

# Xây dựng quy trình định lượng asperulosid trong bạch hoa xà thiệt thảo (*Herba Hedyotis diffusae*) bằng sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC-PDA)

Chu Ngọc Phượng<sup>1</sup>, Phạm Ngọc Thạc<sup>2</sup>, Dương Hồng Tố Quyên<sup>2\*</sup>  
Nguyễn Thị Thu Hương<sup>3</sup> Chung Khang Kiệt<sup>1</sup>, Trần Thanh Nhân<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Đại học Y Dược Thành phố Hồ Chí Minh

<sup>2</sup>Bệnh viện Y học cổ truyền TP. Hồ Chí Minh,

<sup>3</sup>Trung Tâm Sâm và Dược liệu TP. Hồ Chí Minh

## Summary

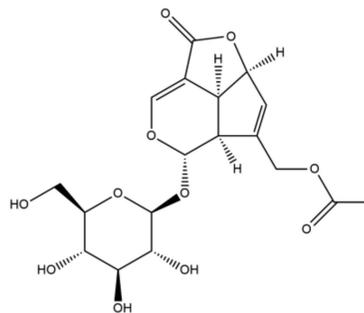
*Asperulosid is a bioactive compound of white flower snake-tongue grass (Hedyotis diffusa, Rubiaceae), a traditional herbal used for protecting liver and antioxidant effect. This study was conducted to develop a method for asperulosid quantification in Herba Hedyotis diffusa by high performance liquid chromatography (HPLC). Sample preparation methods and HPLC conditions were screened and selected. The quantitation method was validated on its system suitability, specificity, linearity, precision and accuracy. Methanol was selected as extraction solvent for sample preparation at a material: Methanol ratio of 500 mg/ 25 ml. The best HPLC condition for asperulosid determination employed Phenomenex C18 (25 cm × 4.6 mm; 5 μm), a detection wavelength of 238 nm, a column temperature of 30 °C, a flow rate of 1 ml/min, and an injection volume of 10 μl. Mobile phase was mixtures of acetonitrile and H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 0.1 % at a ratio of 9 : 91 (v/v). There was good correlation between peak areas and asperulosid acid concentrations (r<sup>2</sup> = 0.9996). The RSD values of inter - day precision were found to be at 0.75 %. The recovery percentages were of 95 – 105 %. The proposed method met the requirements of validation and could be useful for improving the specification of Herba Hedyotis diffusa.*

**Keywords:** Asperulosid, HPLC-PDA, Herba Hedyotis diffusa.

## Đặt vấn đề

Bạch hoa xà thiệt thảo là một dược liệu phổ biến ở nước ta, với công dụng chính là chống oxy hóa, bảo vệ gan, hạ men gan, tác dụng kháng viêm [1, 4]. Asperulosid (hình 1) là một trong những hợp chất iridoid chính của bạch hoa xà thiệt thảo, có tác dụng kháng viêm với cơ chế giảm sản xuất oxit nitric [2]. Hiện nay, chuyên luận Bạch hoa xà thiệt thảo trong Dược điển Việt Nam V chưa quy định việc định lượng asperulosid. Vì vậy, nhằm mục đích kiểm soát

và nâng cao chất lượng dược liệu bạch hoa xà thiệt thảo trên thị trường, tiêu chí định lượng cần được nghiên cứu phát triển. Nghiên cứu thực hiện với mục tiêu xây dựng quy trình định lượng asperulosid trong dược liệu bạch hoa xà thiệt thảo bằng phương pháp **HPLC - PDA**.



Hình 1. Cấu trúc hóa học của asperulosid

Chịu trách nhiệm: Dương Hồng Tố Quyên

Email: dsduongquyen@gmail.com

Ngày nhận: 13/01/2021

Ngày phản biện: 22/01/2021

Ngày duyệt bài: 19/02/2021

## Nguyên liệu và phương pháp nghiên cứu

### Nguyên liệu

Dược liệu bạch hoa xà thiệt thảo (Herba *Hedyotis diffusae*) đạt tiêu chuẩn Dược điển Việt Nam V, được cung cấp bởi Bệnh viện Y học cổ truyền Thành phố Hồ Chí Minh.

