

ĐÁNH GIÁ CHẤT LƯỢNG DƯỢC LIỆU CỎ NHỌ NỒI THU TẠI VIỆT NAM BẰNG PHƯƠNG PHÁP HPLC-DAD

Hoàng Thị Tuyết¹, Nguyễn Thị Phương², Phan Văn Trường¹, Nguyễn Minh Khởi¹,
Nguyễn Thị Hà Ly^{1,*}, Đỗ Thị Hà^{1,*}

¹Viện Dược liệu; ²Khoa Hóa học - Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội

*Email: hado.nimms@gmail.com hoặc nguyenthihaly.chem@gmail.com

(Nhận bài ngày 06 tháng 7 năm 2021)

Tóm tắt

Chất lượng dược liệu cỏ nhọ nồi thu tại một số vùng khác nhau ở Việt Nam được đánh giá dựa trên phân tích so sánh thành phần hóa học và hàm lượng wedelolacton bằng phương pháp HPLC-DAD. Kết quả thu được cho thấy thành phần hóa học giữa các mẫu cỏ nhọ nồi thu tại các vùng sinh thái khác nhau có sự khác biệt. Wedelolacton là thành phần hóa học chính, có trong các mẫu dược liệu cỏ nhọ nồi thu tại Việt Nam, có hàm lượng dao động trong khoảng tương đối rộng từ 0,014% đến 0,647%. Trong đó, các mẫu cỏ nhọ nồi thu tại vùng Nam Bộ có hàm lượng wedelolacton cao nhất. Kết quả phân loại các mẫu cỏ nhọ nồi bằng PCA-DA trên tập dữ liệu định tính cho thấy có sự phân nhóm tốt đối với các mẫu thu tại đồng bằng sông Hồng, Đông Bắc Bộ và Nam Bộ.

Từ khóa: Cỏ nhọ nồi, *Herba Ecliptae*, Wedelolacton, HPLC-DAD, Đánh giá chất lượng.

Summary

Quality Evaluation of *Herba Ecliptae* Cultivated in Vietnam by HPLC-DAD Method

Quality of *Herba Ecliptae* samples cultivated in Vietnam were evaluated based on non-target peaks and wedelolactone content by HPLC-DAD method. The results indicated that there are differences in the chemical compositions between the samples collected in different regions. Wedelolactone was the main chemical compound of *Herba Ecliptae* cultivated in Vietnam. The content of this compound ranged from 0.014% to 0.647%. The *Herba Ecliptae* samples collected in the Southern region had the highest content of wedelolactone. The PCA-DA method on the non-target peaks showed a fairly good classification for the samples collected in the Red River Delta, the Northeast and the South.

Keywords: *Herba Ecliptae*, Wedelolactone, HPLC-DAD, Quality evaluation.

1. Đặt vấn đề

Cỏ nhọ nồi (*Eclipta prostrata* L.) là một dược liệu phổ biến có nguồn gốc lâu đời ở Việt Nam, được dùng với nhiều công dụng như bổ máu, cầm máu, chống viêm, bổ gan thận, làm thuốc mọc tóc [1],[4],[9]. Các nghiên cứu trong và ngoài nước đã cho thấy các tác dụng kể trên là nhờ vào hoạt chất chính trong cây cỏ nhọ nồi là wedelolacton. Wedelolacton là một hoạt chất đầy tiềm năng trong việc phòng và trị bệnh như chống độc gan, chống ung thư, chống oxy hóa, cải thiện tình trạng gan nhiễm mỡ [7],[8]. Hợp chất này được Dược điển Trung Quốc (2015) và Dược điển Hồng Kông quy định làm tiêu chí đánh giá chất lượng của dược liệu cỏ nhọ nồi [2],[3]. Trong khi đó, chuyên luận cỏ nhọ nồi trong Dược điển Việt Nam V gồm một số chỉ tiêu như mô tả, vi phẫu, bột, định tính, độ ẩm, độ tro, hàm lượng chất chiết được trong dược liệu [1]. Chuyên luận này chưa có chỉ tiêu định lượng hoạt chất, vì vậy chưa giúp kiểm soát chặt chẽ chất lượng dược liệu cỏ nhọ nồi. Nhằm cung cấp thêm cơ sở khoa học về chất lượng dược liệu cỏ

nhọ nồi ở Việt Nam, chúng tôi tiến hành thu thập mẫu cỏ nhọ nồi ở các vùng khác nhau của Việt Nam, phân tích thành phần wedelolacton trong các mẫu thu thập được. Kết quả thu được nhằm gợi ý nâng cấp chuyên luận dược liệu cỏ nhọ nồi trong Dược điển Việt Nam.

2. Nguyên liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Nguyên liệu

Dược liệu nghiên cứu là các mẫu cỏ nhọ nồi (*Eclipta prostrata* L.) được thu hái từ một số vùng trên cả nước vào tháng 2-4/2021. Tại mỗi điểm thu mẫu, nhóm nghiên cứu thu 02 mẫu. Tổng số mẫu thu được là 72 mẫu trên 36 điểm thu mẫu của 12 tỉnh thuộc 04 vùng sinh thái gồm đồng bằng sông Hồng (ĐBSH), Đông Bắc Bộ (ĐBB), Bắc Trung Bộ (BTB) và Nam Bộ (NB). Mẫu nghiên cứu được giám định tên khoa học là *Eclipta prostrata* L. bởi Khoa Tài nguyên dược liệu, Viện Dược liệu. Các mẫu sau khi thu hái được sấy khô ở 50°C, lấy khoảng 30g mẫu khô, nghiền thành bột mịn dùng cho nghiên cứu. Thông tin mẫu được trình bày trong Bảng 1.

Bảng 1. Thông tin các mẫu cỏ nhọ nồi dùng cho nghiên cứu

Ký hiệu	Địa điểm thu hái (n=2)	Ký hiệu	Địa điểm thu hái (n=2)
CNN1	Xuân Trường- Nam Định (Điểm 1)	CNN19	Phan Đình Phùng - Mỹ Hào - Hưng Yên
CNN2	Xuân Trường- Nam Định (Điểm 2)	CNN20	Yên Mô - Ninh Bình
CNN3	Vụ Bản- Nam Định	CNN21	Tam Điệp - Ninh Bình
CNN4	Nam Tiền - Nam Trực - Nam Định	CNN22	Hoa Lư - Ninh Bình
CNN5	Nam Cường- Nam Trực - Nam Định (Điểm 1)	CNN23	Bình Liêu - Quảng Ninh (Điểm 1)

CNN6	Nam Cường-Nam Trực - Nam Định (Điểm 2)	CNN24	Bình Liêu - Quảng Ninh (Điểm 2)
CNN7	Nam Cường-Nam Trực - Nam Định (Điểm 3)	CNN25	Thái Đào - Lạng Giang - Bắc Giang (Điểm 1)
CNN8	Nam Cường-Nam Trực - Nam Định (Điểm 4)	CNN26	Thái Đào - Lạng Giang - Bắc Giang (Điểm 2)
CNN9	Nam Dương- Nam Trực- Nam Định	CNN27	Yên Dũng - Bắc Giang
CNN10	Quỳnh Phụ - Thái Bình (Điểm 1)	CNN28	Hoàng Hóa - Thanh Hóa
CNN11	Quỳnh Phụ - Thái Bình (Điểm 2)	CNN29	Sầm Sơn - Thanh Hóa
CNN12	Vân Côn - Hoài Đức - Hà Nội (Điểm 1)	CNN30	Vinh - Nghệ an
CNN13	Vân Côn - Hoài Đức - Hà Nội (Điểm 2)	CNN31	Cẩm Xuyên - Hà Tĩnh
CNN14	Phú Phương- Ba Vì- Hà Nội (Điểm 1)	CNN32	Bình Chánh - Tp, HCM (Điểm 1)
CNN15	Phú Phương- Ba Vì - Hà Nội (Điểm 2)	CNN33	Bình Chánh - Tp, HCM (Điểm 2)
CNN16	Phú Châu - Ba Vì - Hà Nội (Điểm 3)	CNN34	Bình Tân - Tp, HCM
CNN17	Hùng An - Kim Động - Hưng Yên	CNN35	Châu Thành - Tiền Giang (Điểm 1)
CNN18	Phương Chiếu - Hưng Yên	CNN36	Châu Thành - Tiền Giang (Điểm 2)

2.2. Dung môi, hóa chất

Chất chuẩn wedelolacton của hãng Biopurify (Trung Quốc), CAS 524-12-9, số Lô BP1451, có độ tinh khiết $\geq 98\%$.

