

QUANTIFICATION OF PSEUDOPROTODIOSCIN FROM ASPARAGUS COCHINCHINENSIS (LOUR.) MERR. BY HPLC-UV

Nguyen Thi Phuong^{1*}, Hoang Thi Tuyet¹, Vi Thi Tuyen¹, Phung Thi Hoai Thu¹,
 Nguyen Huu Thien², Le Thi Phuong², Nguyen Thi Hanh²

¹Center for application of science and technology in Medicinal Material

²Dong A Science and Technology Joint Stock Company

ARTICLE INFO	ABSTRACT
Received: 13/7/2023	The objective of this study was to develop and validate for quantification of pseudoprotodioscin from <i>Asparagus cochinchinensis</i> (Lour.) Merr. by HPLC coupled with UV-Vis detector. The method was carried out by using a Lightversil C18 (25 cm x 4.6 mm, 5 µm) column with various gradients of solvent system of water – acetonitrile, the flow rate of 1 mL/min. For detection of pseudoprotodioscin, the absorption wavelength of detection was set at 203 nm. Results showed that the calibration curve displayed a good linear relationship ($R^2=1$). The validation results displayed the good accuracy, repeatability, linearity, and selectivity according to the ICH guideline. The limits of detection (LOD) and quantification (LOQ) were 2.13 and 6.45 µg/ml for pseudoprotodioscin, respectively. The content of pseudoprotodioscin in <i>A.cochinchinensis</i> (Lour.) Merr.) collected in Vietnam ranged from 0.020% to 0.206%. The results provide useful information for the quality assessment of <i>A.cochinchinensis</i> (Lour.) Merr. in Vietnam. The method is qualified for the determination of the content of pseudoprotodioscin in <i>A.cochinchinensis</i> (Lour.) Merr.
Revised: 30/8/2023	
Published: 13/9/2023	
KEYWORDS	
Quantification	
<i>Asparagus cochinchinensis</i> (Lour.) Merr.	
Vietnam	
Pseudoprotodioscin	
HPLC-UV	

ĐỊNH LƯỢNG HOẠT CHẤT PSEUDOPROTODIOSCIN TRONG DƯỢC LIỆU THIÊN MÔN ĐÔNG BẰNG PHƯƠNG PHÁP HPLC-UV

Nguyễn Thị Phương^{1*}, Hoàng Thị Tuyết¹, Vi Thị Tuyền¹, Phùng Thị Hoài Thu¹,
 Nguyễn Hữu Thiện², Lê Thị Phương², Nguyễn Thị Hạnh²

¹Trung tâm Ứng dụng Khoa học công nghệ Dược liệu, ²Công ty Cổ phần Khoa học Công nghệ Đông Á

THÔNG TIN BÀI BÁO	TÓM TẮT
Ngày nhận bài: 13/7/2023	Mục tiêu của nghiên cứu này là phát triển và thẩm định phương pháp định lượng pseudoprotodioscin trong dược liệu Thiên môn đông (<i>Asparagus cochinchinensis</i> (Lour.) Merr.) bằng sắc ký lỏng hiệu năng cao với đầu dò UV- Vis. Phương pháp sắc ký được thực hiện trên cột pha đảo Lightversil C ₁₈ (25cm x 4,6mm, 5µm), pha động acetonitril – nước, chế độ rửa giải gradient, tốc độ dòng 1 mL/phút. Bước sóng phát hiện của pseudoprotodioscin là 203 nm. Kết quả nghiên cứu cho thấy đường chuẩn xây dựng được có độ tuyến tính cao ($R^2=1$). Kết quả thẩm định phương pháp đáp ứng các yêu cầu của ICH về độ chính xác, độ lặp lại, khoảng tuyến tính và độ chọn lọc. Giới hạn phát hiện (LOD) và giới hạn định lượng (LOQ) của pseudoprotodioscin lần lượt là 2,13 và 6,45 µg/ml. Hàm lượng pseudoprotodioscin trong các mẫu Thiên môn đông tại Việt Nam dao động trong khoảng 0,020 – 0,206%. Kết quả thu được góp phần gợi ý cho việc kiểm tra chất lượng dược liệu Thiên môn đông tại Việt Nam. Như vậy, phương pháp HPLC-UV đạt yêu cầu phép định lượng pseudoprotodioscin trong Thiên môn đông.
Ngày hoàn thiện: 30/8/2023	
Ngày đăng: 13/9/2023	
TỪ KHÓA	
Định lượng	
Thiên môn đông	
Việt Nam	
Pseudoprotodioscin	
HPLC-UV	