### Hóa chất, thiết bị

Chất chuẩn asperulosid (hàm lượng 98,42 %) được mua tại Công ty Chengdu Biopurify Phytochemicals. Methanol đạt tiêu chuẩn phân tích (Hãng Merck, Đức). Acetonitril (Hãng Scharlau, Tây Ban Nha) và nước cất 2 lần đạt tiêu chuẩn dùng cho **HPLC**.

Máy HPLC Shimadzu LC-2030C 3D plus, detector PDA (Nhật), cột sắc ký Phenomenex C18 (250 x 4,6 mm; 5  $\mu$ m) và tiền cột HQ 105 C18 (10 x 4,6 mm; 5  $\mu$ m) (Thermo Scientific, Mỹ).

### Phương pháp nghiên cứu

#### Khảo sát quy trình xử lý mẫu

##### Chọn loại dung môi chiết xuất asperulosid

Dung dịch đối chiếu: Dung dịch asperulosid nồng độ 30  $\mu$ g/ml trong methanol.

Dung dịch thử: Cân chính xác khoảng 100 mg bột dược liệu (qua rây số 355) cho vào bình định mức 25 ml. Thêm 20 ml methanol, siêu âm 15 phút, để nguội đến nhiệt độ phòng, bổ sung methanol đến vạch, lắc đều, lọc. Tiến hành tương tự lần lượt với các dung môi ethanol, acetonitril và nước.

So sánh kết quả chiết xuất bằng phương pháp sắc ký lớp mỏng (**SKLM**) với hệ dung môi triển khai  $\text{CH}_3\text{Cl} - \text{MeOH} - \text{H}_2\text{O}$  (65:35:10, lớp dưới) và phát hiện bằng thuốc thử  $\text{H}_2\text{SO}_4$  10 % trong ethanol (sấy ở 105  $^\circ\text{C}$ ). Dựa vào kết quả **SKLM** lựa chọn dung môi chiết được asperulosid và ít tạp nhất.

**Khảo sát chọn tỷ lệ dược liệu : dung môi chiết xuất asperulosid**

Dùng dung môi chiết xuất được chọn ở trên để khảo sát, tiến hành thực nghiệm với 2 tỷ lệ dược liệu : dung môi khác nhau.

Tỷ lệ 1: Cân chính xác 100 mg dược liệu và chiết với 25 ml dung môi.

Tỷ lệ 2: Cân chính xác 100 mg dược liệu và chiết với 50 ml dung môi.

Chiết xuất bằng phương pháp siêu âm

mỗi mẫu trong 15 phút. Chuẩn bị 3 mẫu thử riêng biệt cho mỗi tỷ lệ. Xác định lượng asperulosid chiết được của các tỷ lệ khảo sát bằng phương pháp **HPLC**. Từ đó, xác định hàm lượng asperulosid trong dược liệu bạch hoa xà thiệt thảo. Chọn tỷ lệ dược liệu : dung môi cho lượng asperulosid chiết được cao nhất.

### Khảo sát điều kiện HPLC định lượng asperulosid

Khảo sát điều kiện **HPLC** định lượng asperulosid trong dược liệu bạch hoa xà thiệt thảo; pha tĩnh là cột Phenomenex C18 (250 x 4,6 mm; 5  $\mu$ m), nhiệt độ cột 30  $^\circ\text{C}$ , bước sóng phát hiện 238 nm, thể tích tiêm mẫu 10  $\mu$ l. Khảo sát một số chương trình pha động và chọn điều kiện **HPLC** để pic asperulosid tách hoàn toàn khỏi các pic khác và các thông số sắc ký đạt yêu cầu.

### Thẩm định quy trình định lượng asperulosid

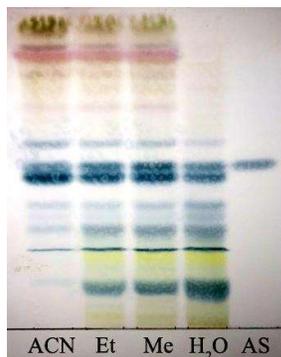
Thẩm định quy trình định lượng asperulosid trong dược liệu bạch hoa xà thiệt thảo theo hướng dẫn của ICH về tính tương thích hệ thống, tính đặc hiệu, tính tuyến tính, độ chính xác, độ đúng, giới hạn định lượng và giới hạn phát hiện [5].

