

Nghiên cứu định tính, định lượng đồng thời kirenol và darutosid trong hy thiêm bằng phương pháp *HPLC-PDA*

Nguyễn Thị Phương Thảo¹, Vũ Hà Khuê¹, Lê Thị Thu¹
Nguyễn Đức Hùng², Phương Thiện Thương^{2*}

¹ Viện Kiểm nghiệm Thuốc Trung ương

² Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam - Hàn Quốc (VKIST)

Summary

Herbal Siegesbeckiae is an important herb that has been used in East Asia traditional medicine for the treatment of back pain, knee pain, bone and joint pain, numb limbs, and boils. In this study, an HPLC-PAD method was developed and validated to simultaneously determine kirenol and darutoside in Herbal Siegesbeckiae. The linearity ranges of method are 9–75 µg/ml for kirenol and 6–45 µg/ml for darutoside. The limits of detection and limits of quantitation of the method are 1.7 and 5.1 µg/ml for kirenol, 1.3 and 3.9 µg/mL for darutoside, respectively. All the recoveries for the spiked analytes ranged 98.0 %–102.0 %. The content of kirenol and darutoside in Herbal Siegesbeckiae grown in Vietnam range 0.049 % – 0.239 % and 0.050 % - 0.089 %, respectively, based on absolute dry samples. These results suggest an upgrade quantitative control of the Herbal Siegesbeckiae collected in Vietnam.

Keywords: Hy thiêm; *Siegesbeckia orientalis*; kirenol; darutosid; định lượng, HPLC-PAD.

Đặt vấn đề

Hy thiêm (*Siegesbeckia orientalis* L.), thuộc họ Cúc (Asteraceae) là cây thuốc được sử dụng trong Y học cổ truyền điều trị các bệnh đau lưng gối, đau nhức xương, khớp, mụn nhọt, chân tay tê buốt [1]. Ở Việt Nam, hy thiêm được nhân dân ta sử dụng lâu đời trong các bài thuốc Y học cổ truyền và hiện nay được sử dụng phổ biến trong nhiều sản phẩm thuốc dạng bào chế hiện đại [2].

Thành phần hóa học chủ yếu trong hy thiêm là các diterpenoid thuộc nhóm *ent*-kauran và *ent*-pimarane [3, 4]; trong đó hợp chất chính là kirenol và darutosid đã được nghiên cứu tác dụng dược lý có tác dụng chống viêm, giảm đau cục bộ, làm giảm đáng kể sưng khớp, làm lành vết thương [5, 6]. Dược điển Trung Quốc [7] và Dược điển Hồng Kông [8] đều quy định chỉ tiêu định lượng kirenol trong dược liệu hy thiêm

với hàm lượng quy định tối thiểu là 0,05 % [7], và 0,079 % [8]. Dược điển Việt Nam V (2017) chỉ quy định định lượng chất chiết được trong ethanol 96 %. Một số nghiên cứu thực hiện gần đây cho thấy hy thiêm thu hái ở một số vùng ở Việt Nam (Thanh Hóa, Nghệ An ...) ngoài kirenol còn chứa darutosid một hoạt chất có tác dụng kháng viêm [2]. Đến nay chưa có công bố nghiên cứu định lượng đồng thời hai hoạt chất kirenol và darutosid trong dược liệu hy thiêm. Bài báo này trình bày kết quả nghiên cứu xây dựng và thẩm định phương pháp định tính, định lượng đồng thời kirenol và darutosid trong hy thiêm bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao (*HPLC*).

Nguyên liệu, thiết bị và phương pháp nghiên cứu

Thiết bị, hóa chất, chất chuẩn

Thiết bị, dụng cụ

Các thiết bị, dụng cụ của Viện Kiểm nghiệm Thuốc Trung ương đã được hiệu chuẩn theo yêu cầu của ISO/IEC 17025 và GLP gồm HPLC SHIMADZU 20A; HPLC AGILENT 1260 INFINITY; máy lắc siêu âm ELMASONIC

Chịu trách nhiệm: Phương Thiện Thương

Email: ptthuong@most.gov.vn

Ngày nhận: 21/9/2021

Ngày phân biên: 11/10/2021

Ngày duyệt bài: 24/12/2021

S180H; cột sắc ký PHENOMENEX RP-18 (250 × 4,6 mm, 5 µm).