Các dung môi, hóa chất sử dụng đều là hoá chất tinh khiết phân tích (PA), được mua của hãng Merck (Đức) hoặc tương đương.

2.3. Thiết bị

Thiết bị chính dùng trong nghiên cứu là hệ thống HPLC (Shimadzu, Nhật Bản) gồm bơm LC-20AD, bộ tiêm mẫu tự động SIL-20AHT, detector DAD, phần mềm Labsolution để truy xuất hình ảnh và số liệu từ hệ thống.

2.4. Phương pháp nghiên cứu

2.4.1. Phát triển phương pháp HPLC-DAD định lượng wedelolacton trong dược liệu cỏ nhọ nổi:

* Lựa chọn quy trình xử lý mẫu và điều kiện phân tích sắc ký: tham khảo chuyên luận cỏ nhọ nổi (*Eclipta Herba*) trong Dược điển Trung Quốc (2015) [2].

- Dung dịch mẫu thử: Cân chính xác khoảng 1g bột mẫu thử vào bình cầu. Thêm chính xác 50 mL ethanol 70%, cân xác định khối lượng bình. Chiết hồi lưu trong một 1 giờ. Để nguội về nhiệt độ phòng, cân và bổ sung khối lượng đã mất bằng ethanol 70%. Lọc thụ được dung dịch mẫu thử.

- Dung dịch chuẩn: Cân chính xác khoảng 5,0 mg wedelolacton vào bình định mức 5 mL. Thêm 3 mL dung dịch ethanol 70%, siêu âm cho tan hết, bổ sung bằng ethanol 70% đến vạch mức. Tiến hành pha loãng thu được dãy dung dịch chuẩn có nồng độ 5, 10, 20, 40, 80, 120 $\mu\text{g/mL}$.

- Điều kiện sắc ký: cột *silica gel* pha đảo C_{18} (250 x 4,6 mm, 5 μm); pha động gồm acid acetic 0,5% và methanol; bước sóng phát hiện 350 nm; tốc độ dòng 0,8 mL/phút, thể tích tiêm mẫu: 10 μL . Chương trình gradient như Bảng 2.

Bảng 2. Chương trình gradient

Thời gian (phút)	Methanol (%)	Acid acetic 0,5% (%)
0-10	35-59	65-41
10-20	59	41
30	Kết thúc	

* Thẩm định phương pháp phân tích: theo hướng dẫn ICH gồm các tiêu chí đánh giá: độ đặc hiệu, tính tuyến tính, tính thích hợp của hệ thống, giới hạn phát hiện và giới hạn định lượng, độ lặp lại, độ đúng [6].

2.4.2. Phân tích hàm lượng wedelolacton trong các mẫu dược liệu cỏ nhọ nổi thu thập được:

Áp dụng phương pháp phân tích xây dựng được và phương pháp quy định để đánh giá hàm lượng wedelolacton có trong các mẫu dược liệu cỏ nhọ nổi. Công thức tính hàm lượng wedelolacton theo phương pháp HPLC-DAD như sau:

$$\text{Hàm lượng (\%)} = \frac{C \times 50 \times 100 \times 100}{m \times (100 - B) \times 10^6}$$

Trong đó: C: nồng độ của wedelolacton trong dung dịch mẫu thử ($\mu\text{g/mL}$) tính từ đường chuẩn; m: khối lượng cân mẫu thử (g); B: độ âm của mẫu thử (%).

2.4.3. Phân loại nguồn gốc dược liệu cỏ nhọ nổi bằng phương pháp thống kê PCA-DA [10],[11]:

PCA-DA là một phương pháp thống kê thường được sử dụng để phân nhóm các mẫu trong một tập mẫu. Kết quả phân nhóm với nhóm mẫu “luyện” được hiển thị dưới dạng đồ thị. Kết quả kiểm tra mô hình phân nhóm được hiển thị dưới dạng đồ thị và có độ chính xác cụ thể.

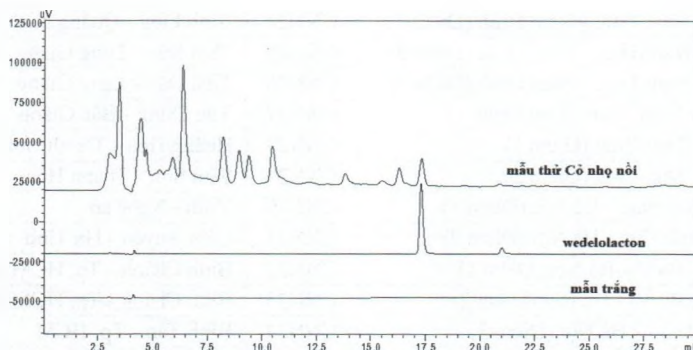
3. Kết quả nghiên cứu

3.1. Phát triển phương pháp HPLC-DAD định lượng wedelolacton trong dược liệu cỏ nhọ nổi

3.1.1. Lựa chọn điều kiện phân tích sắc ký:

Sắc ký đồ HPLC phân tích wedelolacton trong cỏ nhọ nổi theo điều kiện phân tích áp dụng

Áp dụng điều kiện phân tích sắc ký như đã trình bày trong mục 2.4.1 thu được kết quả như Hình 1 và Bảng 3.



Hình 1. Sắc ký đồ HPLC-DAD phân tích wedelolacton trong dược liệu cỏ nhọ nổi

Bảng 3. Thông số pic của wedelolacton

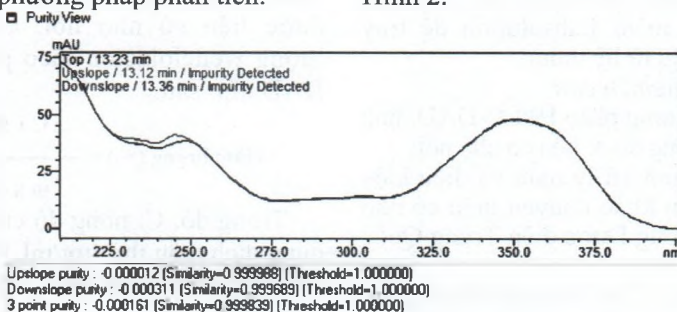
Pic	Thời gian lưu (phút)	Độ phân giải (Rs)	Hệ số kéo đuôi pic	Số đĩa lý thuyết
Wedelolacton	17,5	1,675	1,102	23713

Trên sắc ký đồ thu được cho thấy, thời gian lưu của wedelolacton ở mẫu thử và mẫu chuẩn là tương đương nhau $t_R = 17,5$ phút, pic wedelolacton không bị trùng với các pic khác, mẫu trắng không cho tín hiệu tại cùng thời gian lưu với mẫu chuẩn, chứng tỏ điều kiện phân tích lựa chọn phù hợp để phân tích wedelolacton trong mẫu dược liệu cỏ nhọ nổi.

3.1.2. Thẩm định phương pháp phân tích:

• Độ đặc hiệu (tính chọn lọc) của phương pháp

Tiến hành phân tích 3 mẫu: dung dịch wedelolacton chuẩn, dung dịch mẫu thử, dung dịch mẫu trắng với điều kiện phân tích HPLC đã trình bày ở trên, sắc ký đồ thu được như Hình 2. Phổ UV đánh giá độ tinh khiết của pic wedelolacton trong mẫu thử được trình bày trong Hình 2.



Hình 2. Phổ UV đánh giá độ tinh khiết của pic wedelolacton trong mẫu thử

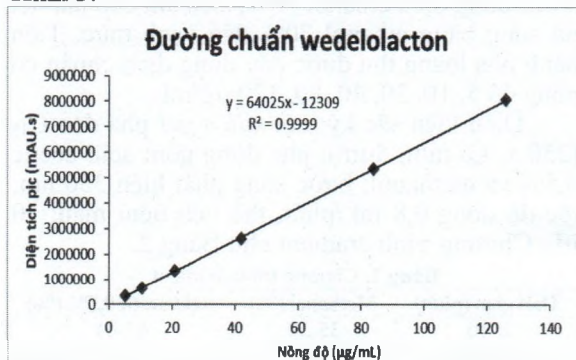
Kết quả thu được cho thấy tín hiệu pic của wedelolacton trong mẫu thử có độ tinh khiết pic cao (dựa trên so sánh phổ UV của pic tại 3 điểm), hệ số phù hợp $> 0,999$, chứng tỏ phương pháp phân tích đạt yêu cầu về độ đặc hiệu.