### Kết quả và bàn luận

#### Khảo sát quy trình xử lý mẫu

##### Chọn loại dung môi chiết xuất asperulosid

Kết quả **SKLM** khảo sát thành phần dịch chiết dược liệu bạch hoa xà thiệt thảo bằng 4 dung môi khác nhau (nước, methanol, acetonitril, ethanol 96 %) được trình bày trong hình 2.



ASP: Dung dịch chuẩn asperuloside  
ACN: Dịch chiết acetonitril  
Et: Dịch chiết ethanol 96 %  
Me: Dịch chiết methanol  
H<sub>2</sub>O: Dịch chiết nước

Hình 2. **SKLM** phân tích các dịch chiết dược liệu bạch hoa xà thiệt thảo

Kết quả **SKLM** cho thấy acetonitril và ethanol 96 % chiết được ít chất chỉ điểm; methanol và nước đều chiết được asperulosid. Trong đó, methanol chiết được nhiều asperulosid và ít tạp chất hơn. Vì vậy, methanol được chọn làm dung môi chiết chất chỉ điểm asperulosid.

**Khảo sát chọn tỷ lệ dược liệu : dung môi methanol chiết xuất asperulosid**

**Bảng 1.** Hàm lượng asperulosid chiết được ứng với các tỷ lệ dược liệu/methanol khảo sát

Tỷ lệ dược liệu/methanol (mg/ml)	Hàm lượng asperulosid chiết được (%)
100 : 25	0,748 ± 0,003
100 : 50	0,745 ± 0,005

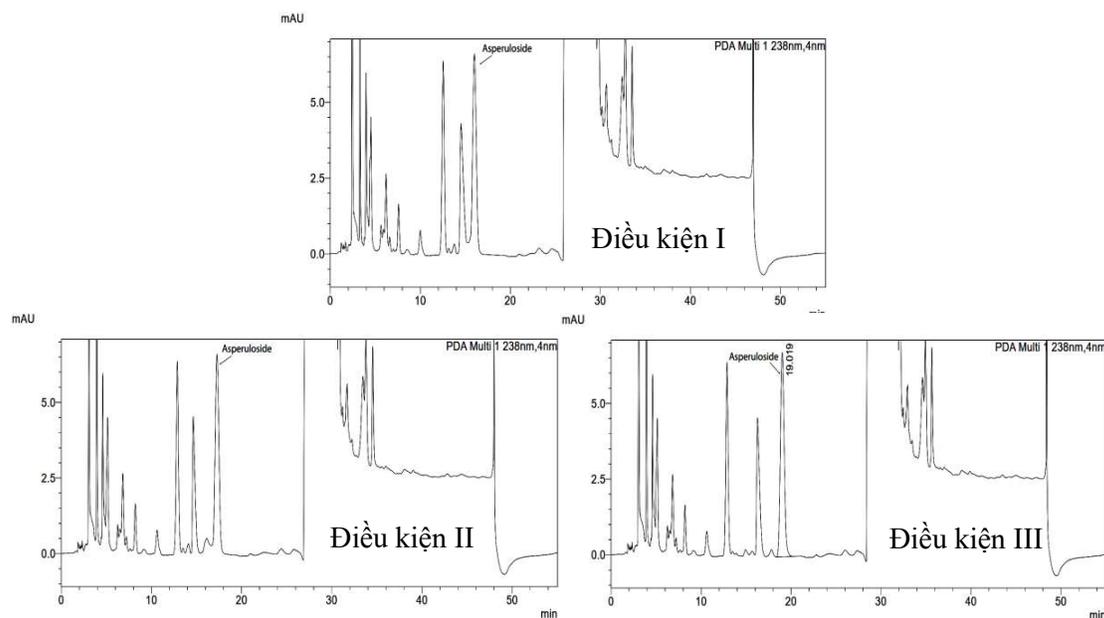
Kết quả **HPLC** (bảng 1) cho thấy hàm lượng asperulosid chiết được với 2 tỷ lệ khối lượng dược liệu : thể tích methanol khác nhau không có ý nghĩa thống kê ( $p > 0,05$ ). Với cùng một lượng dược liệu khi dùng gấp đôi lượng dung môi methanol, lượng asperulosid chiết được không tăng thêm. Vì vậy, tỷ lệ dược liệu/methanol được chọn để chuẩn bị mẫu thử là 100 mg/25 ml.