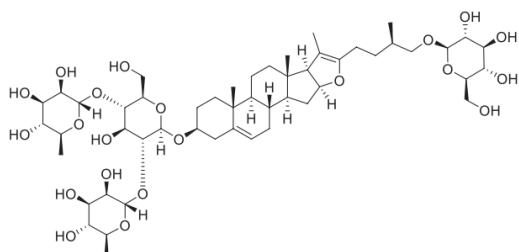
DOI: <https://doi.org/10.34238/tnu-jst.8326>

* Corresponding author. Email: vudangquang148@gmail.com

1. Đặt vấn đề

Thiên môn đông (*Asparagus cochinchinensis* (Lour.) Merr.) là cây leo lâu năm, có tên khác là Thiên môn chùm, thuộc họ Thiên môn đông (Asparagaceae). Cây được phân bố ở một số quốc gia như Trung Quốc, Nhật Bản, Hàn Quốc, Việt Nam. Rễ Thiên môn đông là bộ phận được sử dụng làm thuốc trong y học cổ truyền, với công dụng làm mát, bổ phổi, điều trị sốt, ho, ho ra máu, táo bón,... [1]. Về tác dụng dược lý, Thiên môn đông có hoạt tính chống oxy hóa, chống ung thư, kháng nấm, kháng khuẩn [2]. Thành phần hóa học của Thiên môn đông gồm các nhóm chất saponin, steroid, phytosterol, polysaccharid, amino acid tự do [1].

Pseudoprotodioscin là một hoạt chất saponin steroid được tìm thấy trong dược liệu Thiên môn đông (Hình 1). Hợp chất này có nhiều tác dụng sinh học quý như chống viêm [3], giảm biểu hiện gen liên quan đến sự tổng hợp cholesterol và chất béo trung tính [4], bảo vệ gan [5], hoạt tính kháng tế bào ung thư [6]. Hợp chất này được Dược điển Hồng Kông (ĐĐHK) quy định làm tiêu chí đánh giá chất lượng của dược liệu Thiên môn đông với hàm lượng không nhỏ hơn 0,026% [7]. Trong khi đó, chuyên luận Thiên môn đông trong Dược điển Việt Nam V (ĐĐVN) gồm một số chỉ tiêu như mô tả, bột, định tính, độ ẩm, tạp chất, tro toàn phần, chất chiết được trong dược liệu [8]. Chuyên luận này chưa có chỉ tiêu định lượng hoạt chất, vì vậy chưa giúp kiểm soát chặt chẽ chất lượng dược liệu Thiên môn đông. Do đó, chúng tôi tiến hành phân tích thành phần pseudoprotodioscin trong dược liệu Thiên môn đông thu tại Việt Nam. Kết quả thu được nhằm gợi ý nâng cấp chuyên luận dược liệu Thiên môn đông trong ĐĐVN.



