mỏng đánh giá độ chính xác trong ngày

Chú thích: T1-T6: mẫu thử 1-6. C1-C5: Hỗn hợp chuẩn 1-5. C0: Hỗn hợp chuẩn 1 nạp 20 μ l

Bảng 3. Dữ liệu thống kê độ chính xác trong ngày

	Hàm lượng saponin có trong mẫu thử		
	G-Rg1	M-R2	G-Rb1
Trung bình	3,594	4,367	0,930
SD	0,300	0,422	0,086
RSD (%)	8,356	9,657	9,193

3.2.5 Độ chính xác liên ngày

Dữ liệu độ chính xác liên ngày được thể hiện ở Bảng 4. Kết quả cho thấy phương pháp có độ lặp lại liên ngày tương đối tốt với %RSD < 10% (n=3 \times 3).

Bảng 4. Dữ liệu độ chính xác liên ngày

	Hàm lượng (% , kl/kl)		
	G-Rg ₁	MR2	G-Rb ₁
Trung bình	3,879	4,312	2,092
SD	0,145	0,283	0,035
RSD (%)	3,737	6,571	1,678

3.2.6 Độ đúng

Dữ liệu độ đúng của phương pháp được thể hiện ở Bảng 5. Kết quả cho thấy độ phục hồi của các chuẩn nằm trong khoảng 80-120%.

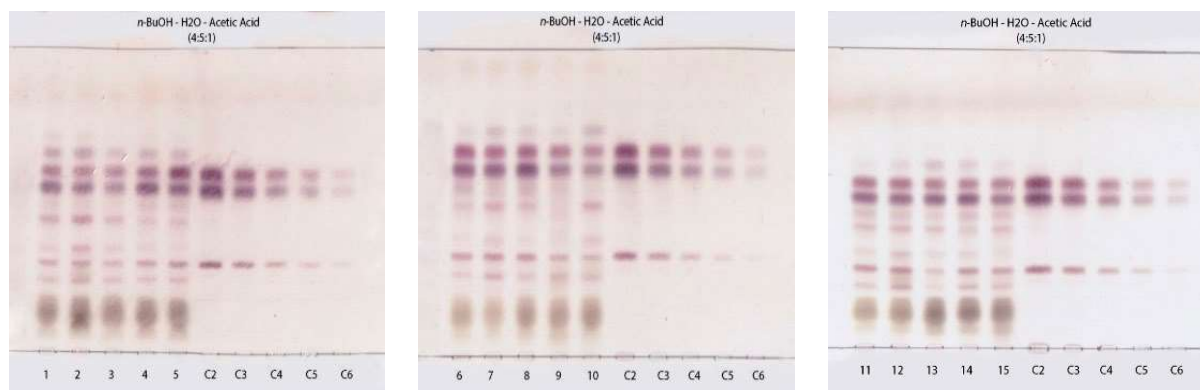
Bảng 5. Dữ liệu độ đúng của phương pháp bán định lượng

TT	Lượng chuẩn thêm vào	Tỷ lệ phục hồi (%)		
		G-Rg ₁	M-R2	G-Rb ₁
1	20%	108	102	91
2		108	119	110
3		115	119	115
1	30%	98	89	115
2		84	97	110
3		112	85	120
1	50%	112	99	102
2		95	118	94
3		113	105	85

3.3 Ứng dụng phương pháp để định lượng một số mẫu Sâm Ngọc Linh trên thị trường

Phương pháp bán định lượng sau khi xây dựng được ứng dụng để định lượng 15 mẫu Sâm Ngọc Linh trên thị trường. Bảng mỏng định lượng được thể hiện trong Hình 9. Kết quả định

lượng trình bày ở Bảng 6 cho thấy đa số các mẫu Sâm Ngọc Linh đều có hàm lượng M-R2 cao trong khoảng 5-10%. Cá biệt có một số mẫu có hàm lượng M-R2 rất thấp như mẫu 3 và 10. Hàm lượng G-Rg₁ và G-Rb₁ trong các mẫu lần lượt trong khoảng 1,69-4,99% và 0,19-0,66%.



Hình 9. Bảng mỏng ứng dụng quy trình bán định lượng một số mẫu Sâm Ngọc Linh trên thị trường

Bảng 6. Kết quả định lượng một số mẫu Sâm Ngọc Linh trên thị trường

Mẫu thử	Hàm lượng Saponin trong SVN (%, kl/kl)		
	G-Rg ₁	M-R2	G-Rb ₁
1	4,31	8,85	0,32
2	1,69	5,03	0,40
3	2,14	2,95	0,24
4	4,99	8,28	0,40
5	4,63	9,58	0,49
6	4,90	8,38	0,56
7	3,84	7,56	0,61
8	3,87	9,92	0,65
9	4,93	5,89	0,29
10	2,10	2,14	0,21
11	4,10	9,54	0,59
12	4,66	6,13	0,38
13	3,65	9,45	0,19
14	3,19	8,87	0,66
15	3,53	7,62	0,50
Trung bình	3,77	7,35	0,43
SD	1,08	2,43	0,162

4. KẾT LUẬN

Phương pháp bán định lượng các Saponin bằng sắc ký lớp mỏng giúp đánh giá nhanh hàm lượng các Saponin trong các mẫu SNL trên thị trường hiện nay. Đây là phương pháp đơn giản,

nhanh chóng, rẻ tiền, giúp tránh được các mẫu giả mạo, kém chất lượng, dược liệu rác, bảo vệ và tăng cường uy tín của Sâm Ngọc Linh trên thị trường trong nước và thế giới.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1] Vu-Huynh, K. L., Nguyen, H. T., Van Le, T. H., Ma, C. T., Lee, G. J., Kwon, S. W., & Nguyen, M. D. (2020). Accumulation of Saponins in Underground Parts of *Panax vietnamensis* at Different Ages Analyzed by *HPLC-UV/ELSD*. 25(13), 3086.
 [2] Hương, N. T. T., & Cúc, B. T. K. (2006). *Tác dụng bảo vệ gan của Sâm Việt Nam*

trong tổn thương gan thực nghiệm bằng ethanol. In V. D. liệu (Ed.). *Nghiên cứu phát triển Dược liệu và Đông Dược ở Việt Nam* (pp. 288-295): Nhà Xuất bản Khoa học-Kỹ thuật.
 [3] Hương, N. T. T., Matsumoto, K., & Watanabe, H. (2002). Tác động giải lo âu và chống trầm cảm của majonoside-R2,

- hoạt chất chính của Sâm Việt Nam (*Panax vietnamensis* Ha et Grushv. Araliaceae).
Tạp chí Dược liệu, 7(5), 148-152.
- [4] Vu-Huynh, K. L., Le, T. H. V., Nguyen, H. T., Kim, H. M., Kang, K. S., Park, J. H., & Nguyen, M. D. (2019). Increase in Protective Effect of *Panax vietnamensis* by Heat Processing. *Cisplatin-Induced Kidney Cell Toxicity*. 24(24), 4627.
- [5] Bộ Y tế. (2017). *Dược điển Việt Nam V*. Nhà xuất bản Y học, Hà Nội.
- [6] Nguyen, H. T., Vu-Huynh, K. L., Nguyen, H. M., Le, H. T., Le, T. H. V., Park, J. H., & Nguyen, M. D. (2021). Evaluation of the Saponin Content in *Panax vietnamensis* Acclimatized to Lam Dong Province by HPLC–UV/CAD. 26(17), 5373.
- [7] Agency, E. M. (2022). ICH Guideline Q2 (R2) on Validation of Analytical Procedures. *European Medicines Agency (EMA)* Amsterdam, The Netherlands.