**Khảo sát điều kiện HPLC định lượng asperulosid**

Điều kiện pha động khảo sát được trình bày trong bảng 2.

**Bảng 2.** Các điều kiện pha động HPLC khảo sát

Điều kiện pha động	Thời gian và tỷ lệ thể tích acetonitril trong pha động
I	0 phút (12 %), 20 phút (12 %), 20,01 phút (90 %), 40 phút (90 %), 40,01 phút (12 %), 55 phút (12 %)
II	0 phút (10 %), 20 phút (10 %), 20,01 phút (90 %), 40 phút (90 %), 40,01 phút (10 %), 55 phút (10 %)
III	0 phút (9 %), 25 phút (9 %), 25,01 phút (90 %), 45 phút (90 %), 45,01 phút (9 %), 55 phút (9 %)



**Hình 3.** Sắc ký đồ HPLC phân tích mẫu thử với các điều kiện khảo sát

Kết quả từ hình 3 cho thấy điều kiện pha động I và II không tách được pic asperulosid. Điều kiện pha động III cho pic asperulosid tách hoàn toàn với các pic khác trên sắc ký đồ. Như vậy, điều kiện III được chọn để định lượng asperulosid.

**Quy trình định lượng asperulosid trong dược liệu bạch hoa xà thiệt thảo**

**Mẫu chuẩn:** Cân chính xác khoảng 1 mg asperulosid chuẩn cho vào bình định mức 10 ml, thêm 7 ml methanol, siêu âm 15 phút, để nguội, bổ sung methanol đến vạch, lắc đều, lọc qua màng lọc 0,22 µm.

**Mẫu thử:** Cân chính xác khoảng 100 mg bột dược liệu (qua rây số 355) cho vào bình định mức 25 ml. Thêm 20 ml methanol, siêu âm 15 phút, để nguội đến nhiệt độ phòng, bổ sung methanol đến vạch, lắc đều, lọc qua màng lọc 0,22 µm.

**Điều kiện sắc ký:** Cột Phenomenex C18 (250 × 4,6 mm; 5 µm), bước sóng phát hiện 238 nm, nhiệt độ cột 30 °C, tốc độ dòng 1 ml/phút, thể tích tiêm mẫu 10 µl. Pha động gồm acetonitril và dung dịch H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 0,1 % với tỷ lệ 9 : 91.

**Cách tiến hành:** Tiêm riêng biệt dung dịch chuẩn, dung dịch thử. Dựa vào diện tích pic thu được trên sắc ký đồ của dung dịch thử, dung dịch chuẩn. Hàm lượng asperulosid (%) trong dược liệu bạch hoa xà thiệt thảo được tính theo công thức:

$$X (\%) = \frac{S_t \times C \times 25}{S_c \times m_t \times 1000} \times a \times 100$$

S<sub>t</sub>, S<sub>c</sub>: Diện tích pic asperulosid của mẫu thử và mẫu chuẩn

C: Nồng độ dung dịch asperulosid chuẩn (µg/ml)

m<sub>t</sub>: Khối lượng cân của mẫu thử (đã trừ độ ẩm) (mg)

a: Hàm lượng của asperulosid chuẩn

**Thẩm định quy trình định lượng asperulosid trong dược liệu bạch hoa xà thiệt thảo**

**Tính tương thích hệ thống**

Kết quả khảo sát tính tương thích hệ thống được trình bày trong bảng 3. Các thông số thời gian lưu (t<sub>R</sub>), diện tích pic (S) có RSD ≤ 2 %. Hệ số bất đối (A<sub>s</sub>), độ phân giải (R<sub>s</sub>), số đĩa lý thuyết (N) đạt yêu cầu phân tích. Do đó, phương pháp đã xây dựng đạt yêu cầu về tính tương thích hệ thống.

