

NGHIÊN CỨU KHẢ NĂNG TÁI SINH CHỒI VÀ TẠO CALLUS TRONG ĐIỀU KIỆN *IN VITRO* CÂY SÂM BỐ CHÍNH HOA ĐỎ (*ABELMOSCHUS SAGITTIFOLIUS KURZ*)

Ngô Thị Minh Thu, Nguyễn Nhật Hoàng Giang, Bùi Thị Diệu,
Nguyễn Đức Tuấn, Trương Thị Bích Phương
Trường Đại học Khoa học – Đại học Huế

Tóm tắt

Sâm bối chính hoa đỏ (*Abelmoschus sagittifolius Kurz*) là cây thuốc quý được sử dụng nhiều trong các bài thuốc cổ truyền. Loài cây này đang có nguy cơ bị cạn kiệt do nhu cầu khai thác tăng cao và khả năng tái sinh cây ngoài tự nhiên thấp. Áp dụng phương pháp nuôi cấy mô thực vật, bước đầu chúng tôi thu được kết quả về khả năng tái sinh *in vitro* và tạo callus cây Sâm bối chính. Kết quả nghiên cứu cho thấy thời gian khử trùng mẫu hạt bằng $HgCl_2$ 0,10 % trong 10 phút đạt hiệu quả cao nhất với tỷ lệ sống đạt 79,90 %. Tỷ lệ nhân chồi cao nhất khi nuôi cấy trong môi trường MS cơ bản bổ sung BAP nồng độ 1,5 mg/L kết hợp NAA nồng độ 0,75 mg/L (4,08 chồi/mẫu, chiều cao đạt 1,94 cm, các chồi phát triển xanh tốt, khỏe, cứng cáp). Quá trình nghiên cứu cũng cho thấy có sự phát sinh callus khi nuôi cấy trong môi trường kết hợp BAP với NAA ở cả lá và đoạn thân. Tỉ lệ phát sinh và kích thước callus tỷ lệ thuận với nồng độ NAA.

Từ khóa: Nuôi cấy mô và tế bào thực vật, Sâm bối chính hoa đỏ, tái sinh chồi

Abstract

IN VITRO REGENERATION AND CALLUS FORMATION OF *ABELMOSCHUS SAGITTIFOLIUS KURZ*

Ngo Thi Minh Thu, Nguyen Nhat Hoang Giang,
Bui Thi Dieu, Nguyen Duc Tuan, Truong Thi Bich Phuong
Department of Biology, Hue University of Sciences

Abelmoschus sagittifolius Kurz is a precious medicinal plant and used in many traditional remedies. This species is being threatened due to high demand for harvesting and low regeneration of natural plants. By applying tissue and plant cell culture method, we have initially achieved some results in the *in vitro* regeneration and callus formation of *Abelmoschus sagittifolius Kurz*. The results showed the seeds of *Abelmoschus sagittifolius Kurz* were sterilized with $HgCl_2$ 0.1% in 10 minutes achieved the highest efficiency with survival rate as high as 79.90%. The MS media was supplemented with 1.5 mg/L BAP and 0.75 mg/L NAA was recorded as the most appropriate for high percentage of shoot regeneration (with 4.08 shoots/sample, 1.94 cm height, the buds were green and strong). The study also showed that the callus induction was observed when leaves and stems were cultured on BAP and NAA media. The proliferation rates and callus size are directly proportional to NAA concentration.

Keywords: *Abelmoschus sagittifolius Kurz*, shoot regeneration, tissue and plant cell culture method.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Sâm bối chính hoa đỏ có tên khoa học *Abelmoschus sagittifolius Kurz*. Sâm bối chính hoa đỏ là cây thuốc quý được sử dụng nhiều trong các bài thuốc cổ truyền. Theo Đỗ Tất Lợi (1999) trong cuốn Những cây thuốc và vị thuốc Việt Nam đã viết: Sâm bối chính phối hợp với các vị thuốc khác để chữa các chứng ho, sốt nóng, trong người khô, táo, khát nước, gầy còm [7]. Đỗ Huy Bích và cộng sự (2004) công bố

rễ sâm bối chính có vị ngọt, hơi nhót, tính bình, vào 2 kinh: tỳ, phế, có tác dụng bổ khí, ích huyết, chỉ khát, sinh tân dịch; sao với gạo thì tính ấm, bổ tỳ vị, giúp tiêu hóa, thêm mạnh sức [2].