• Xây dựng đường chuẩn

Bảng 4. Quan hệ tuyến tính giữa nồng độ và diện tích của pic wedelolacton

Nồng độ ($\mu\text{g/mL}$)	Diện tích pic (mAU.s)	Nồng độ tính lại từ đường chuẩn ($\mu\text{g/mL}$)	Độ lệch (%) giữa nồng độ tính lại và nồng độ thực
126	8076634	126,34	0,27
84	5355277	83,83	0,19
42	2618290	41,08	2,17
21	1354550	21,34	1,66
10,5	656357	10,44	0,53
5,2	352114	5,69	8,41

Chuẩn bị một dãy gồm dung dịch chuẩn wedelolacton có nồng độ tăng dần từ $5,25 \mu\text{g/mL}$ đến $126 \mu\text{g/mL}$ (Bảng 4), rồi tiến hành phân tích HPLC-DAD với các điều kiện như đã trình bày ở trên. Đường chuẩn xây dựng được trình bày trong Hình 3.



Hình 3. Đường chuẩn biểu diễn mối quan hệ giữa nồng độ wedelolacton và diện tích pic

• Tính thích hợp hệ thống

Tiến hành phân tích HPLC-DAD 6 lần phân tích lặp lại cùng một mẫu chuẩn wedelolacton có nồng độ 10,5 µg/mL. Kết quả được trình bày trong Bảng 5.

• Độ lặp lại trong ngày và khác ngày

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 được trình bày trong Bảng 5.

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

Phân tích mẫu thử đã được xác định nồng độ wedelolacton, sau đó pha loãng dần đến khi trên

sắc ký đồ của dung dịch thử, tại thời gian lưu của wedelolacton, xác định được tỷ lệ S/N=2-3 và S/N= 9-11. Từ đó tìm được LOD và LOQ. Kết quả được trình bày trong Bảng 5.

• Độ đúng

Độ đúng được đánh giá thông qua hiệu suất thu hồi và được xác định bằng phương pháp thêm chuẩn ở 3 mức khoảng 80%, 100% và 120% so với hàm lượng của wedelolacton trong mẫu được liệu cô nhỏ nôi. Phân tích mẫu thêm chuẩn, mẫu không thêm chuẩn, xác định lượng chất chuẩn thêm vào tính theo thực nghiệm. So sánh giá trị lượng chất chuẩn thêm vào theo lý thuyết và theo thực nghiệm, xác định hiệu suất thu hồi. Kết quả được trình bày trong Bảng 5.

Bảng 5. Kết quả thẩm định phương pháp HPLC-DAD phân tích wedelolacton trong dược liệu cô nhỏ nôi

TT	Đánh giá	Thực nghiệm	Kết quả
1	Tính thích hợp của hệ thống	Phân tích lặp lại 6 lần dung dịch chuẩn trên hệ thống HPLC-DAD	RSD (tr) = 0,29 % RSD (S) = 0,78 %
2	Độ chính xác trong ngày	Phân tích lặp lại một mẫu thử trong 1 ngày (6 lần)	RSD (hàm lượng %) = 3,37 %
	Độ chính xác khác ngày	phân tích lặp lại một mẫu thử trong 2 ngày (6 lần/ngày)	RSD (hàm lượng %) = 3,76 %
3	Hiệu suất thu hồi	Phương pháp thêm chuẩn	91,15-103,64 %
4	LOD (µg/mL)	Xác định theo qui tắc dựa trên tỷ lệ tín hiệu/nhiều	0,05
5	LOQ (µg/mL)	(S/N)	0,15

3.2. Phân tích hàm lượng wedelolacton trong các mẫu dược liệu cô nhỏ nôi thu thập được

Tiến hành xác định hàm lượng wedelolacton có trong các mẫu dược liệu cô nhỏ nôi thu thập được. Kết quả trình bày trong Bảng 6.

Bảng 6. Kết quả phân tích hàm lượng wedelolacton trong các mẫu cô nhỏ nôi (n=2)

Khu vực	Địa điểm thu hái	Hàm lượng wedelolacton trung bình (%)	Khu vực	Địa điểm thu hái	Hàm lượng wedelolacton trung bình (%)
Đồng bằng sông Hồng (ĐBSH)	CNN1	0,102	Đồng bằng sông Hồng (ĐBSH)	CNN19	0,054
	CNN2	0,073		CNN20	0,014
	CNN3	0,085		CNN21	0,024
	CNN4	0,039		CNN22	0,159
	CNN5	0,054	Đông Bắc Bộ (ĐBB)	CNN23	0,105
	CNN6	0,032		CNN24	0,093
	CNN7	0,076		CNN25	0,100
	CNN8	0,083		CNN26	0,089
	CNN9	0,082		CNN27	0,043
	CNN10	0,027	Bắc Trung Bộ (BTB)	CNN28	0,025
	CNN11	0,049		CNN29	0,143
	CNN12	0,098		CNN30	0,048
	CNN13	0,085		CNN31	0,121
	CNN14	0,063	Nam Bộ (NB)	CNN32	0,040
	CNN15	0,075		CNN33	0,516
	CNN16	0,070		CNN34	0,349
	CNN17	0,205		CNN35	0,647
	CNN18	0,062		CNN36	0,646

Kết quả thu được cho thấy, hàm lượng wedelolacton trong các mẫu cỏ nhọ nội dao động trong khoảng tương đối rộng từ 0,014 đến 0,647%. Trong đó, các mẫu cỏ nhọ nội thu tại khu vực ĐBSH dao động trong khoảng 0,014 - 0,213%. Các mẫu cỏ nhọ nội thu tại khu vực ĐBB dao động từ 0,092 đến 0,109%. Các mẫu thu tại khu vực BTB có hàm lượng wedelolacton dao động từ 0,024 đến 0,148%. Các mẫu thu tại vùng NB có hàm lượng wedelolacton từ 0,040% đến 0,647%. Nhìn chung, các mẫu cỏ nhọ nội thu tại vùng NB có hàm lượng wedelolacton cao hơn các vùng còn lại, cụ thể mẫu thu tại Châu Thành, Tiền Giang có hàm lượng wedelolacton cao nhất (0,647%).

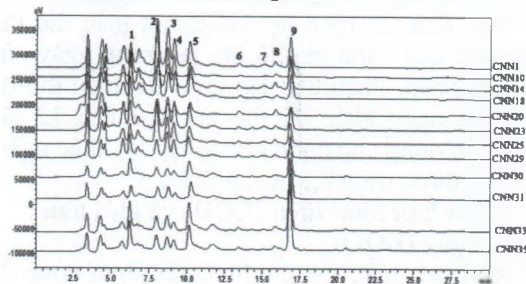
3.3. Phân loại nguồn gốc dược liệu cỏ nhọ nội bằng phương pháp thống kê PCA-DA

Từ sắc ký đồ phân tích 72 mẫu dược liệu cỏ nhọ nội, tiến hành thu nhận dữ liệu (diện tích pic) của một số pic chính (ký hiệu từ 1 đến 9, xem Hình 4).