Hóa chất, dung môi, chất chuẩn

Dicloromethan, aceton, cloroform, acid phosphoric và acid formic (PA; Merck); vanilin (PA, Himedia Lab), acid sulfuric (PA, Scharlau); methanol (HPLC; Merck); acetonitril (HPLC; Merck); ethanol 96 % (PA; Việt Nam). Chất chuẩn kirenol của Dược điển Trung Quốc, hàm lượng 100 %. Chất chuẩn darutosid do nhóm nghiên cứu chiết xuất, phân lập từ dược liệu hy thiêm, đã được chứng minh cấu trúc và xác định hàm lượng tinh khiết sắc ký là 99,66 %.

**Đối tượng và phương pháp nghiên cứu
Đối tượng nghiên cứu**

Mẫu hy thiêm (*Herbal Siegesbeckiae*) được thu hái tại Huyện Thạch Thành, Tỉnh Thanh Hóa vào tháng 6 năm 2020, cắt bỏ gốc rễ, sấy ở nhiệt độ khoảng 40 – 50 °C trong 12 giờ, xay nhỏ, độ ẩm 2,41 %.

Phương pháp nghiên cứu

Khảo sát điều kiện chương trình **HPLC** định tính hy thiêm bằng sắc ký vân tay theo Dược điển Hồng Kông và chương trình định lượng kirenol trong hy thiêm theo Dược điển Trung Quốc 2015.

Theo Dược điển Hồng Kông^[7]			Theo Dược điển Trung Quốc^[8]		
- Cột sắc ký RP 18, 5 µm (25 cm × 4,6 mm).			- Cột sắc ký RP 18, 5 µm (25 cm × 4,6 mm).		
- Detector diode array với bước sóng phát hiện 215 nm.			- Detector diode array với bước sóng phát hiện 215 nm.		
- Pha động: Pha A: Acetonitril; Pha B: Acid phosphoric 0,2 % (tt/tt).			- Pha động: Pha A: Acetonitril; Pha B: Nước.		
Thời gian (phút)	Pha A (% tt/tt)	Pha B (% tt/tt)	Thời gian (phút)	Pha A (% tt/tt)	Pha B (% tt/tt)
0 → 20	27	73	0 → 5	5 → 24	95 → 7
20 → 60	27 → 40	73 → 60	5 → 30	24	76
- Tốc độ dòng: 1,0 ml/phút			- Tốc độ dòng: 1,0 ml/phút		

Chuẩn bị dung dịch thử (Dược điển Trung Quốc 2015): Cân chính xác khoảng 2 g bột hy thiêm (đã qua rây 355) vào bình nón nút mài 100 ml, thêm chính xác 50,0 ml methanol, cân xác định khối lượng, đun sôi hồi lưu trong cách thủy 5 giờ, lau khô bình, để nguội về nhiệt độ phòng, cân, bổ sung methanol nếu cần, lắc đều, lọc qua màng lọc 0,45 µm, tiêm 10 µl.

Chuẩn bị dung dịch chuẩn: Chuẩn bị dung dịch chuẩn hỗn hợp kirenol và darutosid có nồng độ tương ứng khoảng 50 µl/ml và 30 µl/ml. Pha loãng dãy các dung dịch có nồng độ 20 %, 50 %, 80 %, 100 %, 120 % và 150 % so với nồng độ dung dịch chuẩn kirenol và darutosid trên.

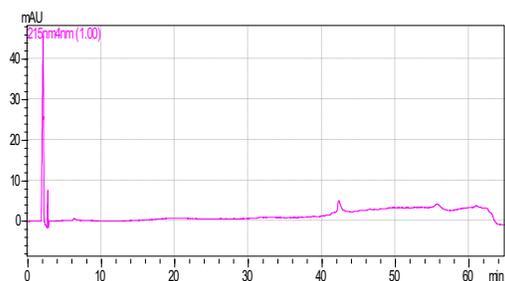
Thẩm định phương pháp: Phương pháp được đánh giá theo hướng dẫn của ICH^[9] và AOAC^[10], dựa trên khảo sát các chỉ tiêu sau: Độ đặc hiệu, độ tương thích hệ thống, tuyến tính, giới hạn phát hiện (LOD), giới hạn định lượng (LOQ), độ lặp lại, độ đúng của phương pháp.