Theo Trần Công Luận và cs (2001), rễ cây sâm Bối Chính được trồng ở Bạc Liêu chứa phytosterol, coumarin, acid béo, acid hữu cơ, đường khử, hợp chất uronic và một số nguyên tố khác [8]. Năm 2006, tác giả Phan Văn Đề và Nguyễn Thị Thu Hương cùng

Địa chỉ liên hệ: Ngô Thị Minh Thu, email: minhthu8863@gmail.com

Ngày nhận bài: 17/12/2017, Ngày đồng ý đăng: 12/1/2018; Ngày xuất bản: 18/1/2018

công sự đã công bố rẽ củ của Sâm bối chính có chứa saponin triterpen, coumarin, chất nhầy, acid béo, đường khử, polyphenol và các nguyên tố đa vi lượng. Trong đó có saponin triterpen được xem là nhóm hợp chất có tác dụng dược lý điển hình của các cây thuốc họ Nhân sâm (*Araliaceae*), là loại dược chất có tác dụng tăng lực, chống nhược sức [3, 5].

Với những tác dụng dược lý quý đó, Sâm bối chính đang được khai thác mà chưa được quản lý chặt chẽ. Mặt khác, bộ phận sử dụng phổ biến là rễ củ càng làm cho loài này có nguy cơ bị khai thác cạn kiệt do cây không có khả năng tái sinh. Phương pháp nhân giống phổ biến nhất là qua hạt, tuy nhiên tỷ lệ nảy mầm không cao, tốn thời gian để cây sinh trưởng, phát triển. Hơn nữa, nhân cây bằng hạt có thể dẫn tới thoái hóa giống do sinh sản hữu tính. Thời gian luân canh với cây dài, khoảng 2-3 năm/vụ làm giảm hiệu quả kinh tế.

Xuất phát từ thực tế trên, chúng tôi tiến hành: “*Nghiên cứu khả năng tái sinh in vitro và tạo callus cây Sâm bối chính (*Abelmoschus sagittifolius Kurz*)*” nhằm tạo cơ sở cho việc cung cấp nguồn nguyên liệu ban đầu cho các nghiên cứu nhân giống và tách chiết hợp chất.

2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vô trùng mẫu cấy

Hạt Sâm bối chính hoa đỏ được chọn lựa sử dụng là hạt khỏe, chắc mẩy, không bị lép, biến dạng hay tổn thương vật lý, sau khi rửa sạch được đưa vào tủ cấy vô trùng. Khử trùng sơ bộ bằng cồn 70% trong 1 phút, sau đó được khử trùng bằng $HgCl_2$ 0,1% từ 6-12 phút. Rửa lại bằng nước cất vô trùng 5-6 lần. Khả năng khử trùng mẫu được đánh giá qua tỷ lệ mẫu chết, mẫu nhiễm và mẫu đạt (mẫu sống, không nhiễm) sau 2 tuần nuôi cấy [6].

2.2. Môi trường nuôi cấy

Môi trường nuôi cấy được sử dụng trong các thí nghiệm của chúng tôi là môi trường cơ bản MS (Murashige và Skoog, 1962) có 30 g/L saccharose, 8 g/L agar và bổ sung các tổ hợp chất kích thích sinh

Bảng 1.Ảnh hưởng của thời gian khử trùng bằng $HgCl_2$ 0,1% đến khả năng vô trùng mẫu

Thời gian khử trùng (phút)	Tỉ lệ mẫu nhiễm (%)	Tỉ lệ mẫu chết (%)	Tỉ lệ mẫu sống (%)
6	55,05	7,45	37,50
8	34,45	6,25	59,3
10	16.75	3,35	79,90
12	12,65	13,30	74,05

Theo dõi tỷ lệ mẫu sống sau 2 tuần cho thấy thời gian khử trùng khác nhau, tỷ lệ mẫu sống cũng khác nhau. Khử trùng mẫu bằng $HgCl_2$ 0,1% ở thời gian 10

trưởng (KTST) với nồng độ thâm dò khác nhau, tùy vào mục đích của từng loại thí nghiệm. Môi trường nuôi cấy có pH = 5,8, được khử trùng ở nhiệt độ 121°C, áp suất 1 atm, trong 15 phút [6].