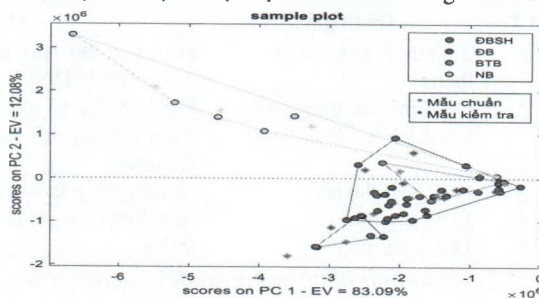
Sau khi thu nhận tín hiệu pic định tính của 72 mẫu dược liệu cỏ nhọ nội, chia bộ số liệu thành 2 nhóm: Nhóm luyện (xây dựng mô hình phân loại) gồm 48 mẫu (29 mẫu ĐBSH, 7 mẫu ĐBB, 5 mẫu BTB, 7 mẫu NB) và Nhóm kiểm tra (để kiểm chứng độ chính xác của mô hình phân loại) gồm 24 mẫu (15 mẫu ĐBSH, 3 mẫu ĐBB, 3 mẫu BTB, 3 mẫu NB). Kết quả thực hiện thuật toán PCA-DA với 48 mẫu xây dựng mô hình phân loại cho thấy, ứng với thuật toán PCA-DA, số PC là 5 phù hợp nhất (có phần trăm phương sai lớn nhất và độ chính xác đạt trên 90%). Vì vậy chúng tôi lựa

chọn mô hình PCA-DA với số cấu tử (PC) là 5 để xây dựng mô hình nhận dạng mẫu.

Để kiểm tra độ chính xác của mô hình phân loại, chúng tôi tiến hành phân tích bộ dữ liệu của 24 mẫu thuộc Nhóm kiểm tra. Kết quả được trình bày trong Hình 5 và Bảng 7.



Hình 4. Sắc ký đồ HPLC phân tích định tính một số mẫu dược liệu cỏ nhọ nội đại diện các điểm và vùng thu mẫu



Hình 5. Kết quả phân tích PCA-DA với 48 mẫu luyện và 24 mẫu kiểm tra

Bảng 7. Kết quả phân loại 24 mẫu kiểm tra

Tên vùng	ĐBSH	ĐB	BTB	NB	Không nhận dạng được
ĐBSH	14 (đúng)	1 (sai)	0	0	0
ĐB	0	3 (đúng)	0	0	0
BTB	3 (sai)	0	0	0	0
NB	0	0	0	3 (đúng)	0

Kết quả thu được cho thấy, 100% các mẫu kiểm tra đều nhận dạng được. Trong 15 mẫu ĐBSH thì mẫu HN1 nhận diện sai vào nhóm Đông Bắc (tương ứng độ chính xác 93,33%), 3 mẫu ĐB và 3 mẫu NB nhận diện đúng 100%. Tuy nhiên, mô hình này chưa phù hợp để phân loại được các mẫu BTB, cả 3 mẫu BTB đều gán vào nhóm ĐBSH, điều này có thể do các thông tin sử dụng để phân loại chưa phản ánh được sự khác biệt giữa các mẫu thuộc nhóm BTB và nhóm ĐBSH.

4. Bàn luận

Cỏ nhọ nội là một dược liệu phổ biến, được sử dụng nhiều trong các bài thuốc dân gian. Cỏ nhọ nội được trồng trên khắp cả nước từ Bắc đến Nam, vì vậy nguồn gốc và chất lượng dược liệu cỏ nhọ nội cũng rất đa dạng. Dược điển Việt Nam V đã có chuyên luận về vị thuốc này, nhưng

chưa có chỉ tiêu định lượng hoạt chất. Tham khảo Dược điển các nước khác như Trung Quốc, Hồng Kông và các nghiên cứu đã công bố cho thấy wedelolacton là hoạt chất chính trong cỏ nhọ nội. Kết quả phân tích 72 mẫu cỏ nhọ nội thu hái ở Việt Nam cho thấy các mẫu này đều có wedelolacton với hàm lượng dao động trong khoảng lớn 0,014 đến 0,647%. Dược điển Hồng Kông đã quy định hàm lượng wedelolacton không dưới 0,043%, Dược điển Trung Quốc quy định hàm lượng wedelolacton không dưới 0,04%, tham chiếu theo hai chuyên luận Dược điển này cho thấy 6 mẫu cỏ nhọ nội không đạt yêu cầu về chất lượng. Kết quả nghiên cứu này có giá trị nhất định trong việc bổ sung chỉ tiêu về hàm lượng hoạt chất wedelolacton trong dược liệu cỏ nhọ nội ở Việt Nam vào Chuyên luận Dược Điển

Việt Nam V trong tương lai cũng như góp một phần nhỏ trong định hướng vùng trồng cho hàm lượng hoạt chất cao.

Việc sử dụng các phương pháp xử lý thông kê để phân loại nguồn gốc mẫu hiện được nhiều nghiên cứu thực hiện trên các đối tượng dược liệu. Phương pháp PCA-DA là một thuật toán phổ biến trong phân loại mẫu, với ưu điểm là kết quả hiển thị dưới dạng đồ thị và có độ chính xác cụ thể. Với 72 mẫu dược liệu cỏ nhọ nồi, kết quả thu được cho thấy PCA-DA có thể xây dựng và phát triển thành một bộ công cụ để kiểm tra nguồn gốc của mẫu cỏ nhọ nồi. Độ chính xác của phương pháp có thể được cải thiện khi tăng số mẫu dùng để xây dựng mô hình.

5. Kết luận

Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã đánh giá được chất lượng của dược liệu cỏ nhọ nồi thu tại

một số vùng ở Việt Nam. Kết quả phân tích cho thấy wedelolacton là thành phần chính có trong cỏ nhọ nồi ở Việt Nam với khoảng biến thiên hàm lượng rộng từ 0,014% đến 0,647%. Trong đó, các mẫu cỏ nhọ nồi thu tại vùng Nam Bộ có hàm lượng wedelolacton cao hơn các vùng khác. Kết quả phân tích thống kê PCA-DA trên tập dữ liệu định tính cho thấy có sự phân loại tốt đối với các mẫu cỏ nhọ nồi thu tại Đồng bằng sông Hồng, Đông Bắc và Nam Bộ, chứng tỏ PCA-DA có thể xây dựng và phát triển thành một bộ công cụ để kiểm tra nguồn gốc của mẫu cỏ nhọ nồi.

Lời cảm ơn: Nhóm tác giả chân thành cảm ơn Viện Dược liệu đã tài trợ kinh phí để thực hiện nghiên cứu trong khuôn khổ đề tài cấp Viện Dược liệu-2021, đề tài "Nghiên cứu chất lượng một số dược liệu Việt Nam".

Tài liệu tham khảo

1. Bộ Y Tế (2017), Dược điển Việt Nam V, *NXB Y Học*.
2. Chinese Pharmacopoeia Commission (2015), Pharmacopoeia of the people's republic of China, *Ecliptae Herba*, Vol. 1A, pp.89.
3. Hong Kong Chinese Materia Medica Standards, *Ecliptae Herba*, Vol. 4, pp.158-166.
4. Viện Dược liệu (2006), Cây thuốc và động vật làm thuốc ở Việt Nam, *NXB Khoa học và Kỹ thuật*, tập II, tr. 463 - 467.
5. Nguyễn Minh Túy, Phan Hiền Lương, Ngô Thanh Hòa (2015), Nghiên cứu định lượng wedelolacton trong cao khô dược liệu cỏ nhọ nồi bằng phương pháp HPLC, *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Việt Nam*, 2(8), 56-59.
6. ICH (1996), Validation of Analytical Procedures: Text and methodology, *ICH Harmonised Tripartite Guideline*.
7. Benes P., Knopfova L., Trcka F., Nemajerova A., Pinheiro D., Soucek K. and Fojta M., (2011), Inhibition of topoisomerase II α : novel function of wedelolactone, *Cancer Letters*, 303(1), 29-38.
8. Lirdprapamongkol K., Kramb J. P., Chokchaichamnankit D., Srisomsap C., Surait R., Sila-Asna M., Bunyaratvej A., Dannhardt G., Svasti J. (2008), Juice of *Eclipta prostrata* inhibits cell migration *in vitro* and exhibits anti-angiogenic activity *in vivo*, *In vivo*, 22(3), 363-368.
9. Tewtrakul S., Subhadhirasakul S., Cheenpracha S., Karalai C. (2007), HIV-1 protease and HIV-1 integrase inhibitory substances from *Eclipta prostrata*, *Phytotherapy Research*, 21(11), 1092-1095.
10. Trần Quang Khánh (2013), Matlab ứng dụng Tập 1+2, *NXB khoa học và kỹ thuật*.
11. Karabagias I. K., Louppis A. P., Karabournioti S., Kontakos S., Papastephanou C., Kontominas M. G. (2017), Characterization and geographical discrimination of commercial *Citrus spp.* honeys produced in different Mediterranean countries based on minerals, volatile compounds and physicochemical parameters using chemometrics, *Food Chemistry*, 217, 445-455.