Kết quả và bàn luận

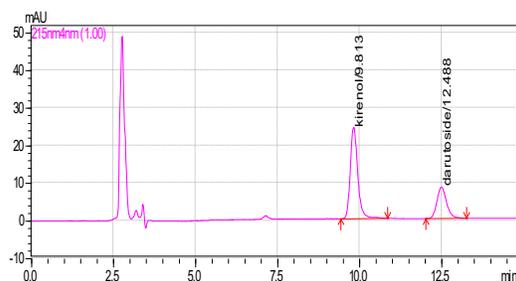
Lựa chọn chương trình HPLC

Khảo sát 2 chương trình **HPLC** theo Dược điển Hồng Kông (chương trình định tính hy thiêm bằng sắc ký vân tay)^[7] và Dược điển Trung Quốc (chương trình định lượng kirenol trong hy thiêm)^[8] để lựa chọn chương trình **HPLC** phù hợp.

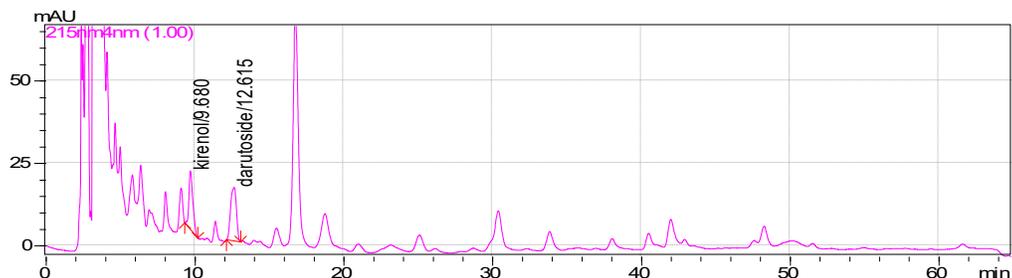
Kết quả **HPLC** theo Dược điển Hồng Kông cho thấy trong sắc ký đồ của dung dịch chuẩn: Thời gian lưu của pic kirenol và darutosid tại 9,8 phút và 12,5 phút; độ phân giải giữa hai pic là 5,71. Trong sắc ký đồ của dung dịch thử: Điều xuất hiện hai pic ở thời gian lưu là 9,7 phút và 12,6 phút. Độ tinh khiết sắc ký của pic kirenol và darutosid trên sắc ký đồ của dung dịch chuẩn và dung dịch thử đều bằng 1,0000. Phổ **UV** của pic kirenol và darutosid trên sắc ký đồ của các dung dịch thử tương ứng với phổ **UV** của pic kirenol và darutosid trên sắc ký đồ dung dịch chuẩn. Sắc ký đồ mẫu trắng không xuất hiện pic ở thời gian lưu của pic kirenol và darutosid.