2.3. Nuôi cấy ban đầu

Hạt được ngâm dung dịch GA₃ (Gibberelin) 30 mg/L trước khi khử trùng sơ bộ. Sau khử trùng trong tủ cấy, tạo vết thương hở tại phần nội nhũ của hạt, không làm tổn thương phần phôi. Cấy hạt vào môi trường MS cơ bản bổ sung 3% saccharose, 0,8% agar và GA₃ nồng độ thay đổi từ 0,50-1,75 mg/L, xử lý tối trong vòng 1 tuần, thamic dò khả năng nảy mầm của hạt [4].

2.4. Nghiên cứu khả năng tạo chồi và tạo callus trong điều kiện *in vitro*

Đoạn thân mang 1 chồi nách (khoảng 1 cm) tách từ cây con *in vitro* nảy mầm từ hạt, được cấy trên môi trường MS cơ bản bổ sung 3% saccharose, 0,8% agar và BAP (6-benzyl amino purin) nồng độ 0,50-1,75 mg/L hoặc BAP nồng độ 1,50 mg/L kết hợp NAA nồng độ thay đổi từ 0,25-1,25 mg/L để thamic dò khả năng tạo chồi và callus. Số liệu nghiên cứu thu được sau 2 tuần nuôi cấy.

2.2.5. Phân tích số liệu

Các thí nghiệm được bố trí theo kiểu hoàn toàn ngẫu nhiên, mỗi thí nghiệm được lặp lại 3 lần, mỗi lần lặp quan sát ít nhất 10 mẫu. Kết quả thí nghiệm được xử lý để thu giá trị trung bình và phân tích Duncan's test bằng phần mềm SPSS 16.0 với mức xác suất có ý nghĩa $p < 0,05$.

3. KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN

3.1. Nuôi cấy ban đầu

3.1.1. Ảnh hưởng thời gian khử trùng bằng $HgCl_2$ 0,1% đến khả năng vô trùng mẫu

Sau khi được rửa sạch ở ngoài, mẫu được lắc lại với nước cất vô trùng 2-3 lần trong tủ cấy. Sau đó khử trùng sơ bộ bằng cồn 70% trong 60 giây và tiếp tục khử trùng bằng $HgCl_2$ 0,1% từ 6-12 phút. Rửa lại bằng nước cất 3-5 lần trước khi cấy vào môi trường. Kết quả trình bày ở Bảng 1.

phút cho tỷ lệ mẫu sống đạt cao nhất (79%). Khi tăng thời gian khử trùng, tỷ lệ mẫu nhiễm có giảm nhưng không đáng kể, tỷ lệ mẫu chết tăng cao do

$HgCl_2$ thâm sâu vào mầm gây độc, khiến hạt không thể nảy mầm được.