Tạp chí Dược liệu, tập 26, số 4/2021 (Trang 245 - 250)

ĐỊNH LƯỢNG SOPHORICOSID TRONG CAO ĐẶC HÒE GIÁC BẰNG SẮC KÝ LỎNG HIỆU NĂNG CAO

Bùi Hồng Cường, Nguyễn Thị Hoài*

Đại học Dược Hà Nội

*Email: cuongbh@hup.edu.vn

(Nhận bài ngày 26 tháng 5 năm 2021)

Tóm tắt

Cao đặc hòe giác được bào chế từ vị thuốc hòe giác bằng phương pháp chiết nóng với hỗn hợp ethanol-nước. Sophoricosid là hoạt chất chính của hòe giác đã được định lượng trong dược liệu và một số chế phẩm nhưng chưa có phương pháp định lượng trong cao đặc. Bài báo trình bày kết quả xây dựng và thẩm định phương pháp định lượng sophoricosid trong cao đặc hòe giác bằng HPLC: Cột phân tích C₁₈ (250 mm x 4,6 mm, 5 μ m), bước sóng phát hiện: 260 nm, tốc độ dòng: 1 mL/phút, nhiệt độ cột: 40°C, pha động acetonitril : methanol : acid phosphoric 0,07% (20:12:68, v/v). Phương pháp phân tích có độ nhạy cao, có tính đặc hiệu, khoảng tuyến tính từ 6,74 đến 215,57 μ g/mL ($r = 1$), độ lặp lại và độ chính xác trung gian tốt (RSD < 2,7%), độ đúng cao (tỷ lệ phục hồi 99,19% đến 101,07%). Hàm lượng sophoricosid trong cao đặc hòe giác từ 3,34% đến 9,10%.

Từ khóa: Hòe giác, Cao đặc, Sophoricosid, SPH, HPLC.

Summary

Quantitative Determination of Sophoricoside in the Fructus Sophorae Semisolid Extracts by HPLC

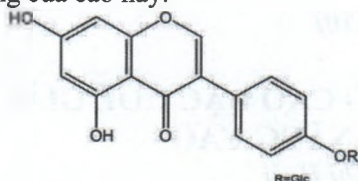
An HPLC method was proposed for quantification of sophoricoside in the Fructus Sophorae semisolid extracts (Extractum spissum), which is prepared from Fructus Sophorae by hot extraction with mix of ethanol and water. The chromatography was established as: Using the C₁₈ (250 mm x 4.6 mm, 5 μ m) column; The UV detector was set at 260 nm; The mobile phase consisted of acetonitrile - methanol - 0.07% phosphoric acid solution (20:12:68, v/v); Flow rate was 1 mL/min; The

column temperature was set at 40°C; Injection volume was 10 μ L. The method was validated for the specificity (RSD of peak area = 0.04%; RSD of t_R = 0.05%); linearity ranging from 6.74 - 215.57 μ g/mL ($r = 1$), precision (RSD < 2.7%) and accuracy (recovery: 99.19% - 101.07 %). As for practical application, the tested samples showed the content of sophoricoside ranging from 3.34% to 9.10%.

Keywords: *Fructus Sophorae, Semisolid extract, Sophoricoside, SPH, HPLC.*

1. Đặt vấn đề

Hòe giác là quả chín phơi hoặc sấy khô của cây hòe (*Sophora japonica* L.), được thu hoạch vào mùa thu [1]. Vị thuốc hòe giác đã được sử dụng trong Y Dược học cổ truyền, có công năng thanh nhiệt giải hỏa, lương huyết chỉ huyết, chủ trị nhiệt đường ruột gây đại tiện ra huyết, trĩ xuất huyết, can nhiệt gây đau đầu, chóng mặt, mắt đỏ [1]. Cao đặc được bào chế từ vị thuốc này là bán thành phẩm để tiếp tục bào chế một số sản phẩm. Việc nghiên cứu tiêu chuẩn hoá và xác định được hàm lượng hoạt chất trong cao đặc là cần thiết. Sophoricosid (SPH) là một isoflavon glycosid (Hình 1), thành phần hoạt chất chính của hòe giác, có tác dụng chống viêm [2],[3], chống viêm dị ứng [4], chống oxy hóa và bảo vệ gan [5]... Vì vậy việc xác định hàm lượng của SPH có ý nghĩa quan trọng trong công tác kiểm tra chất lượng cao đặc hòe giác và các chế phẩm. Một số tài liệu đã công bố phương pháp định lượng SPH trong dược liệu hòe giác [1],[6] và trong chế phẩm [1],[7] nhưng chưa có nghiên cứu định lượng chất này trong dạng cao đặc dược liệu. Nghiên cứu này được thực hiện nhằm xây dựng phương pháp định lượng bằng sắc ký lỏng hiệu năng cao và xác định hàm lượng SPH trong cao đặc dược liệu hòe giác làm căn cứ để xây dựng Tiêu chuẩn chất lượng của cao này.



Hình 1. Công thức cấu tạo của sophoricosid

2. Nguyên liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Nguyên liệu

Vị thuốc hòe giác được Công ty cổ phần dược phẩm VCP cung cấp đạt tiêu chuẩn Dược điển Trung Quốc 2015 [1].

Cao đặc hòe giác được chiết từ vị thuốc hòe giác với dung môi nước và ethanol 30%, 50%, 70% và 96% bằng phương pháp đun sôi trong thiết bị chiết lắp sinh hàn hồi lưu, tỷ lệ dung môi/dược liệu = 8 mL/g, chiết 2 lần x 120 phút. Lọc, gộp dịch lọc, cất thu hồi dung môi dưới áp suất giảm bằng máy cô quay chân không đến thể chất lỏng sánh, tiếp tục cô cách thủy ở 80°C đến thể chất cao đặc (độ ẩm < 20%).

2.2. Hoá chất, chất chuẩn

Chất chuẩn SPH ($C_{21}H_{20}O_{10}$) hàm lượng 99,34% (Xinyang Zhongjian Metrology Biological Technology Co., Ltd., Lot No. 200419). Methanol, acetonitril, acid phosphoric đạt tiêu chuẩn tinh khiết phân tích dùng cho HPLC (Merck), nước tinh khiết dùng cho HPLC.

2.3. Thiết bị, dụng cụ

Máy sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) (Shimadzu, Nhật Bản) bao gồm: Bơm LC-30AD, detector mảng diod (DAD) SPD-M20A, hệ thống tiêm mẫu tự động SIL-20A, bộ phận ổn nhiệt CTO-10AS của Shimadzu, cột sắc ký Shim-pack GIST C_{18} ; Bể siêu âm WUC-D22H (Daihan Scientific, Hàn Quốc); Cân phân tích AND GR200 (A&D, Nhật Bản) độ chính xác 0,1 mg; Cân phân tích Mettler Toledo XPE105 (Mettler Toledo, Thụy Sĩ) độ chính xác 0,01 mg; Hệ thống lọc chân không, màng lọc 0,45 μ m x 47 mm Supelco (Mỹ), màng lọc syringe 0,45 μ m Shimadzu (Shimadzu, Nhật Bản), lọ đựng mẫu (vial) 1,5 mL Shimadzu (Shimadzu, Nhật Bản); Tủ sấy Memmert (Mettmert, Đức); Các dụng cụ thủy tinh: Bình gạn, bình nón, bình định mức, cốc thủy tinh... và các dụng cụ khác tại phòng thí nghiệm đạt yêu cầu chính xác dùng trong phân tích.

2.4. Phương pháp nghiên cứu

Xác định độ ẩm của cao đặc: Phương pháp xác định mất khối lượng do làm khô [8]: Cân chính xác khoảng 1,0000 g cao, sấy ở 105°C trong 5 h. Cân lại. Tính độ ẩm của cao theo công thức:

$$H(\%) = \frac{m_0 - m_1}{m_0} \times 100$$

Trong đó: m_0 , m_1 : Khối lượng cao trước và sau sấy.

Chuẩn bị mẫu:

Dung môi: Dung dịch methanol 50%.