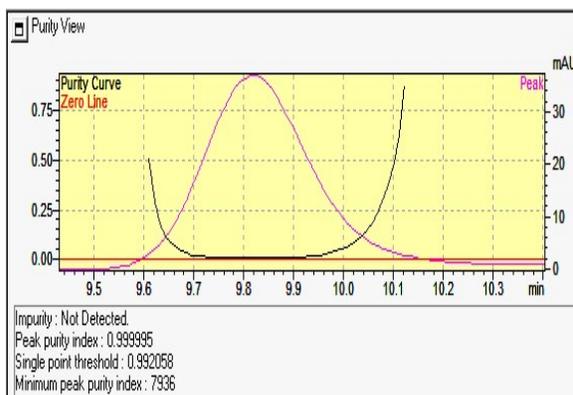
Dung môi pha mẫu



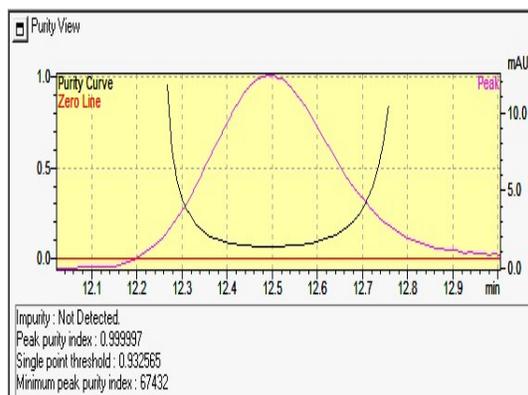
Dung dịch chuẩn



Dung dịch thử



Độ tinh khiết pic kirenol



Độ tinh khiết pic darutosid

Hình 1. Sắc ký đồ mẫu trắng, mẫu chuẩn, mẫu thử và độ tinh khiết các pic kirenol và darutosid trong dung dịch thử theo Dược điển Hồng Kông

Chương trình **HPLC** theo Dược điển Trung Quốc cho sắc ký đồ của dung dịch chuẩn: Thời gian lưu của pic kirenol và darutosid tương ứng khoảng 2,4 phút và 25,1 phút, hai pic kirenol và darutosid tách rất xa nhau. Kirenol có thời gian lưu rất ngắn khoảng 2,4 phút dễ trùng với thời gian lưu của các tạp hoặc dung môi. Do đó phương pháp này không được lựa chọn.

Như vậy, chương trình sắc ký theo Dược điển Hồng Kông được lựa chọn cho việc định tính, định lượng đồng thời kirenol và darutosid

trong hy thiêm.

Khảo sát phương pháp chuẩn bị mẫu (chiết xuất)

Mẫu thử được chuẩn bị theo Dược điển Trung Quốc thu được dịch chiết 1. Bã dược liệu còn lại thêm 50 ml methanol, đun hồi lưu cách thủy 3 giờ. Lọc lấy dịch chiết lần 2, cô trên cách thủy tới cạn. Thêm vào cồn chính xác 2 ml methanol, siêu âm để hoàn tan, lọc qua màng lọc 0,45 μm thu được dung dịch thử. Tiến hành sắc ký với chương trình **HPLC** đã chọn.

Tính toán lượng kirenol và darutosid còn lại trong dịch chiết lần 2. Kết quả cho thấy trên sắc ký đồ không xuất hiện các pic kirenol và

darutosid. Lượng kirenol và darutosid trong dịch chiết lần 2 được thể hiện ở bảng 1.

Bảng 1. Kết quả đánh giá phương pháp chiết

Chất phân tích	LOD ⁽¹⁾ (µg/ml)	Lượng trong dịch chiết 1 ⁽²⁾ (µg)	Lượng trong dịch chiết 2 (µg)	% còn lại trong dịch chiết 2 so với dịch chiết 1
Kirenol	1,7	2659,8373	< 3,4	< 0,13
Darutosid	1,3	2011,2641	< 2,6	< 0,13

Ghi chú:

⁽¹⁾ xem mục Khảo sát giới hạn phát hiện (LOD) và giới hạn định lượng (LOQ);

⁽²⁾ xem mục Khảo sát độ lặp lại, Thử 1.

Như vậy hiệu suất chiết kirenol và darutosid trong dịch chiết 1 là > 99,87 %. Phương pháp chiết đã lựa chọn theo Dược điển Trung Quốc, chỉ chiết 1 lần.

Khảo sát độ đặc hiệu

Dung dịch dung môi pha mẫu: Dung môi pha mẫu MeOH.

Dung dịch chuẩn, dung dịch thử: Chuẩn bị theo qui trình phân tích.

Dung dịch mẫu phân hủy: Tiến hành thêm vào các dung dịch thử riêng biệt các dung dịch NaOH 10 %, HCl 10 %, H₂O₂ 3 % tỉ lệ 1/20 (tt/tt); dung dịch mẫu phân hủy bởi UV được chuẩn bị bằng cách để yên dưới đèn soi UV 254 nm trong 24 giờ. Lọc qua màng lọc 0,45 µm rồi chạy sắc ký.