**Bảng 3. Kết quả khảo sát tính tương thích hệ thống**

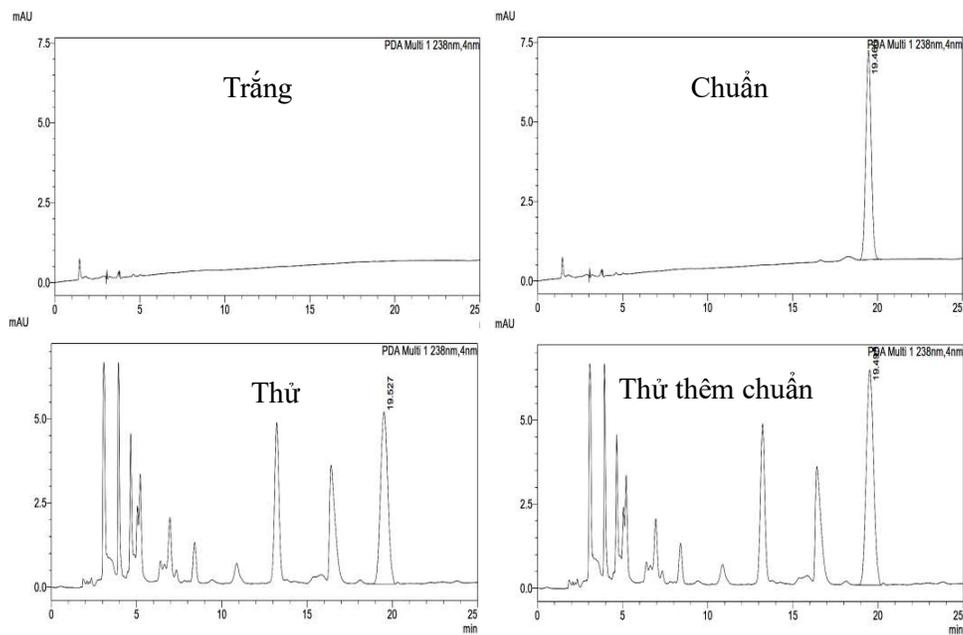
STT	t <sub>R</sub> (phút)	S (mAU.s)	R <sub>S1</sub>	R <sub>S2</sub>	A <sub>s</sub>	N
1	19,517	204601	2,132	1,523	1,091	9751
2	19,169	203206	1,761	1,592	1,094	9766
3	19,351	202502	1,843	1,59	1,007	10066
4	19,450	205521	1,954	1,522	1,024	9763
5	19,220	203212	1,768	1,587	1,096	9811
6	19,238	206433	1,871	1,512	1,029	10140
<b>TB</b>	19,32	204245	1,89	1,55	1,06	9883
<b>% RSD</b>	0,72	0,75	R <sub>s</sub> ≥ 1,5	R <sub>s</sub> ≥ 1,5	0,8 ≤ A <sub>s</sub> ≤ 1,2	

\*R<sub>S1</sub>, R<sub>S2</sub>: Độ phân giải của pic trước và sau so với pic asperulosid trên sắc ký đồ.

**Tính đặc hiệu**

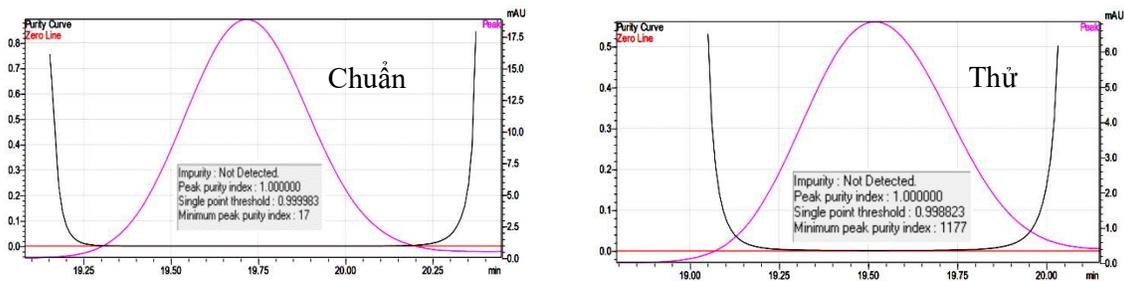
Kết quả từ hình 4 cho thấy sắc ký đồ của mẫu trắng (dung môi methanol) không có pic xuất hiện trong khoảng thời gian lưu tương ứng với thời gian lưu của pic asperulosid

trong mẫu chuẩn. Sắc ký đồ của mẫu thử có pic có thời gian lưu tương ứng với pic asperulosid trong mẫu chuẩn. Khi thêm chuẩn vào mẫu thử thì chiều cao và diện tích pic asperulosid tăng.