Hình 1. Công thức cấu tạo của hợp chất pseudoprotodioscin



Hình 2. Một số mẫu dược liệu Thiên môn đông dùng cho nghiên cứu

2. Nguyên liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Nguyên liệu

Dược liệu Thiên môn đông (*Radix Asparagus cochinchinensis*) (Hình 2) được cung cấp từ dự án “Sản xuất thử nghiệm giống và dược liệu từ nguồn gen Thiên Môn Đông (*Asparagus cochinchinensis* (Lour.) Merr.) theo hợp đồng giữa công ty Cổ phần Khoa học Công nghệ Đông Á với Bộ Khoa học và Công nghệ, được sấy khô ở 60°C, nghiền nhỏ. Lấy khoảng 30 g mẫu khô, nghiền thành bột mịn dùng cho nghiên cứu.

2.2. Dung môi, hóa chất

Chất chuẩn pseudoprotodioscin của hãng Chemfaces, CAS 102115-79-7, độ tinh khiết 98,5%. Các dung môi, hóa chất sử dụng đều là hóa chất tinh khiết phân tích (PA), được mua của hãng Merck (Đức) hoặc tương đương.

2.3. Thiết bị

Thiết bị dùng cho nghiên cứu là Hệ thống HPLC (Shimadzu Nhật Bản) gồm bơm LC 20AD, bộ tiêm mẫu tự động SIL-20AHT, detector UV-VIS, phần mềm Labsolution để truy xuất hình ảnh và số liệu trên máy HPLC.

2.4. Phương pháp nghiên cứu

2.4.1. Phát triển phương pháp HPLC-UV định lượng pseudoprotodioscin trong dược liệu Thiên môn đông

Tham khảo chuyên luận Thiên môn đông (*Asparagi Radix*) trong ĐDHK [7].

Dung dịch mẫu thử: Cân chính xác khoảng 1,0 g bột mẫu thử vào bình tam giác nút mài, thêm 10 ml MeOH 65%, đậy nắp, siêu âm trong 15 phút, lọc dịch chiết. Chiết lặp lại với lần lượt 10 ml và 5 ml MeOH 65%. Gộp dịch chiết ở 3 lần lại, chuyển vào bình định mức 25 ml. Rửa bình tam giác và bã dược liệu bằng một ít MeOH 65%. Định mức vừa đủ bằng MeOH 65%, lắc đều, được dung dịch mẫu thử.

Dung dịch chuẩn: Cân chính xác khoảng 5,0 mg pseudoprotodioscin vào bình định mức 5 ml. Thêm 3 ml MeOH 65%, siêu âm cho tan hết, bổ sung bằng MeOH 65% đến vạch mức. Tiến hành pha loãng để được các dung dịch chuẩn có nồng độ là: 8,44 – 270 µg/ml.

Điều kiện sắc ký:

Pha tĩnh: Cột pha đảo Lightversil C₁₈ (25cm x 4,6mm, 5µm); pha động gồm acetonitril (kênh B) và nước (kênh A); bước sóng phát hiện 203 nm; tốc độ dòng 1 ml/phút, thể tích tiêm mẫu là 10µl. Chương trình gradient như sau: 0-5 phút (15% kênh B), 5-25 phút (15-30% kênh B), 25-35 phút (30% kênh B), 35-60 phút (31% kênh B), 60-61 phút (31-15% kênh B), 70 phút (15% kênh B).

2.4.2. Thẩm định phương pháp phân tích

Phương pháp phân tích được thẩm định về độ đặc hiệu, tính tuyến tính, tính thích hợp hệ thống, giới hạn phát hiện (LOD) và giới hạn định lượng (LOQ), độ lặp lại, độ đúng theo hướng dẫn của ICH [9]. LOD và LOQ được xác định dựa vào độ lệch chuẩn của tín hiệu và độ dốc của đường chuẩn.