Kết quả cho thấy sắc ký đồ của dung dịch dung môi pha mẫu không xuất hiện pic ở thời gian lưu của pic kirenol và darutosid; pic kirenol và darutosid trong sắc ký đồ của dung dịch thử tinh khiết; không xuất hiện các pic tạp phân hủy trong các dung dịch mẫu phân hủy. Phương pháp đạt yêu cầu về độ đặc hiệu.

Khảo sát tính thích hợp của hệ thống

Tiến hành sắc ký 6 lần dung dịch chuẩn kirenol và darutosid ở nồng độ lần lượt

là 48,89 µg/ml và 30,75 µg/ml. Kết quả cho thấy thời gian lưu trung bình của kirenol và darutosid là 9,811 và 12,492 phút với giá trị RSD (%) lần lượt là 0,12 % và 0,43 %. Diện tích pic trung bình của kirenol và darutosid lần lượt là 382344 và 169074 với giá trị RSD (%) lần lượt là 0,08 % và 0,45 % (< 1 %). Trên sắc ký đồ dung dịch thử độ phân giải giữa pic kirenol và pic gần nhất là 1,38 > 1,0; độ phân giải giữa pic darutosid và pic gần nhất là 2,57 > 1,0. Như vậy chương trình **HPLC** đã lựa chọn đạt yêu cầu về tính thích hợp hệ thống.

Khảo sát độ tuyến tính

Chuẩn bị 06 dung dịch chuẩn pha trong methanol có nồng độ trong khoảng từ 20 % đến 150 % so với nồng độ dung dịch chuẩn (khoảng 50 µg/ml kirenol và 30 µg/ml darutosid). Tiến hành chạy sắc ký các dung dịch chuẩn, mỗi dung dịch tiêm 01 lần, ghi lại các sắc ký đồ và xác định đáp ứng của pic. Xác định phương trình hồi quy tuyến tính, hệ số tương quan tuyến tính giữa nồng độ chất chuẩn có trong các dung dịch chuẩn và đáp ứng pic thu được trên các sắc ký đồ bằng phương pháp bình phương tối thiểu. Kết quả được thể hiện ở bảng 2 và bảng 3

Bảng 2. Kết quả khảo sát độ tuyến tính của kirenol

Mức nồng độ	Khối lượng chuẩn kirenol (mg)	Pha loãng	Nồng độ kirenol (µg/ml)	Diện tích pic (mAU.s)
20 %	4,916	50 × 10/1,0	9,832	83269
50 %		50 × 10/2,5	24,580	201287
80 %		50 × 10/4,0	39,328	332786
100 %		50 × 10/5,0	49,160	413995
120 %		50 × 10/6,0	58,992	499706
150 %		50 × 20/15,0	73,740	613497
Phương trình hồi quy			y = 8383x + 263,9	
Hệ số tương quan			0,9996 (> 0,995)	
Hệ số chặn (intercept)			263,9	
% Hệ số chặn			0,06 % (< 2,0%)	

Bảng 3. Kết quả khảo sát độ tuyến tính của darutosid

Mức nồng độ	Khối lượng chuẩn darutosid (mg)	Pha loãng	Nồng độ kirenol ($\mu\text{g/ml}$)	Diện tích pic (mAU.s)
20 %	6,052	5 × 20 × 10/1,0	6,0314	56592
50 %		5 × 20 × 10/2,5	15,0786	134231
80 %		5 × 20 × 10/4,0	24,1257	222521
100 %		5 × 20 × 10/5,0	30,1571	278693
120 %		5 × 20 × 10/6,0	36,1885	334916
150 %		5 × 20 × 20/15,0	45,2357	411799
Phương trình hồi quy			$y = 9168,2x + 169,31$	
Hệ số tương quan			0,9995 (> 0,995)	
Hệ số chặn (intercept)			169,31	
% Y			0,06 % (< 2,0%)	

Kết quả thu được cho thấy phương pháp định lượng cả 2 chất đều có hệ số tương quan (R^2) $\geq 0,995$ và % hệ số chặn (so với đáp ứng tại nồng độ 100 %) ≤ 2 % nên đạt yêu cầu về độ tuyến tính.