Hình 4. Sắc ký đồ HPLC đánh giá độ đặc hiệu

Kết quả độ tinh khiết pic của asperulosid trong mẫu chuẩn và mẫu thử (hình 5) đạt yêu cầu.



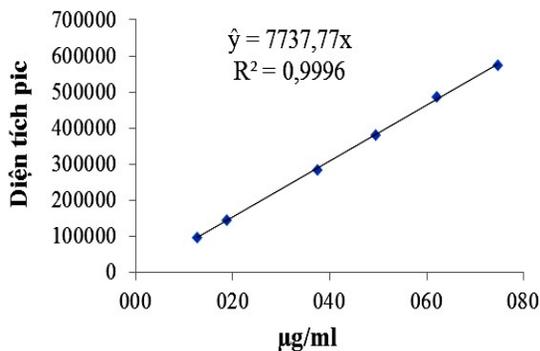
Hình 5. Độ tinh khiết pic asperulosid trong mẫu chuẩn và mẫu thử

**Tính tuyến tính**

Kết quả khảo sát tính tuyến tính được trình bày trong bảng 4 và hình 6, có mối tương quan giữa diện tích pic và nồng độ asperulosid với  $R^2 = 0,9996$ .

**Bảng 4. Tính tuyến tính của quy trình định lượng asperulosid**

Nồng độ (µg/ml)	Diện tích pic
12,66	96773
18,69	145966
37,37	285022
49,43	379848
62,09	485904
74,75	574901



Hình 6. Tương quan giữa nồng độ và diện tích pic asperulosid

**Bảng 5. Kết quả xử lý thống kê khảo sát tính tuyến tính của quy trình định lượng asperulosid trong dược liệu bạch hoa xà**

Thông số	Asperulosid
$R^2$	0,9998
Phương trình hồi quy $y = B_0x + B$	$7737,77x - 778,40$
Hệ số $B_0$	7737,77
Giá trị t của hệ số $B_0$	103,49
Hệ số B	- 778,40
Giá trị t của hệ số B	- 0,22
Giá trị F	10709,35
Giá trị $F_{0,05}$	7,71
Giá trị $t_{0,05}$	2,77
Khoảng nồng độ khảo sát ( $\mu\text{g/ml}$ )	12,66-74,75

Kết quả xử lý thống kê cho thấy giá trị F thực nghiệm lớn hơn giá trị  $F_{0,05}$  nên phương trình hồi quy tương thích. Giá trị t của hệ số  $B_0$  lớn hơn  $t_{0,05}$  nên hệ số  $B_0$  có ý nghĩa. Giá trị t của hệ số B nhỏ hơn  $t_{0,05}$  nên hệ số B không có ý nghĩa. Vậy phương trình hồi quy tuyến tính đối với asperulosid là  $\hat{y} = 7737,77x$ .

**Độ lặp lại và độ chính xác trung gian**

Kết quả khảo sát độ lặp lại và độ chính xác trung gian được trình bày trong bảng 6.

**Bảng 6. Độ lặp lại và độ chính xác trung gian**

STT	Hàm lượng asperulosid (%)		Giá trị thống kê 2 ngày
	Ngày 1	Ngày 2	
1	0,7525	0,7546	Trung bình: 0,752 % RSD: 0,79 %
2	0,7399	0,7435	
3	0,7550	0,7563	
4	0,7597	0,7598	
5	0,7487	0,7506	
6	0,7520	0,7530	
<b>TB</b>	0,751	0,753	
<b>RSD (%)</b>	0,89	0,74	

Hàm lượng trung bình của asperulosid là 0,751 % và RSD nhỏ hơn 2 %. Như vậy, quy trình định lượng asperulosid trong dược liệu bạch hoa xà thiết thảo đạt yêu cầu về độ lặp lại và độ chính xác trung gian.

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

Tiến hành phân tích mẫu chuẩn ở nồng độ còn có thể xuất hiện tín hiệu của chất phân tích và xác định tỉ lệ S/N. Phân tích chuẩn asperulosid ở nồng độ 36  $\mu\text{g/ml}$ , sau đó pha loãng dần đến khi dung dịch chuẩn không còn xuất hiện tín hiệu của chất phân tích (bảng 7). Nồng độ dung dịch chuẩn là 1,8  $\mu\text{g/ml}$ , thì tỷ lệ của tín hiệu và độ nhiễu đường nền S/N = 3, đạt trong khoảng từ 2 - 3. Như vậy, nồng độ 1,8  $\mu\text{g/ml}$  là giới hạn phát hiện (LOD) của phương pháp. Giới hạn định lượng (LOQ) =  $3 \times \text{LOD}$  =  $3 \times 1,8 = 5,4 \mu\text{g/ml}$  [3].