3.1.2. Ảnh hưởng của GA_3 lên khả năng nảy mầm của mầm

Mầm sau khi được khử trùng được cấy vào môi

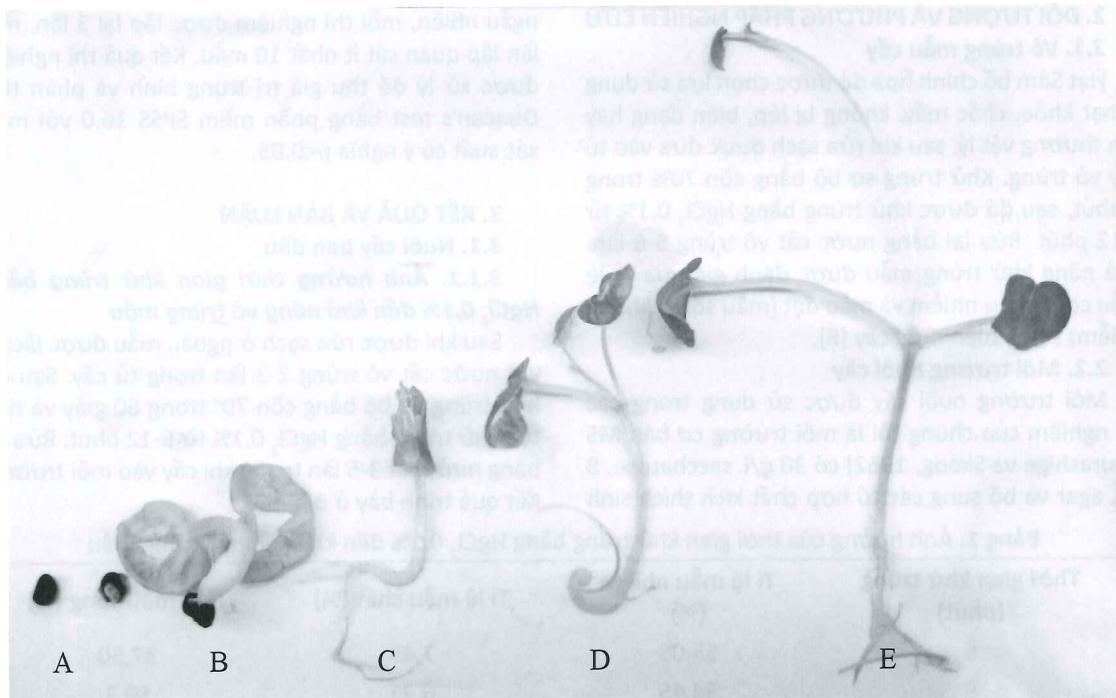
Bảng 2. Ảnh hưởng của GA_3 đến khả năng nảy mầm của hạt Sâm bổ chính hoa đỗ

Nồng độ GA_3 (mg/L)	Tỷ lệ nảy mầm (%)	Chiều cao cây (cm)
0,5	10,50	1,43
1,0	39,15	2,14
1,5	85,00	2,78
1,75	67,45	2,47
ĐC	22,5	1,20

Chú thích: ĐC: Môi trường cơ bản MS không bổ sung chất điều hòa sinh trưởng

Kết quả bảng 3.2 cho thấy, trong môi trường ĐC không có chất điều hòa sinh trưởng, hạt Sâm bổ chính vẫn nảy mầm nhưng thời gian dài, bắt đầu từ ngày thứ 10 sau khi cấy mới nảy mầm, tốc độ phát triển của cây con cũng rất hạn chế, sau 2 tuần cao khoảng 1,2 cm. Đối với hạt trong môi trường có bổ

sung GA_3 , hạt nảy mầm vào khoảng từ ngày thứ 4 sau cấy, tốc độ phát triển chiều cao nhanh hơn so với ĐC. Kết quả cao nhất là môi trường MS cơ bản có 3% saccharose, 0,8% agar, bổ sung GA_3 nồng độ 1,5 mg/L với tỷ lệ nảy mầm 85% và chiều cao cây 2,78 cm.



Hình 1. Quá trình nảy mầm và phát triển của cây Sâm bổ chính hoa đỗ *in vitro* trong môi trường MS bổ sung 1,5 mg/L GA_3 .

A. Hạt, B. Cây con *in vitro* sau 7 ngày nảy mầm từ hạt còn 2 lá mầm, C. Cây con *in vitro* sau 10 ngày có 2 lá thực, D. Cây *in vitro* sau 14 ngày, E. Cây *in vitro* sau 21 ngày.

— thước 1 cm

3.2. Khả năng tái sinh chồi và tạo callus

3.2.1. Ảnh hưởng của BAP đối với khả năng tái sinh chồi và tạo callus

Đoạn thân mang chồi nách (dài khoảng 1 cm) tách từ cây con *in vitro* này mầm từ hạt được cấy

trên môi trường MS cơ bản có 3% saccharose, 0,8% agar và bổ sung BAP nồng độ 0,50-2,00 mg/L để thăm dò khả năng tái sinh chồi của mẫu sau 2 tuần nuôi cấy. Kết quả được trình bày ở Bảng 3.