2.4.3. Phân tích hàm lượng pseudoprotodioscin trong các mẫu dược liệu Thiên môn đông

Áp dụng phương pháp phân tích xây dựng được để đánh giá hàm lượng pseudoprotodioscin trong các mẫu dược liệu Thiên môn đông. Công thức tính hàm lượng pseudoprotodioscin theo phương pháp HPLC-UV như sau:

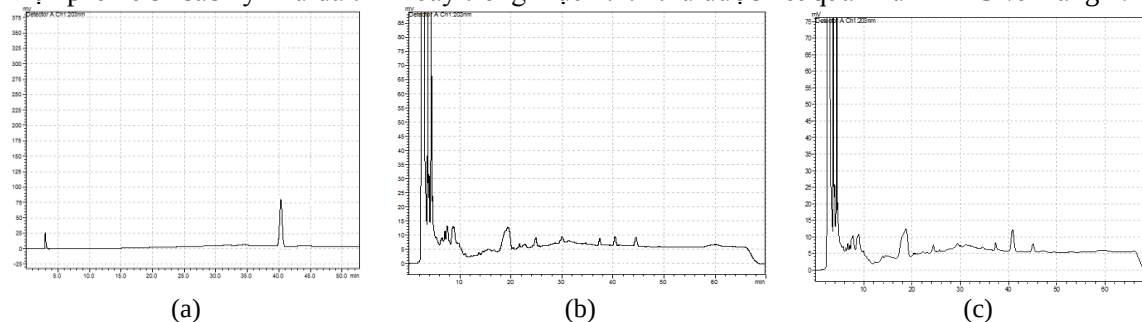
$$X (\%) = \frac{C \times V \times 100 \times P}{m \times 1000000 \times (100 - B)} \times 100 \quad (1)$$

Trong đó: C là nồng độ pseudoprotodioscin trong dung dịch mẫu thử (µg/ml) tính từ đường chuẩn; V là thể tích pha mẫu thử (ml), m là khối lượng cân mẫu thử (g) và B là hàm ẩm của mẫu thử (%), P: độ tinh khiết chất chuẩn.

3. Kết quả nghiên cứu và bàn luận

3.1. Lựa chọn điều kiện phân tích sắc ký

Sắc ký đồ (SKĐ) HPLC phân tích pseudoprotodioscin trong Thiên môn đông áp dụng điều kiện phân tích sắc ký như đã trình bày trong mục 2.4.1 thu được kết quả như Hình 3 và Bảng 1.



Hình 3. Kết quả lựa chọn điều kiện sắc ký: (a) SKĐ HPLC mẫu chuẩn pseudoprotodioscin; (b) SKĐ HPLC mẫu Thiên môn đông và (c) SKĐ HPLC mẫu Thiên môn đông thêm chuẩn

Bảng 1. Thông số pic của pseudoprotodioscin trong mẫu Thiên môn đông

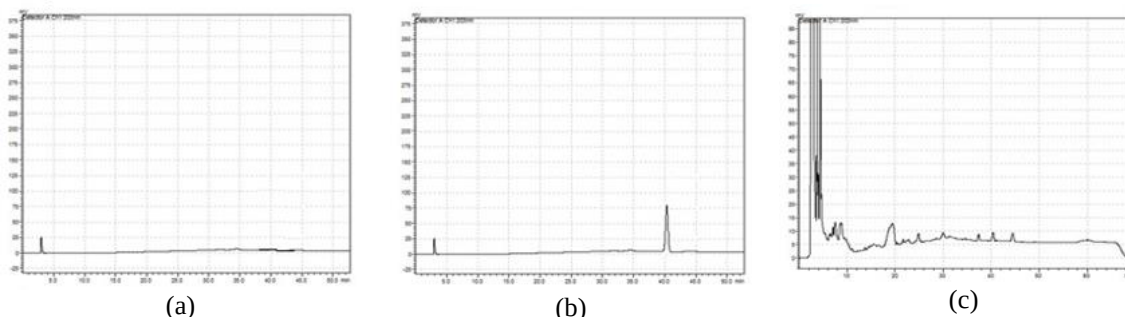
Pic	Thời gian lưu (phút)	Độ phân giải (Rs)	Hệ số kéo đuôi pic (A_s)	Số đĩa lý thuyết (N)
Pseudoprotodioscin	40,065	1,551	1,066	52972

Nhận thấy tín hiệu pic pseudoprotodioscin cân đối, tách khỏi nền mẫu. Hiệu quả tách được đánh giá dựa trên ba thông số chính là thời gian lưu (t_R), độ phân giải (R_s) và hệ số đối xứng pic (A_s), sao cho: $1,5 < R < 2$; $0,9 < A_s < 1,2$. Do vậy, điều kiện phân tích phù hợp cho quá trình phân tích hàm lượng pseudoprotodioscin trong các mẫu Thiên môn đông.