**Bảng 7. Kết quả xác định nồng độ giới hạn LOD**

Asperulosidic acid ( $\mu\text{g/ml}$ )	36	18	7,2	3,6	1,8	0,9
Diện tích pic	275202	137603	55039	27482	13760	Không có tín hiệu

**Độ đúng**

Độ đúng được tiến hành bằng cách thêm chất chuẩn asperulosid vào mẫu thử ở 3 mức 80 %, 100 % và 120 % so với nồng độ asperulosid định lượng (hàm lượng asperulosid trong dược liệu bạch hoa xà thiết thảo là 0,751 % được dựa vào kết quả trung bình độ lặp lại, bảng 5). Mỗi mẫu được lặp lại 3 lần. Kết quả khảo sát độ đúng được trình bày trong bảng 8.

**Bảng 8. Kết quả khảo sát độ đúng**

Mức nồng độ thêm vào	Tỉ lệ hồi phục (%)	Giá trị trung bình
80%	99,92	TB = 99,88 % RSD = 1,63 %
	98,23	
	101,48	
100%	96,31	TB = 96,46 % RSD = 0,80 %
	97,30	
	95,77	
120%	96,68	TB = 98,76 % RSD = 3,19 %
	97,21	
	102,38	

Theo yêu cầu về độ hồi phục và RSD % tương ứng với nồng độ chất phân tích, tỉ lệ phục hồi cho phép phương pháp định lượng asperulosid trong khoảng 95 - 105 %<sup>[5]</sup>. Kết quả nghiên cứu cho thấy tỉ lệ hồi phục trung bình từ 96,46 - 99,88%. Do đó, quy trình định lượng đạt yêu cầu về độ đúng.

### **Kết luận**

Quy trình định lượng asperulosid trong dược liệu bạch hoa xà thiệt thảo đã được xây dựng và thẩm định các tiêu chí theo hướng dẫn của ICH. Kết quả thẩm định đạt các yêu cầu về tính tương thích hệ thống, tính tuyến tính, độ đặc hiệu, độ chính xác cao (RSD là 0,89 %), độ đúng với độ phục hồi trong khoảng 96,46 - 99,88 %. Vì vậy, quy trình định lượng có thể được ứng dụng để định lượng asperulosid trong dược liệu bạch hoa xà thiệt thảo.

*Bài báo là một phần kết quả thuộc đề tài nghiên cứu cấp Sở Khoa học và Công nghệ Thành phố Hồ Chí Minh. Quỹ phát triển Khoa học và Công nghệ Thành phố Hồ Chí Minh đã hỗ trợ kinh phí cho việc thực hiện đề tài.*

### **Tài liệu tham khảo**

1. Chen Yunlong, Yanyan Lin, Yachan Li (2016), "Total flavonoids of *Hedyotis diffusa* Willd inhibit inflammatory responses in LPS - activated macrophages via suppression of the NF- $\kappa$ B and MAPK signaling pathways", *Experimental and Therapeutic Medicine*, 11 (3), pp. 1116-1122.
2. He J, Lu X, Wei T, Dong Y, Cai Z, Tang L, Liu M (2018), "Asperuloside and asperulosidic acid exert an anti-inflammatory effect via suppression of the NF- $\kappa$ B and MAPK signaling pathways in LPS-induced RAW 264.7 Macrophages", *Int. J. Mol. Sci.*, 19 (7), pp. 2027.
3. International conference on harmonization of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use, validation of analytical procedure: Text and Methodology, 2005.
4. Lin Chung – Ching, Lean-Teik Ng., Yang Jenq-er Yang (2002), "Anti-inflammatory and hepatoprotective activity of peh-hue-juwa-chi-cau in male rats", *The American journal of Chinese medicine*. 30 (2 -3), pp. 225-234.
5. Ludwig Huber, "Validation and qualification in analytical laboratories", *New York: Informa Healthcare*, 2007.