Khảo sát giới hạn phát hiện (LOD) và giới hạn định lượng (LOQ)

Từ kết quả phân độ tuyến tính, tiến hành phân tích thống kê (phần mềm Excel) để xác định độ lệch chuẩn số dư (= Standard

error), ngoại suy ước tính với kirenol có LOD = 1,7 $\mu\text{g/ml}$, LOQ = 5,1 $\mu\text{g/ml}$ ngoại suy ước tính với darutosid có LOD = 1,1 $\mu\text{g/ml}$, LOQ = 3,3 $\mu\text{g/ml}$. Pha loãng dung dịch thử Hy thêm đến nồng độ kirenol = 1,7 $\mu\text{g/ml}$ và darutosid = 1,3 $\mu\text{g/ml}$ để thẩm định LOD; nồng độ kirenol = 5,1 $\mu\text{g/ml}$ và darutosid = 3,9 $\mu\text{g/ml}$ để thẩm định LOQ. Kết quả thẩm định thực được thể hiện ở bảng 4.

Bảng 4. Kết quả thẩm định giá trị LOD, LOQ trên mẫu hy thêm

	Kirenol		Darutosid	
	1,7 $\mu\text{g/ml}$	5,1 $\mu\text{g/ml}$	1,3 $\mu\text{g/ml}$	3,9 $\mu\text{g/ml}$
RSD (%)	0,35 (n = 3)	0,27 (n = 6)	1,04 (n = 3)	0,66 (n = 6)
Tín hiệu/nhiều nền	6,8 > 3,3	10,5 > 10,0	4,2 > 3,3	10,1 > 10,0

Kết quả cho thấy phương pháp định lượng có LOD, LOQ cho kirenol là 1,7 $\mu\text{g/ml}$ và 5,1 $\mu\text{g/ml}$; cho darutosid là 1,3 $\mu\text{g/ml}$ và 3,9 $\mu\text{g/ml}$.

Khảo sát độ lặp lại

Tiến hành định lượng kirenol và darutosid trong mỗi mẫu dược liệu với điều kiện sắc ký và cách xử lý mẫu theo quy trình phân tích. Lặp lại thí nghiệm 6 lần độc lập, tính kết quả định lượng theo dung dịch chuẩn ở mục "Tính thích hợp hệ thống". Kết quả khảo sát độ lặp lại cho thấy mẫu thử chứa 0,118 % kirenol và 0,089 % darutosid với RSD tương ứng là 0,78 % và 1,47 % (< 3 %), do đó phương pháp đã lựa chọn có độ lặp lại phù hợp để định lượng đồng thời kirenol và darutosid trong hy thêm.

Khảo sát độ đúng

Độ đúng của phương pháp được xác định bằng cách phân tích các mẫu tự tạo thêm chuẩn vào nền mẫu dược liệu hy thêm, xác định lượng

chất chuẩn thu hồi.

Mẫu tự tạo thêm chuẩn kirenol: Chuẩn bị mẫu tự tạo tại 3 mức nồng độ 30 %, 100 % và 150 % so với nồng độ định lượng bằng cách thêm chính xác một lượng chất chuẩn kirenol vào nền mẫu là mẫu thử chứa khoảng 25 % lượng hoạt chất (với độ đúng ở 30 %) và khoảng 50 % lượng hoạt chất (với độ đúng ở 100 % và 150 %). Tại mỗi mức nồng độ, thực hiện 03 lần độc lập.

Mẫu tự tạo thêm chuẩn darutosid: Chuẩn bị mẫu tự tạo 3 mức nồng độ 30 %, 100 % và 160 % so với nồng độ định lượng bằng cách thêm chính xác một lượng chất chuẩn darutosid vào nền mẫu là mẫu thử chứa khoảng 25 % lượng hoạt chất (với độ đúng ở 30 %) và khoảng 50 % lượng hoạt chất (với độ đúng ở 100 % và 160 %). Tại mỗi mức nồng độ, thực hiện 03 lần thí nghiệm độc lập.