Dung dịch chuẩn: Cân chính xác 2,17 mg chất chuẩn SPH (hàm lượng 99,34%) cho vào bình định mức 10 mL, thêm khoảng 8 mL methanol 50%, siêu âm cho tan hết và thêm vừa đủ đến vạch bằng methanol 50% thu được dung dịch chuẩn gốc có nồng độ 215,57 μ g/mL. Từ dung dịch chuẩn gốc này pha dãy chuẩn có nồng độ trong khoảng: 6,74-215,57 μ g/mL.

Dung dịch thử: Cân chính xác khoảng 0,1000 g cao (cao đặc hòe giác chiết ethanol 70%) vào bình nón có nút mài 50 mL, thêm chính xác 25

mL methanol 50%, cân, siêu âm trong 30 phút. Để nguội. Cân lại, bổ sung khối lượng mất đi bằng methanol 50%. Lắc đều thu được dung dịch thử A, hút chính xác 1 mL cho vào bình định mức 5 mL, thêm methanol 50% vừa đủ đến vạch. Lắc đều. Lọc qua màng lọc syringe 0,45 μ m thu được dung dịch thử B để tiêm sắc ký.

Dung dịch thử B thêm chuẩn: Hút 1 mL dung dịch thử B cho vào lọ đựng mẫu, thêm 0,25 mL dung dịch chuẩn gốc, lắc đều.

Dung dịch thử 50% thêm chuẩn: Cân chính xác khoảng 0,1000 g cao vào bình nón nút mài dung tích 50 mL. Tiến hành xử lý mẫu như đối với mẫu thử đến dung dịch thử A. Lấy 10 mL dung dịch thử A pha loãng bằng 10 mL methanol 50% được dung dịch thử 50%. Cân chính xác 1,47 mg chất chuẩn SPH (hàm lượng 99,34%) cho vào bình định mức 20 mL, thêm khoảng 15 mL methanol 50%, siêu âm cho tan hết và thêm vừa đủ đến vạch bằng methanol 50% thu được dung dịch chuẩn có nồng độ 73,01 μ g/mL. Hút chính xác 1 mL dung dịch thử 50% cho vào bình định mức 5 mL, thêm chuẩn để thu được dung dịch định lượng ở 3 mức khoảng 75%, 100% và 125% so với nồng độ của SPH trong dung dịch thử B bằng cách thêm chính xác tương ứng 1 mL, 2 mL và 3 mL vào dung dịch thử 50%, thêm methanol 50% vừa đủ đến vạch. Lọc qua màng lọc syringe 0,45 μ m thu được dung dịch thử 50% thêm chuẩn để tiêm sắc ký.

Điều kiện sắc ký

Tham khảo một số tài liệu [1],[5],[6], chúng tôi đã khảo sát và lựa chọn điều kiện sắc ký như sau:

- Pha tĩnh: Cột sắc ký C₁₈ (250 x 4,6mm, 5 μ m).
- Pha động: acetonitrile-methanol-acid phosphoric 0,07% (20:12:68, v/v/v).
- Tốc độ dòng: 1 mL/phút.
- Nhiệt độ cột: 40°C.
- Thể tích tiêm mẫu: 10 μ L.
- Bước sóng phát hiện: 260 nm.

Tiêm riêng biệt 10 μ L các dung dịch chuẩn vào máy sắc ký, ghi nhận sắc ký đồ, diện tích của pic SPH. Xây dựng đường hồi quy tuyến tính biểu diễn sự phụ thuộc giữa diện tích pic và nồng độ dung dịch chuẩn (μ g/mL) theo phương trình $y = ax + b$.

Tiêm 10 μ L dung dịch thử, ghi nhận sắc ký đồ, diện tích của pic SPH. Nồng độ SPH trong dung dịch thử (μ g/mL) được tính theo công thức:

$$C_t = \frac{S_t - b}{a}$$

Hàm lượng SPH trong cao khô tuyệt đối được tính theo công thức:

$$X(\%) = C_t \times \frac{1,25}{m_{cd} \times (100 - H)}$$

Trong đó:

S_t: Diện tích pic SPH trên sắc ký đồ của dung dịch thử.

C_t: Nồng độ của SPH trong dung dịch thử (μ g/mL).

a: Giá trị hệ số góc của đường hồi quy tuyến tính.

b: Giá trị hệ số chặn của đường hồi quy tuyến tính.

m_{cd}: Khối lượng cao đặc (g).

H: Độ ẩm của cao đặc (%).

Thâm định quy trình định lượng

Quy trình định lượng được thâm định theo hướng dẫn của AOAC [9] và ICH [10] bao gồm tính đặc hiệu, tính tương thích hệ thống, khoảng tuyến tính, độ chính xác (độ lặp lại, độ chính xác trung gian) và độ đúng.

Độ đặc hiệu: Tiến hành sắc ký các dung dịch: mẫu placebo (dung môi methanol 50%), mẫu chuẩn, mẫu thử thêm chuẩn theo điều kiện đã lựa chọn. Yêu cầu: Trên sắc ký đồ của dung dịch thử, pic chính phải có thời gian lưu trùng với pic SPH trên sắc ký đồ dung dịch chuẩn, nếu có pic phụ thì pic của chất cần phân tích phải tách hoàn toàn ra khỏi pic này. Trên sắc ký đồ của mẫu placebo không xuất hiện pic có thời gian lưu tương ứng với pic SPH.

Độ phù hợp của hệ thống: Tính tương thích của hệ thống sắc ký được xác định bằng cách phân tích dung dịch chuẩn SPH có nồng độ thích hợp 6 lần lặp lại trong điều kiện sắc ký đã lựa chọn. Ghi lại các thông số về thời gian lưu, diện tích của pic SPH. Tính RSD (%) của thời gian lưu và diện tích pic.

Xác định khoảng tuyến tính giữa nồng độ và diện tích pic: Pha một dãy dung dịch chuẩn SPH ở các nồng độ thích hợp. Tiến hành sắc ký như điều kiện đã lựa chọn. Xây dựng phương trình hồi quy tuyến tính giữa diện tích pic và nồng độ SPH trong các dung dịch chuẩn.

Khảo sát độ chính xác (độ lặp lại và độ chính xác trung gian) của phương pháp: Tiến hành định lượng lặp lại trên 6 mẫu thử độc lập, thực hiện trên 2 ngày khác nhau và 2 người định lượng khác nhau với cách tiến hành và điều kiện sắc ký như trên. Tính RSD của kết quả định lượng. Yêu cầu: RSD \leq 2,7% (mức khuyến cáo của AOAC ở mức hàm lượng từ 1% đến dưới 10%) [9].

Khảo sát độ đúng của phương pháp: Độ đúng của phương pháp được xác định bằng phương pháp thêm chuẩn. Chuẩn bị mẫu thử 50% thêm chuẩn theo phương pháp chuẩn bị mẫu trên. Tại mỗi mức thêm chuẩn thực hiện trên 3 mẫu độc lập. Tiến hành xử lý mẫu và phân tích theo quy trình. Song song tiến hành một mẫu nền (khoảng 0,1000 g cao đặc). Xác định tỷ lệ (%) SPH thêm tìm lại được so với lượng thêm vào (tỷ lệ thu hồi). Yêu cầu: Tỷ lệ thu

hồi ở cả 3 mức thêm chuẩn đều nằm trong khoảng 97-103% (mức khuyến cáo của AOAC ở mức hàm lượng từ 1% đến dưới 10%) [9].

Ứng dụng định lượng SPH trong cao đặc hòe giác

Sử dụng phương pháp đã xây dựng để định lượng SPH trong một số mẫu cao đặc hòe giác.