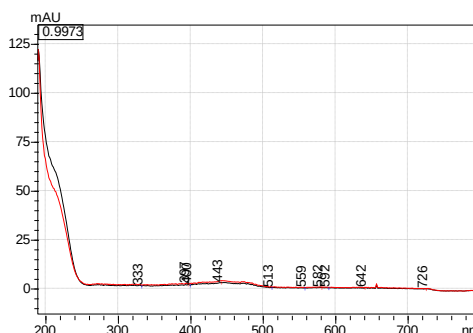
3.2. Thẩm định phương pháp phân tích

3.2.1. Độ đặc hiệu của phương pháp

Tiến hành sắc ký dung môi pha mẫu (methanol 65%), dung dịch mẫu dược liệu Thiên môn đông và dung dịch chuẩn pseudoprotodioscin với các điều kiện sắc ký đã lựa chọn. Kết quả được trình bày trong Hình 4 và Hình 5.



Hình 4. Sắc ký đồ đánh giá độ đặc hiệu đối với pseudoprotodioscin: (a) mẫu dung môi MeOH 65%, (b) Dung dịch chuẩn và (c) Dung dịch mẫu thử



Hình 5. Phổ UV đánh giá độ tinh khiết của pic pseudoprotodioscin trong mẫu thử

Trên sắc ký đồ thu được cho thấy dung môi pha mẫu không có pic đáp ứng tại thời gian lưu của pseudoprotodioscin chứng tỏ tín hiệu pseudoprotodioscin là đặc trưng, không trùng với tín hiệu khác. Thời gian lưu của các pic pseudoprotodioscin ở các mẫu phân tích là tương đương nhau $t_R=40,065$ phút. Bên cạnh đó, hệ số chồng phổ của pseudoprotodioscin của mẫu thử so với mẫu chuẩn lớn hơn 0,99. Chứng tỏ phương pháp xây dựng đáp ứng yêu cầu về độ đặc hiệu để định lượng pseudoprotodioscin trong dược liệu Thiên môn đông.

3.2.2. Tính thích hợp hệ thống

Tiến hành sắc ký 6 lần một dung dịch chuẩn pseudoprotodioscin có nồng độ 33,75 $\mu\text{g/ml}$ với điều kiện sắc ký đã lựa chọn. Tiến hành ghi lại thời gian lưu và diện tích pic tương ứng. Kết quả thu được (Bảng 2) cho thấy các giá trị độ lệch chuẩn tương đối của diện tích pic và thời gian lưu của pseudoprotodioscin đều nhỏ hơn 2%. Điều này cho thấy các điều kiện sắc ký đã lựa chọn và hệ

thống HPLC sử dụng là phù hợp và đảm bảo độ ổn định của phép phân tích định lượng pseudoprotodioscin.

Bảng 2. Tính thích hợp của hệ thống

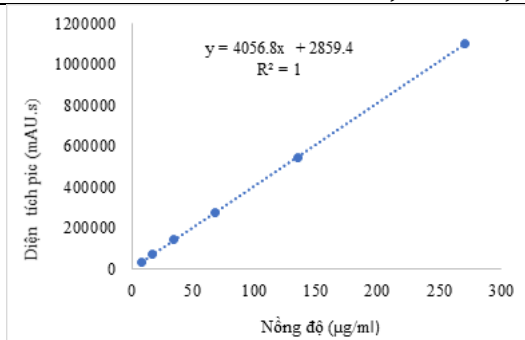
STT	Diện tích pic (mAU.s)	Thời gian lưu (phút)
1	141584	40,372
2	142432	40,232
3	143462	40,065
4	141209	39,872
5	141747	40,014
6	143984	39,840
Trung bình	142403	40,066
RSD (%)	0,78	0,51