Bảng 3. Ảnh hưởng của BAP lên khả năng nhân chồi Sâm bố chính hoa đỏ sau 2 tuần

Nồng độ BAP (mg/L)	Số chồi/mẫu	Chiều cao chồi (cm)	Khả năng tạo callus
0,50	1,10 ^b	1,14 ^b	-
1,00	1,90 ^b	1,28 ^b	-
1,50	3,00^a	1,73^a	++
2,00	1,41 ^b	1,16 ^b	+
ĐC	1,00 ^c	1,08 ^c	-

Chú thích:

- Các chữ cái khác nhau trên cùng một cột chỉ ra sự sai khác có ý nghĩa thống kê của trung bình mẫu với $p < 0,05$ (Duncan's test)
- ĐC: Môi trường cơ bản MS không bổ sung chất điều hòa sinh trưởng
-: không hình thành callus, +: yếu, ++: trung bình

Trong quá trình nghiên cứu nhận thấy ở tất cả môi trường đều có sự hình thành chồi. Tuy nhiên, ở các môi trường có nồng độ BAP khác nhau thì khả năng tạo chồi là khác nhau. Trên môi trường ĐC, hệ số nhân chồi thấp, đạt 1,00 chồi/mẫu, thời gian xuất hiện chồi dài hơn.

Trên môi trường MS bổ sung BAP sau 1 tuần nuôi cấy đã xuất hiện chồi mới. Khi bổ sung BAP nồng độ 0,50-1,50 mg/L, số chồi/mẫu và chiều cao chồi đều tăng. Khả năng tạo chồi tốt nhất là trên môi trường bổ sung 1,50 mg/L BAP với 3 chồi/mẫu, chiều cao chồi cũng đạt tốt nhất 1,73 cm. Quan sát hình thái cho thấy chồi sinh trưởng xanh khỏe, cứng cáp, đường kính thân khoảng 1,00-1,50 mm. Cùng với quá trình tạo chồi, có sự hình thành callus ở mức trung bình.

Khi tăng nồng độ BAP lên 2,0 mg/L, số chồi và chiều cao trung bình của chồi đều giảm còn 1,41 chồi/mẫu và chồi cao 1,28 cm, khả năng tạo callus

yếu. Như vậy môi trường MS bổ sung 1,50 mg/L BAP là thích hợp nhất cho quá trình nhân chồi *in vitro* cây Sâm bố chính hoa đỏ.



thước 1 cm

Hình 2. Khả năng nhân chồi *in vitro* trên môi trường 1,50 mg/L BAP sau 2 tuần nuôi cấy

3.2.2. Ảnh hưởng của BAP kết hợp NAA đối với khả năng tái sinh chồi và tạo callus

Bảng 4. Ảnh hưởng của BAP 1,50 mg/L và NAA đối với khả năng tạo chồi và callus của cây Sâm bố chính hoa đỏ sau 2 tuần nuôi cấy

Nồng độ chất KTST		Số chồi/mẫu	Chiều cao chồi (cm)
BAP	NAA		
1,50	0,25	1,30 ^c	1,11 ^c
	0,50	1,85 ^b	1,49 ^b
	0,75	4,08^a	1,94^a
	1,00	2,27 ^b	1,39 ^{bc}
ĐC		1,00 ^c	1,08 ^c

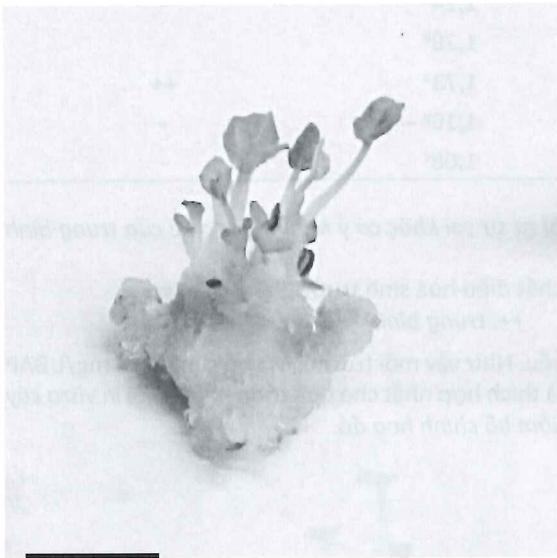
Chú thích:

- Các chữ cái khác nhau trên cùng một cột chỉ ra sự sai khác có ý nghĩa thống kê của trung bình mẫu với $p < 0,05$ (Duncan's test)
- ĐC: Môi trường cơ bản MS không bổ sung chất điều hòa sinh trưởng

Sau khi chọn được nồng độ BAP tốt nhất cho nhân chồi là 1,50 mg/L, tiến hành nghiên cứu phối hợp BAP và NAA nồng độ khác nhau để khảo sát tỷ lệ tái sinh chồi và tạo callus cây Sâm bối chính. Kết quả trình bày ở bảng 4.

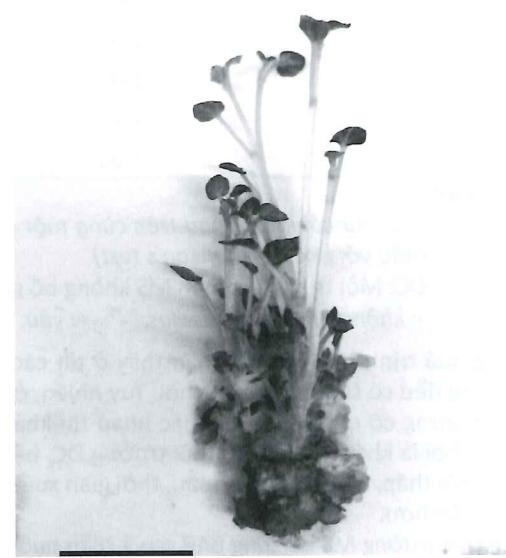
Kết quả từ bảng 4 cho thấy, khi bổ sung kết hợp BAP và NAA cho kết quả nhân chồi tốt hơn so với sử dụng riêng BAP. Mặt khác, với các nồng

độ khác nhau của NAA khả năng nhân chồi là khác nhau. Khi nâng dần nồng độ NAA từ 0,25-0,75 mg/L, khả năng nhân chồi tăng, đạt cao nhất là 4,08 chồi/mẫu trên môi trường kết hợp 1,50 mg/L BAP và 0,75 mg/L NAA, chiều cao chồi là 1,94 cm. Nếu tăng nồng độ NAA lên 1,0 mg/L thì khả năng nhân chồi giảm còn 2,27 chồi/mẫu, chiều cao chồi 1,39 cm.



Hình 3. Khả năng tạo chồi và callus trên môi trường kết hợp 1,5 mg/L BAP và 0,75 mg/L NAA sau thời gian nuôi cấy

thước 1 cm A. 1 tuần B. 3 tuần



Ngoài sự nhân chồi, khi bổ sung NAA còn gây phát sinh *callus*, kích thước *callus* tỉ lệ thuận với nồng độ NAA. *Callus* có hình thái khác nhau ở các nồng độ NAA khác nhau. Với nồng NAA cao, còn có hiện tượng phát sinh phôi. Kết quả cụ thể trình bày ở Bảng 5.

Kết quả bảng 5 cho thấy trên môi trường ĐC thì mẫu không có khả năng tạo *callus*. Khi kết hợp BAP và NAA thì sau 7 ngày nuôi cấy đã có hiện tượng phát sinh *callus*. Kết quả này phù hợp với nghiên cứu cảm ứng *callus* cây *Abelmoschus moschatus* (thuộc cùng chi Vông vang) [1].