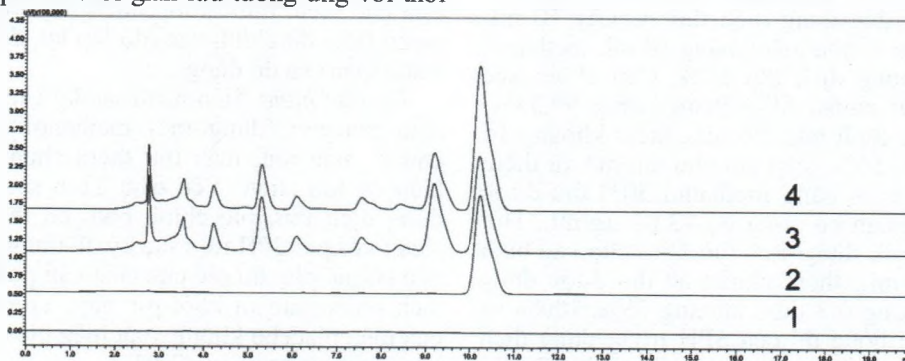
3. Kết quả và bàn luận

3.1. Thẩm định quy trình định lượng

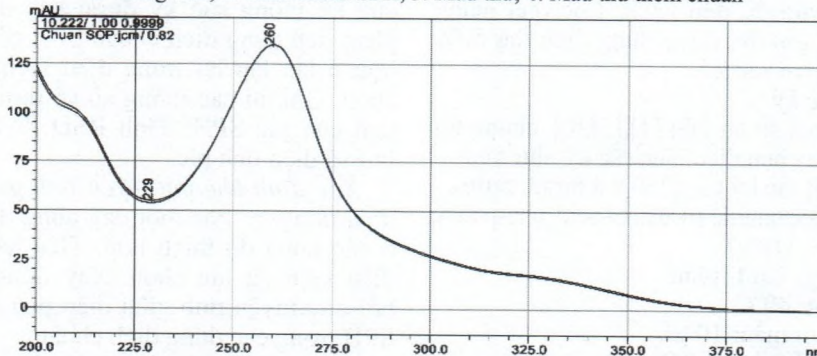
Tính đặc hiệu của phương pháp

Kết quả được trình bày ở Hình 2 cho thấy trên sắc ký đồ của dung dịch thử và dung dịch thử thêm chuẩn cho pic có thời gian lưu tương ứng với thời

gian lưu của pic trên sắc ký đồ dung dịch chuẩn. Các pic trên sắc ký đồ của mẫu thử và mẫu thử thêm chuẩn tách nhau hoàn toàn, SPH được phát hiện ở thời gian lưu khoảng 10 phút, tách hoàn toàn khỏi các pic khác, pic cân đối, độ rộng chân pic nhỏ. Trong khi đó, trên sắc ký đồ của mẫu placebo không xuất hiện pic có thời gian lưu tương ứng với thời gian lưu của pic trên sắc ký đồ dung dịch chuẩn SPH. Mặt khác, so phổ giữa pic mẫu thử và mẫu chuẩn (Hình 3) cho kết quả hệ số chồng phổ đạt 0,9999 với hấp thụ cực đại ở bước sóng 260 nm. Do đó phương pháp đảm bảo độ chọn lọc, đặc hiệu.



Hình 2. Sắc ký đồ các mẫu nghiên cứu
1: Dung môi; 2: Chất chuẩn SPH; 3: Mẫu thử; 4: Mẫu thử thêm chuẩn



Hình 3. So sánh phổ UV của mẫu thử và mẫu chuẩn SPH

Tính tương thích của hệ thống

Tiến hành lặp lại 6 lần dung dịch chuẩn SPH nồng độ 73,01 $\mu\text{g/mL}$, ghi lại các giá trị về thời gian lưu, diện tích pic. Độ thích hợp của hệ thống được trình bày ở Bảng 1 cho thấy độ lệch chuẩn tương đối của diện tích pic (0,04%) và thời gian lưu (0,05%) của SPH đều nhỏ hơn 2%, số đĩa lý thuyết trung bình 5780 với độ lệch chuẩn tương đối 1,94%. Như vậy, các điều kiện sắc ký đã lựa chọn có độ lặp lại tốt về thời gian lưu và diện tích pic của SPH và hệ thống HPLC sử dụng là phù hợp và đảm bảo độ ổn định của phép phân tích định lượng SPH.

Bảng 1. Kết quả độ thích hợp hệ thống (n=6)

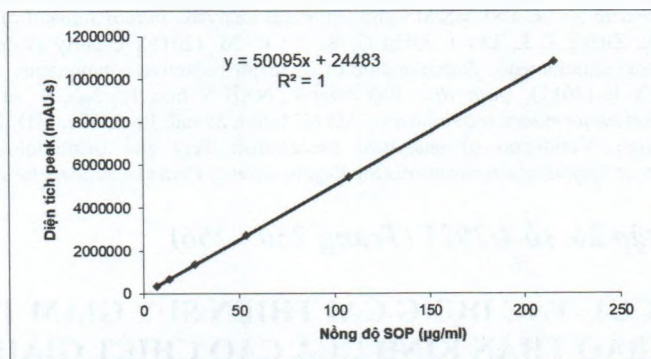
TT	Thời gian lưu (phút)	Diện tích pic (mAU.s)	Số đĩa lý thuyết
Trung bình	10,202	3609114	5780
RSD (%)	0,04	0,05	1,94

Xác định khoảng tuyến tính giữa nồng độ và diện tích pic

Kết quả độ tuyến tính được trình bày ở Bảng 2 và Hình 4 cho thấy trong khoảng nồng độ khảo sát từ 6,74 $\mu\text{g/mL}$ đến 215,57 $\mu\text{g/mL}$ có sự phụ thuộc tuyến tính giữa diện tích pic và nồng độ SPH với hệ số tương quan $r = 1$ cho thấy đường chuẩn được xây dựng có độ tuyến tính cao đảm bảo để thực hiện phép phân tích định lượng SPH.

Bảng 2. Kết quả khảo sát khoảng tuyến tính định lượng SPH

Nồng độ SPH ($\mu\text{g/mL}$)	6,74	13,48	26,95	53,90	107,79	215,57
Diện tích pic (mAU.s)	354893	698859	1382095	2732777	5414554	10825701
Phương trình hồi quy	$y = 50095x + 24483$					
Hệ số tương quan (r)	1					

**Hình 4.** Đồ thị biểu diễn mối tương quan giữa nồng độ và diện tích pic của SPH**Khảo sát độ chính xác của phương pháp**

Kết quả độ lặp lại trong ngày và khác ngày được trình bày ở Bảng 3 cho thấy giá trị RSD của mỗi ngày định lượng và của cả 2 ngày đều < 2,7%. Như vậy, phương pháp có độ lặp lại cao, ổn định, đạt yêu cầu về độ lặp lại và độ chính xác trung gian.

Bảng 3. Độ lặp lại và độ chính xác trung gian

	Ngày 1 (n=6)	Ngày 2 (n=6)	2 ngày (n=12)
Hàm lượng SPH trung bình (%)	9,12	9,17	9,15
RSD (%)	0,51	1,09	0,87

Khảo sát độ đúng của phương pháp

Kết quả độ đúng được trình bày ở Bảng 4 cho thấy tỷ lệ thu hồi ở mỗi mức nồng độ từ 99,19% đến 101,07% đều nằm trong khoảng 97 - 103% chứng tỏ phương pháp HPLC đã chọn đảm bảo độ đúng để định lượng SPH.

Bảng 4. Kết quả độ đúng của phương pháp (n=3)

Mức nồng độ (% so với mẫu thử)	Lượng chuẩn thêm vào ($\mu\text{g/mL}$)	Lượng chuẩn thêm tìm lại (trung bình, $\mu\text{g/mL}$)	Tỷ lệ thu hồi (trung bình, %)	RSD (%)
75	14,60	14,76	101,07	1,91
100	29,20	28,97	99,19	3,01
125	43,81	44,18	100,85	0,64

3.2. Định lượng SPH trong các mẫu cao đặc

Chuẩn bị các dung dịch mẫu thử (cao đặc hòa giải chiết nước và ethanol 30%, 50%, 70% và 96%) và tiến hành sắc ký trong điều kiện như đã mô tả trên 5 mẫu cao. Kết quả hàm lượng SPH trong cao đặc hòa giải được trình bày ở Bảng 5 cho thấy hàm lượng SPH trong các mẫu cao dao động từ 3,34% đến 9,10%.