3.2.3. Xây dựng đường chuẩn

Chuẩn bị một dãy gồm dung dịch chuẩn pseudoprotodioscin có nồng độ tăng dần từ 8,44(µg/ml) đến 270 (µg/ml) (Bảng 3), rồi tiến hành phân tích sắc ký với các điều kiện như đã trình bày ở trên. Đường chuẩn xây dựng được trình bày trong Hình 6.

Bảng 3. Kết quả xây dựng đường chuẩn của pseudoprotodioscin

Pseudoprotodioscin						
Nồng độ (µg/ml)	270	135	67,5	33,8	16,9	8,44
Diện tích pic (mAU.s)	1099621	547221	275851	143480	71767	35953
Độ chệch (%)	0,13	0,61	0,33	2,65	0,54	3,56
Phương trình	$Y = 4056,8x + 2859,4$ ($R^2=1$)					



Hình 6. Đường chuẩn biểu diễn mối quan hệ giữa nồng độ pseudoprotodioscin và diện tích pic

Kết quả xây dựng đường chuẩn cho thấy giá trị R^2 lớn hơn 0,99 và các giá trị độ chệch giữa giá trị nồng độ chất định phân thực tế và nồng độ chất định phân tính lại từ đường chuẩn là dưới 15%. Điều này chứng tỏ đường chuẩn xây dựng được có độ tuyến tính cao đảm bảo để thực hiện phép phân tích định lượng pseudoprotodioscin.

3.2.4. Độ chính xác

Tiến hành phân tích lặp lại 6 lần cùng một mẫu thử thu được kết quả đánh giá độ lặp lại trong ngày của phương pháp. Phân tích lặp lại 6 lần mẫu thử đó vào một ngày khác để thu kết quả của 12 lần phân tích dùng cho đánh giá độ lặp lại khác ngày. Kết quả thu được theo Bảng 4.

Bảng 4. Kết quả đánh giá độ lặp lại trong ngày và khác ngày

Mẫu thử	Ngày 1			Ngày 2		
	m (g)	Diện tích pic (mAU.s)	Hàm lượng (%)	m (g)	Diện tích pic (mAU.s)	Hàm lượng (%)
1	1,0973	99318	0,058	1,2860	113955	0,057
2	1,1138	99078	0,057	1,3558	122045	0,058
3	1,3065	113826	0,056	1,2382	113582	0,059

Mẫu thử	Ngày 1			Ngày 2		
	m (g)	Diện tích pic (mAU.s)	Hàm lượng (%)	m (g)	Diện tích pic (mAU.s)	Hàm lượng (%)
4	1,2288	110878	0,058	1,2551	115095	0,059
5	1,1047	99971	0,058	1,1165	99318	0,057
6	1,1022	99752	0,058	1,3126	116258	0,057
HLTB (%; n=6)		0,0575			0,0578	
RSD; n=6		1,46			1,70	
HLTB (%; n=12) = 0,0577 %; RSD (n=12) = 1,54 %						

Kết quả cho thấy các giá trị độ lệch chuẩn đều nhỏ hơn 2,0%, chứng tỏ phương pháp phân tích có độ chính xác cao.

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

Từ đường chuẩn đã xây dựng ta có: $SD = 2615,48$ và $a = 4056,8$. Áp dụng vào công thức để tính giá trị LOD và LOQ. Kết quả tìm được giá trị LOD và LOQ lần lượt là 2,13 và 6,45 ($\mu\text{g/ml}$). Theo một nghiên cứu định lượng saponin steroid (trong đó có hợp chất pseudoprotodioscin) bằng phương pháp HPLC-QQQ/MS, kết quả nghiên cứu cho thấy giá trị LOD, LOQ lần lượt nhỏ hơn 187,5 ng/ml và 375 ng/ml. Như vậy, phương pháp HPLC-UV cho độ nhạy kém hơn so với phương pháp HPLC-QQQ/MS [10].