Tiến hành định lượng các mẫu tự tạo theo qui trình phân tích. Xác định hàm lượng hoạt chất trong các mẫu tự tạo (tức lượng hoạt chất tìm thấy), sử dụng dung dịch chuẩn có hàm lượng kirenol là 49,16 µg/ml, diện tích pic kirenol là: 413711 mAU.s (RSD% = 0,16) và hàm lượng darutosid là: 30,16 µg/ml, diện tích pic darutosid

là: 278162 mAU.s (RSD% = 0,33). Dựa vào hàm lượng hoạt chất đã biết trong mẫu thử (Khảo sát độ lặp lại), hàm lượng của chất chuẩn thêm vào và căn cứ vào diện tích pic trên sắc ký đồ để tính hàm lượng thu hồi của kirenol và darutosid. Kết quả độ đúng được trình bày ở bảng 5.

Bảng 5. Kết quả đánh giá độ thu hồi kirenol và darutosid

Lượng cân thử (mg)	Lượng có sẵn (µg/ml)		Lượng thêm vào (µg/ml)		Diện tích pic (mAu.s)		Lượng tìm lại (µg/ml)		% thu hồi	
	Kirenol	Darutosid	Kirenol	Darutosid	Kirenol	Darutosid	Kirenol	Darutosid	Kirenol	Darutosid
536,67	12,3602	9,3225	3,1272	1,7199	131125	100564	15,5812	10,9027	100,61	98,74
551,72	12,7068	9,5839	3,1272	1,7199	130771	101514	15,5391	11,0057	98,14	97,36
540,31	12,4440	9,3857	3,1272	1,7199	129845	102021	15,4291	11,0607	99,09	99,60
Trung bình									99,28	98,56
RSD%									1,25	1,14
1083,1	24,9451	18,8146	26,0600	11,4659	433711	276690	51,0051	29,9975	101,04	99,07
1105,8	25,4679	19,2089	26,0600	11,4659	429914	277145	51,5279	30,0469	99,14	97,95
1072,1	24,6918	18,6235	26,0600	11,4659	429231	275891	50,7518	29,9109	100,50	99,41
Trung bình									100,23	98,81
RSD%									0,98	0,77
1067,4	24,5835	18,5418	52,1200	29,8113	640587	452875	76,1190	49,0987	99,24	101,54
1052,4	24,2381	18,2813	52,1200	29,8113	641111	450146	76,3581	48,8029	99,77	101,48
1081,3	24,9037	18,7833	52,1200	29,8113	641589	452123	76,2380	49,0172	98,98	100,87
Trung bình									99,33	101,30
RSD%									0,40	0,37
Trung bình (n = 9)									99,61	99,56
RSD% (n = 9)									0,94	1,49

Kết quả khảo sát độ đúng cho thấy tỷ lệ % tìm lại hoạt chất đều nằm trong khoảng từ 98,0 % đến 102,0 % với RSD ≤ 2,0 %. Vậy phương pháp phân tích đã xây dựng đạt yêu cầu về độ đúng trong khoảng nồng độ được khảo sát.

Khảo sát hàm lượng một số mẫu hy thiêm thu hái ở Việt Nam

Phương pháp định lượng đồng thời kirenol và darutosid trên được áp dụng để phân tích hàm lượng 3 mẫu hy thiêm được trồng tại Việt Nam (VN1–VN3). Kết quả nêu ra tại bảng 6.

Bảng 6. Hàm lượng kirenol và darutosid trong mẫu hy thiêm Việt Nam

Chất phân tích	Hàm lượng (% kl/kl)		
	VN1	VN2	VN3
Kirenol	0,239 ± 0,0033 % (n = 3)	0,118 ± 0,0009 % (n = 6)	0,049 ± 0,0016 % (n = 3)
Darutosid	0,066 ± 0,0021 % (n = 3)	0,089 ± 0,0013 % (n = 6)	0,050 ± 0,0016 % (n = 3)

Ghi chú: VN1 – mẫu hy thiêm trồng tại Xã Thành Hưng, Huyện Thạch Thành, Tỉnh Thanh Hóa, thu hái tháng 4 năm 2019; VN2 – mẫu hy thiêm trồng tại Xã Thành Hưng, Huyện Thạch Thành, Tỉnh Thanh Hóa, thu hái tháng 6 năm 2020; VN3 – mẫu hy thiêm trồng tại Xã Quảng Thành, Thành phố Thanh Hóa thu hái tháng 6 năm 2020.