Bảng 5. Hàm lượng SPH trong các mẫu cao đặc hòa giải

Mẫu	Hàm lượng SPH (%)
Cao chiết nước	4,18
Cao chiết ethanol 30%	3,34
Cao chiết ethanol 50%	8,52
Cao chiết ethanol 70%	9,10
Cao chiết ethanol 96%	8,36

4. Kết luận

Phương pháp định lượng sophoricosid trong cao đặc hòa giải bằng HPLC đã được xây dựng: Cột phân tích C_{18} (250 mm x 4,6 mm, 5 μm), tốc độ dòng: 1 mL/phút, nhiệt độ cột: 40 $^{\circ}\text{C}$, pha động acetonitril : methanol : acid phosphoric 0,07% (20:12:68, v/v/v). Phương pháp phân tích có độ nhạy cao, có tính đặc hiệu, khoảng tuyến tính từ 6,74 đến 215,57 $\mu\text{g/mL}$ ($r = 1$), độ lặp lại và độ chính xác trung gian tốt (RSD < 2,7%), độ đúng cao (tỷ lệ phục hồi 99,19% đến 101,07%). Hàm lượng SPH trong cao đặc hòa giải từ 3,34% đến 9,10%.

Tài liệu tham khảo

- Chinese Pharmacopoeia Commission (2015), *Pharmacopoeia of the people's republic of China*, Vol. I, China Medical Science Press.
- Kim B. H., Chung E. Y., Min B. K., Lee S. H., Kim M. K., Min K. R., Kim Y. S. (2003), Anti-inflammatory action of *Legume* isoflavonoid sophoricoside through inhibition on cyclooxygenase-2 activity, *Planta Medica*,

69(5), 474-6. 3. Kim B. H., Chung E. Y., Ryu J. C., Jung S. H., Min K. R., Kim Y. S. (2003), Anti-inflammatory mode of isoflavone glycoside sophoricoside by inhibition of Interleukin-6 and cyclooxygenase-2 in inflammatory response, *Archives of Pharmacol Research*, 26, 306-11. 4. Kim S. J., Lee G. Y., Jung J. W., Oh S. R., Ahn E. M., Kim S. H., Hong S. H., Um J. Y. (2013), The ameliorative effect of sophoricoside on mast cell-mediated allergic inflammation *in vivo* and *in vitro*, *Molecules*, 18, 6113-27. 5. Li W. F., Lu Y. L. (2018), Hepatoprotective effects of sophoricoside against fructose-induced liver injury via regulating lipid metabolism, oxidation, and inflammation in mice, *Journal of Food Science*, 83(2), 552-8. 6. Chang L., Zhang X. X., Ren Y. P., Cao L., Zhi X. R., Zhang L. T. (2013), Simultaneous quantification of six major flavonoids from *Fructus Sophorae* by LC-ESI-MS/MS and statistical analysis, *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 75(3), 330-8. 7. Wang S. Q., Zhang J. J., Liu J., Qian G. S., Fu C. M. (2016), Quality evaluation of *Huajijiao* pill by chromatographic fingerprint and simultaneous determination of its major bioactive components, *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 6, 249-55. 8. Bộ Y tế (2017), *Dược điển Việt Nam V*, NXB Y học, Hà Nội. 9. AOAC (2016), *Appendix F: Guidelines for standard method performance requirements*, AOAC International, Rockville, MD, USA. 10. ICH (2005), ICH harmonised tripartite guideline. Validation of analytical procedures: Text and methodology Q2(R1), *International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use*.

Tạp chí Dược liệu, tập 26, số 4/2021 (Trang 250 - 256)

NGHIÊN CỨU TÁC DỤNG CẢI THIỆN SUY GIẢM TRÍ NHỚ VÀ BẢO VỆ TẾ BÀO THẦN KINH CỦA CAO CHIẾT GIÀU FLAVONOID TỪ HOA *TALIPARITI ELATUM* (SW.) FRYXELL

Phạm Thị Nguyệt Hằng^{1,*}, Trần Nguyễn Hồng¹,
Montano-Peguero Yanay², Nuñez-Figueroa Yanier²

¹Viện Dược liệu; ²Centro de Investigación y Desarrollo de Medicamentos (CIDEM), Cuba

*Email: nguyethangpt@nimm.org.vn

(Nhận bài ngày 20 tháng 7 năm 2021)

Tóm tắt

Talipariti elatum (Sw.) Fryxell (Malvaceae) là một loại cây bản địa từ Cuba và thường được gọi là majagua. Một số nghiên cứu đã chứng minh flavonoid phân lập từ loài này có hoạt tính chống oxy hóa, chống viêm, kháng cholinesterase, chống gây đột biến. Trong nghiên cứu này, chúng tôi đánh giá tác dụng chống sa sút trí tuệ của flavonoid thô thu được từ cánh hoa khô của cây *Talipariti elatum* (Sw.) Fryxell (TE). Chuột nhắt trắng được uống TE hàng ngày (liều 10 và 40 mg/kg), 1 tuần trước khi tiêm trimethyltin (TMT) liều duy nhất (2,6 mg /kg; i.p) và trong suốt quá trình nghiên cứu. Hành vi trí nhớ/nhận thức của chuột được đánh giá thử nghiệm nhận diện đồ vật chuyển vị trí và thử nghiệm mê lộ chữ Y cải tiến. Sau khi kết thúc các bài kiểm tra hành vi, mô não chuột được nhuộm Nissl. Kết quả nghiên cứu cho thấy, TMT gây suy giảm trí nhớ ngắn hạn và trí nhớ làm việc phụ thuộc vào không gian. Điều trị bằng TE đã có tác dụng cải thiện đáng kể sự suy giảm trí nhớ trên chuột TMT. Hơn nữa, TMT gây ra tổn thương tế bào thần kinh ở vùng hải mã CA1 và CA3 được đánh giá bằng phương pháp nhuộm Nissl và điều trị bằng TE đã ngăn chặn tổn thương do TMT gây ra ở vùng CA1 và CA3. Những kết quả này cho thấy, TE cải thiện tình trạng suy giảm trí nhớ không gian ngắn hạn và trí nhớ làm việc ở chuột TMT thông qua cơ chế bảo vệ thần kinh thủy hồi hải mã.

Từ khóa: *Talipariti elatum*, Trimethyltin, Suy giảm trí nhớ, Nhuộm Nissl, Bảo vệ tế bào thần kinh.

Summary

Cognitive Enhancing and Neuroprotective Effects of Flavonoid-Rich Extract from Dried Flowers of *Talipariti elatum* (Sw.) Fryxell

Talipariti elatum (Sw.) Fryxell (Malvaceae) is a native tree from Cuba and is commonly known as majagua. Extensive scientific research has shown that flavonoids have antioxidant, anti-inflammatory, anticholinesterase, and antimutagenic activities. In the present study, we evaluate anti-dementia effect of flavonoid-rich extract obtained from the petals of the dried flowers of *Talipariti elatum* (Sw.) Fryxell (TE). Mice were orally administered daily TE (10 and 40 mg/kg), 1 week before single dose of trimethyltin (TMT) injection (2.6 mg/kg; i.p) and then throughout the experiments. Cognitive performance of mice was evaluated by the object location and modified Y maze tests. After finishing the behavioral tests, brain tissues of animals were dissected for Nissl staining. The results showed that TMT impaired spatial short-term and spatial working memories of the mice. TE administration ameliorated these memory disturbances. TMT significantly induced neuronal damage in the hippocampal CA1 and CA3 by Nissl staining and the TE treatment prevented the TMT-induced damage in the CA1 and CA3 regions. These results suggested that TE improves short-term and working memory deficits in TMT mice via neuroprotection in the hippocampus.

Keywords: *Talipariti elatum*, Trimethyltin, Dementia, Nissl staining, Neuroprotection.

1. Đặt vấn đề

Talipariti elatum (Sw.) Fryxell (Malvaceae) còn được biết đến với tên Blue Mahoe hay majagua là một loại cây đặc trưng của Cuba. Loại cây cũng phân bố ở một số quốc gia khác như Jamaica, Nam Florida, Mexico, Peru và Brazil

[1]. Theo y học cổ truyền của Cuba, hoa của *T. elatum* được sử dụng để điều trị ho, hen phế quản, nguyên liệu trong dầu gội đầu [2]. Bằng phương pháp phân tích sắc ký lớp mỏng, González và cs. đã phát hiện được cao chiết ethanol từ hoa *T. elatum* có thành phần chủ yếu là flavonoid như