3.2.6. Độ đúng của phương pháp

Độ đúng được xác định bằng phương pháp thêm chuẩn. Thực hiện thêm chuẩn ở 3 mức khoảng 80%, 100% và 120% so với hàm lượng của pseudoprotodioscin trong mẫu dược liệu Thiên môn đông. Mỗi mức thêm chuẩn được thực hiện lặp lại 3 lần. Kết quả được trình bày trong Bảng 5.

Bảng 5. Kết quả đánh giá độ đúng của phương pháp

TT	Lượng chuẩn thêm vào ($\mu\text{g/ml}$)	Lượng chuẩn tìm thấy ($\mu\text{g/ml}$)	Độ thu hồi trung bình (%)
Mức 80	32,40	$32,80 \pm 0,09$	$101,23 \pm 0,28$
Mức 100	40,52	$40,73 \pm 0,20$	$100,52 \pm 0,49$
Mức 120	48,60	$48,00 \pm 0,50$	$98,77 \pm 1,04$

Kết quả cho thấy độ thu hồi trung bình đối với hợp chất pseudoprotodioscin từ 98,77 đến 101,23%, chứng tỏ phương pháp phân tích có độ đúng cao, đạt yêu cầu cho phân tích pseudoprotodioscin trong dược liệu Thiên môn đông.

3.3. Xác định hàm lượng pseudoprotodioscin trong một số mẫu Thiên môn đông

Áp dụng phương pháp đã lựa chọn để phân tích một số mẫu dược liệu Thiên môn đông tại Việt Nam. Kết quả định lượng hợp chất pseudoprotodioscin (tính theo khối lượng dược liệu khô kiệt) được thể hiện ở Bảng 6.

Bảng 6. Kết quả phân tích một số mẫu dược liệu Thiên môn đông

STT	Ký hiệu mẫu	Thời gian lấy mẫu	Hàm lượng (%) pseudoprotodioscin
1	P1	5/2022	$0,030 \pm 0,001$
2	P2	5/2022	$0,052 \pm 0,001$
3	P3	6/2022	$0,020 \pm 0,002$
4	Q1	5/2022	$0,033 \pm 0,001$
5	Q2	5/2022	$0,032 \pm 0,002$
6	Q3	6/2022	$0,055 \pm 0,001$
7	Q4	6/2022	$0,028 \pm 0,001$
8	P4	11/2022	$0,206 \pm 0,002$
9	Q5	11/2022	$0,029 \pm 0,001$
10	Q6	11/2022	$0,029 \pm 0,001$
11	Q7	11/2022	$0,030 \pm 0,001$
12	Q8	11/2022	$0,035 \pm 0,001$

Kết quả cho thấy hàm lượng pseudoprotodioscin dao động từ 0,020-0,206%. Sự thay đổi này có thể do thời điểm thu hoạch cũng như điều kiện khí hậu, thổ nhưỡng của vùng trồng.

Thiên môn đông đã được đưa vào trong DĐVN V nhưng chưa có các chỉ tiêu định lượng hoạt chất. Tham khảo DĐHK và các nghiên cứu đã công bố cho thấy pseudoprotodioscin là hoạt chất chính trong Thiên môn đông. Kết quả phân tích 12 mẫu Thiên môn đông thu ở Việt Nam cho thấy các mẫu này đều có pseudoprotodioscin với hàm lượng dao động trong khoảng từ 0,020 – 0,206%. DĐHK quy định hàm lượng pseudoprotodioscin không dưới 0,026%. Như vậy, tham chiếu theo DĐHK có 01 mẫu không đạt yêu cầu về chất lượng. Nghiên cứu này đã phát triển phương pháp và thẩm định được 01 phương pháp HPLC-UV có độ lặp lại, độ chính xác cao, phù hợp định lượng pseudoprotodioscin trong Thiên môn đông, giúp cho việc kiểm soát chất lượng dược liệu Thiên môn đông chặt chẽ hơn. Kết quả đạt được cũng góp phần gợi ý bổ sung tiêu chí định lượng cho chuyên luận Thiên môn đông trong DĐVN.