Bảng 5. Ảnh hưởng của BAP 1,5 mg/L và NAA đối với phát sinh *callus* của cây Sâm bối chính *in vitro* sau 2 tuần nuôi cấy

BAP (mg/L)	NAA (mg/L)	Tỉ lệ tạo <i>callus</i> (%)	Hình thái <i>callus</i>	Khả năng sinh trưởng
1,50	0,25	50,5	Rắn, vàng, trắng	++
	0,50	80,00	Mọng nước, vàng, trắng	+++
	0,75	100	Xốp, vàng, xanh	++++
	1,00	100	Mọng nước, vàng, xanh	++++
ĐC		-	-	-

Chú thích: ++++: tốt; +++: khá; ++: trung bình; +: yếu; -: không hình thành

Hình 4. Phát sinh *callus*

thước 1 cm

A. *callus* phát sinh từ lá, B. *callus* phát sinh từ vết cắt của đoạn chồi



A



B

4. KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

Trên cơ sở các kết quả thu được chúng tôi rút ra kết luận: Thời gian khử trùng mầm hạt bằng $HgCl_2$ 0,10% trong 10 phút đạt hiệu quả cao nhất. Tỷ lệ tái sinh chồi cây sâm bối chính hoa đỏ cao nhất khi nuôi cấy trong môi trường MS cơ bản có 3% saccharose, 0,8% agar, bổ sung BAP nồng độ 1,5 mg/L kết hợp NAA nồng độ 0,75 mg/L (4,08 chồi/mẫu, chiều cao đạt 1,94 cm, các chồi phát triển xanh tốt, khỏe, cứng cáp). Có sự phát sinh callus khi nuôi cấy trong môi

trường kết hợp BAP với NAA ở cả lá và đoạn thân. Tỉ lệ phát sinh và kích thước callus tỷ lệ thuận với nồng độ NAA.

Trên đây là những kết quả bước đầu, để có thêm kết quả nghiên cứu một cách đầy đủ về đối tượng này chúng tôi đề nghị tiếp tục nghiên cứu nuôi cấy callus cây Sâm bối chính hoặc nghiên cứu hoàn thiện quy trình nhân giống cây Sâm bối chính ở quy mô sản xuất để tạo ra số lượng cây giống chất lượng tốt, đồng nhất.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1]. Navgire Anjali, George Indu (2010). *Micropagation from axenic seedlings of Abelmoschus moschatus Medic (Kasturi bhendi)*, *Biosciences, Biotechnology Research Asia*, 7(1), 289-295.
- [2]. Đỗ Huy Bích và cộng sự. (2004). *Cây thuốc và động vật làm thuốc ở Việt Nam, tập II*, Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật Hà Nội, trang 691
- [3]. Phan Văn Đề, Trần Công Luận, Ngô Văn Tuấn (2006). *Khảo sát hình thái - giải phẫu và thành phần hóa học các cây Sâm Bối chính mọc hoang và được trồng*, *Kỷ yếu nghiên cứu phát triển dược liệu và đông dược ở Việt Nam- Viện dược liệu*. NXB Khoa học kỹ thuật Hà Nội, tr. 89 – 90
- [4]. Phan Duy Hiệp, Nguyễn Trí Minh, Phan Xuân Huyên, Cao Đình Hùng, Đinh Văn Khiêm, Nguyễn Thị Thanh Hằng (2014). *Nghiên cứu ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng thực vật lên sự phát sinh hình thái của một số giống sâm bối chính (Hibiscus sagittifolius Kurz) trong điều kiện in vitro*, *Tạp chí Sinh học*, 36(1), tr. 266-271.
- [5]. Nguyễn Thị Thu Hương, Lương Kim Bích, Trần Công Luận, Trần Đình Hợp (2006). *Một số tác dụng được lý của Sâm bối chính và Thập tử harmand ở Lộc Ninh - Bình Phước*. *Kỷ yếu nghiên cứu phát triển dược liệu và đông dược ở Việt Nam- Viện dược liệu*. NXB Khoa học kỹ thuật, tr 90-91
- [6]. Nguyễn Hoàng Lộc (2011). *Nuôi cấy mô và tế bào thực vật*, Nhà xuất bản Đại học Huế, thành phố Huế.
- [7]. Đỗ Tất Lợi (1999). *Những cây thuốc và vị thuốc Việt Nam*, Nhà xuất bản Y học, Hà Nội, tr. 814.
- [8]. Trần Công Luận, Bùi Trần Minh Phương (2001). *Khảo sát thành phần hóa học của rễ cây sâm bối chính (Hibiscus sagittifolius Kurz. Malvaceae) trồng ở Bạc Liêu*. *Kỷ yếu Công trình khoa học (1987-2000)*. Viện Dược liệu Hà Nội.
- [9]. Toshio Murashige and Folke K. Skoog (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures, *Physiol. Plant* 15, 473_97.