Kết luận

Nhóm nghiên cứu đã xây dựng và thẩm định được phương pháp định tính, định lượng đồng thời kirenol và darutosid trong dược liệu hy thiêm bằng **HPLC-PAD**. Phương pháp **HPLC** được xây dựng đảm bảo độ đặc hiệu; khoảng tuyến tính với kirenol là 9 µg/ml – 75 µg/ml, với darutosid là 6 µg/ml – 45 µg/ml; độ đúng với kirenol là 98,14 -101,04 %, với darutosid là 97,36 - 101,54 %; giới hạn phát hiện với kirenol là 1,7 µg/ml, với darutosid là 1,3 µg/ml, đáp ứng các yêu cầu của AOAC [10]. Phương pháp này có thể được áp dụng để định tính, định lượng hai thành phần chính kirenol và darutosid trong dược liệu hy thiêm và sản phẩm chứa hy thiêm.

Nghiên cứu được tài trợ bởi Bộ Khoa học và Công nghệ (Nhiệm vụ khoa học và công nghệ cấp Bộ, mã số 01.2020M001).

Tài liệu tham khảo

1. Bộ Y tế (2017), *Dược điển Việt Nam V*, Nhà xuất bản Y học, Hà Nội, tập 2, tr. 1206-1207.

2. Phương Thiện Thương, Nguyễn Thị Hà Ly, Nguyễn Thị Phương, Nguyễn Thị Bích Thu (2018), *Lựa chọn chất đối chiếu trong kiểm nghiệm chất lượng Dược liệu và sản phẩm từ Dược liệu: Một số đóng góp từ nghiên cứu khoa học*, Hội thảo nâng cao năng lực nghiên cứu, kiểm tra giám sát chất lượng dược liệu và thuốc từ dược liệu trong thời kỳ hội nhập, Đà Nẵng: Viện Kiểm nghiệm Thuốc thành phố Hồ Chí Minh.

3. Rui Wang, Wen-Hao Chen, and Yan-Ping Shi (2010), “*ent*-Kaurane and *ent*-Pimarane Diterpenoid from *Siegesbeckia pubescens*”, *Journal of Natural Products*, 73 (1), pp. 17-21.

4. Xiang Ying, Hua Zhang, Cheng-Qi Fan and Jian-Min Yue (2004), “Novel diterpenoids and diterpenoid glycosides from *Siegesbeckia orientalis* L.”, *Journal of Natural Products*, 67 (9), pp. 1517-1521.

5. Jian-ping Wang, Ya-ming Zhou, Yu-jie Ye, Xian-mei Shang, Ya-ling Cai, Chao-mei Xiong, Yun-xia Wu, Hai-xing Xu (2011), “Topical anti-inflammatory and analgesic activity of kirenol isolated from *Siegesbeckia orientalis*”, *Journal of Ethnopharmacology*, 137 (3), pp. 1089-1094.

6. Lintner Karl (1998), “Demonstrating the cosmetic activity of darutosid, esculoside and ursolic acid”, *Cosmetics and Toiletries Magazine*, 113, pp. 67.

7. Department of Health Hong Kong Special Administrative Region (2005), *Hong Kong Chinese Materia Medica Standards: Hong Kong*, vol 8, pp. 443-461.

8. Health Ministry of China (2015), *Pharmacopoeia of the People Republic of China: China*, Vol IA, pp. 425.

9. ICH (1996), *Validation of Analytical Procedures: Text and methodology*, ICH Harmonised Tripartite Guideline.

10. AOAC (2012), *Guidelines for Single Laboratory Validation of Chemical Methods for Dietary Supplements and Botanicals*.