4. Kết luận

Nghiên cứu đã phát triển và thẩm định được phương pháp định lượng pseudoprotodioscin trong dược liệu Thiên môn đông (*Radix Asparagus cochinchinensis*) bằng sắc ký lỏng hiệu năng cao HPLC-UV, sử dụng cột pha đảo Lightversil C₁₈ (25cm x 4,6mm, 5μm) hệ dung môi acetonitril – nước, rửa giải theo chương trình gradient, bước sóng phát hiện của hợp chất pseudoprotodioscin là 203 nm. Phương pháp có độ nhạy, đảm bảo độ đúng và độ lặp lại. Kết quả phân tích 12 mẫu Thiên môn đông cho hàm lượng pseudoprotodioscin dao động từ 0,020 – 0,206% (tính theo khối lượng dược liệu khô tuyệt đối).

TÀI LIỆU THAM KHẢO/ REFERENCES

- [1] D. H. Bich, *Medicinal plants and animals in Vietnam*. Science and technics publishing house, 2009, pp. 863-866.
- [2] M. Wang, S. Wang, W. Hu, Z. Wang, B. Yang, and H. Kuang, "Asparagus cochinchinensis: A review of its botany, traditional uses, phytochemistry, pharmacology, and applications," *Frontiers in Pharmacology*, vol. 13, pp. 1068858-1068858, 2022.
- [3] B. Sun, D. Yang, Y. Z. Yin, and J. Xiao, "Estrogenic and anti-inflammatory effects of pseudoprotodioscin in atherosclerosis-prone mice: Insights into endothelial cells and perivascular adipose tissues," *European Journal of Pharmacology*, vol. 869, 2020, Art. no. 172887.
- [4] Y. Gai, Y. Li, Z. Xu, and J. Chen, "Pseudoprotodioscin inhibits SREBPs and microRNA 33a/b levels and reduces the gene expression regarding the synthesis of cholesterol and triglycerides," *Fitoterapia*, vol. 139, 2019, Art. no. 104393.
- [5] M. A. Siddiqui, Z. Ali, A. G. Chittiboyina, I. A. Khan, "Hepatoprotective effect of steroidal glycosides from *Dioscorea villosa* on hydrogen peroxide-induced hepatotoxicity in HepG2 cells," *Frontiers in pharmacology*, vol. 9, p. 797, 2018.
- [6] M. Dong, X. Z. Feng, L. J. Wu, B. X. Wang, T. Ikejima, "Two new steroidal saponins from the rhizomes of *Dioscorea panthaica* and their cytotoxic activity," *Planta medica*, vol. 67, no. 09, pp. 853-857, 2001.
- [7] HongKong Chinese Materia Medica Standards (HKCMMS) Office, *Asparagi Radix*, vol. 9, pp. 43-55, 2009.
- [8] Ministry of Health, *Vietnamese Pharmacopoeia V*. Medical Publishing House, Hanoi, Vietnam, 2017, p. 1339.
- [9] ICH, *Validation of analytical procedures: Text and methodology Q2(R1)*, ICH Harmonised Tripartite Guideline, pp. 1-13, 2005.
- [10] L. Guo, S. L. Zeng, Y. Zhang, P. Li, and E. H. Liu, "Comparative analysis of steroidal saponins in four *Dioscoreae* herbs by high performance liquid chromatography coupled with mass spectrometry," *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, vol. 117, pp. 91-98, 2016.