Bảng 1. Thời gian lưu và diện tích píc của mẫu chuẩn, mẫu thử và mẫu giả dược

Mẫu		MP	PP	MS	ND
Chuẩn	Rt (min)	4,046	6,379	7,402	15,574
	S (mAU)	9296882	1815927	10229068	6035605
Thử	Rt (min)	4,047	6,374	7,397	15,558
	S (mAU)	9372620	1562283	10021145	5872812
Giả dược	Rt (min)	-	-	-	-
	S (mAU)	-	-	-	-

Hình 1. Sắc ký đồ mẫu chuẩn hỗn hợp (a), mẫu thử (b) và mẫu giả dược (c)

3.2. Tính tương thích hệ thống

Tiêm lặp lại 6 lần dung dịch chuẩn hỗn hợp được chuẩn bị ở **mục 3.1. Tính đặc hiệu**. Kết quả trung bình và độ lệch chuẩn tương đối của các thông số HPLC được trình bày ở bảng 2.

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

Thông số	MP	PP	MS	ND
Thời gian lưu (phút)	4,038	6,353	7,371	15,512
RSD* (%)	0,238	0,308	0,298	0,306
Diện tích píc (mAU.s)	9290288	1813592	10205162	6029185
RSD (%)	0,254	0,572	0,234	0,208
Chiều cao píc (mAU.s)	833573	124336	552073	203042
RSD (%)	0,172	0,286	0,176	0,215
Hệ số đối xứng	1,554	1,477	1,961	1,530
Số đĩa lý thuyết	3202,303	4533,186	4312,915	6695,560
Hệ số phân giải	-	6,988	2,563	13,486

*RSD: độ lệch chuẩn tương đối

3.3. Tính tuyến tính

Chuẩn bị 5 dung dịch chuẩn hỗn hợp tương tự ở **mục 3.1. Tính đặc hiệu** có nồng độ các chất thành phần từ 50 – 150% nồng độ định lượng của mẫu thử. Tiến hành sắc ký, xây dựng phương trình hồi quy biểu diễn sự phụ thuộc diện tích píc vào nồng độ. Kết quả được trình bày ở bảng 3.

Bảng 3. Kết quả khảo sát tính tuyến tính

MP		PP		MS		ND	
Nồng độ ($\mu\text{g/ml}$)	Diện tích píc (mAU.s)	Nồng độ ($\mu\text{g/ml}$)	Diện tích píc (mAU.s)	Nồng độ ($\mu\text{g/ml}$)	Diện tích píc (mAU.s)	Nồng độ ($\mu\text{g/ml}$)	Diện tích píc (mAU.s)
37,8189	4642684	8,7061	889014	624,9900	5646530	153,4693	2960059
60,5103	7464572	13,9298	1444179	999,9840	8503552	245,5509	4793670
75,6378	9250182	17,4122	1804984	1249,9800	10215423	306,9386	6011709
90,7654	11119519	20,8946	2212381	1499,9760	11860715	368,3263	7240108
113,4567	13888685	26,1183	2748841	1874,9700	14288221	460,4079	9112925
PT hồi quy: $y = 122042,3487x + 42108,3310$		PT hồi quy: $y = 107292,5507x - 48318,5793$		PT hồi quy: $y = 6886,0110x + 1495512,1655$		PT hồi quy: $y = 20029,3940x - 124099,9379$	
Hệ số R: 1,0000		Hệ số R: 0,9998		Hệ số R: 0,9992		Hệ số R: 1,0000	