



XÂY DỰNG QUY TRÌNH ĐỊNH LƯỢNG ĐỒNG THỜI RUTIN VÀ HEDERACOSIDE C TRONG SIRO TRỊ HO TỪ CAO CHIẾT LÁ THƯỜNG XUÂN (*HEDERA HELIX* L. ARALIACEAE)

Võ Văn Lệnh^{1a}, Nguyễn Việt Cường¹, Dương Đặng Trà My¹

¹Khoa Dược, Đại học Lạc Hồng

^alenhvophar@gmail

TÓM TẮT: Thường xuân (*Hedera helix* L.) là một loài thực vật thuộc họ Nhân sâm (Araliaceae) có nguồn gốc từ vùng ôn đới. Cao chiết Thường xuân có tác dụng điều trị ho và viêm đường hô hấp nhờ thành phần chính là các flavonoid và saponin^[1]. Đề tài xây dựng quy trình định lượng đồng thời rutin và hederacoside C (HdC) trong siro trị ho từ cao chiết Thường xuân. Quy trình được thẩm định tính tương thích hệ thống, tính đặc hiệu, tính tuyến tính, độ chính xác và độ đúng theo hướng dẫn của ICH (International Conference on Harmonization). Từ đó, ứng dụng quy trình phân tích để kiểm tra chất lượng các chế phẩm chứa cao lá Thường xuân trên thị trường và các nguồn nguyên liệu lá Thường xuân.

ABSTRACT: Ivy (*Hedera helix* L.) is a species of plant in the Araliaceae family. Ivy extract has the effect of treating cough and inflammation in the respiratory tract. Main ingredients are flavonoids and saponins. The purpose of this paper is building the quantitative procedure of rutin and hederacoside C in syrup from Ivy extract. The procedure was validated for system compatibility, specificity, linearity, accuracy, and accuracy according to ICH guideline. Since, applying the analytical process to check the quality of products containing ivy leaf extract in the market and the ivy leaf extract.

TỪ KHOA: Thường xuân, rutin, hederacoside C, HPLC.

KEYWORDS: Ivy, rutin, hederacoside C, HLPC.

1. GIỚI THIỆU

Thường xuân (*Hedera helix* L.) thuộc họ Nhân sâm (Araliaceae) là một loại dây leo, có nguồn gốc từ châu Âu, bắc Mỹ, hiện đang được du nhập và trồng nhiều tại Trung Quốc. Ở Việt Nam, thường xuân được trồng nhiều tại Đà Lạt với mục đích làm cây cảnh^[2].

Cao lá Thường xuân (*Hedera helix* L.) có tác dụng rõ rệt trong điều trị ho và viêm đường hô hấp nhờ các thành phần có hoạt tính là nhóm saponin và flavonoid cụ thể là hederacosid C, α -hederin và rutin^[1,2]. Siro ho chứa cao lá thường xuân nhập khẩu từ châu Âu có thị phần rất lớn tại Việt Nam. Do đó, hàng loạt sản phẩm siro chứa cao lá thường xuân nội địa đã được đưa ra thị trường. Vấn đề chất lượng của các sản phẩm này chưa được kiểm soát chặt chẽ, cụ thể là nguyên liệu dược liệu thô và cao lá thường xuân chưa có chuyên luận trong Dược Điển Việt Nam, nguồn gốc không rõ ràng. Việc xác định hàm lượng thành phần có hoạt tính trong các chế phẩm là thực sự cần thiết để đánh giá chất lượng sản phẩm, đặc biệt là định lượng đồng thời nhóm flavonoid và saponin trong dược liệu bằng cùng một quy trình phân tích sẽ tạo điều kiện rất thuận lợi để kiểm tra chất lượng các chế phẩm từ cao lá Thường xuân. Vì vậy, một quy trình định lượng đồng thời hederacosid C và rutin trong một số siro trị chứa cao lá Thường xuân (*Hedera helix*) trên thị trường đã được xây dựng.

2. ĐỐI TƯỢNG, PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1 Đối tượng nghiên cứu

Năm mẫu siro đang lưu hành trên thị trường được mã hóa là A, B, C, D, E. Số lượng đơn vị mỗi mẫu lấy theo quy định, các đơn vị được lấy có cùng số lô.

Chất đối chiếu rutin của Viện kiểm thuốc thành phố Hồ Chí Minh, hàm lượng 88,2% lô QT152 050417. Hederacoside C của Sigma Aldrich, hàm lượng 91,0 % lô BCCB2891.

2.2 Phương pháp nghiên cứu

Dung môi pha loãng: hỗn hợp acetonitril - nước cất hai lần (20:80).

Chuẩn bị mẫu đối chiếu rutin: cân chính xác khoảng 20 mg chất đối chiếu rutin, hòa tan trong bình định mức 100ml với methanol. Lấy chính xác 5 ml dung dịch vừa thu được, pha loãng với dung môi pha loãng trong bình định mức 100 thu được dung dịch rutin đối chiếu gốc.

Chuẩn bị mẫu đối chiếu hederacoside C: Cân chính xác khoảng 20 mg chất đối chiếu hederacoside C, hòa tan trong bình định mức 100ml với methanol thu được dung dịch hederacoside đối chiếu gốc.

Chuẩn bị mẫu đối chiếu hỗn hợp: Lấy chính xác 10 ml dung dịch rutin đối chiếu gốc và 10ml dung dịch hederacoside C đối chiếu gốc, pha loãng trong bình định mức 50ml với dung môi pha loãng. Lọc dung dịch thu được bằng màng lọc 0,45 μ m. Dung dịch hỗn hợp đối chiếu thu được để tiêm vào máy HPLC có nồng độ rutin khoảng 2 mcg/ml và hederacoside C khoảng 40 mcg/ml.

Chuẩn bị mẫu thử: Trộn đều 5 đơn vị siro của mỗi trong 5 mẫu khảo sát. Lấy chính xác 10ml siro, pha loãng trong bình định mức 50ml với dung môi pha loãng. Lấy chính xác 5 ml dung dịch thu được, tiếp tục pha loãng trong bình định mức 25ml với dung môi pha loãng. Lọc dung dịch thử thu được qua màng lọc 0,45 μ m.

Quy trình định lượng thực hiện trên máy sắc ký lỏng hiệu năng cao Agilent 1260 với cột sắc ký Phenomenex Gemini C18 (250 x 4,6 mm, 5 μ m), đầu dò phát hiện DAD ở bước sóng 205nm. Nhiệt độ cột 30°C, thể tích tiêm mẫu 50 μ l, tốc độ dòng 1 ml/phút. Dung môi pha loãng gồm acetonitril và

Received: January 3rd, 2021

Accepted: May 13th, 2021

*Corresponding Author

Email: lenhvophar@gmail

dung dịch acid phosphoric 0,2%^[3,4], chạy theo chương trình gradient ở bảng 1.

Bảng 1. Chương trình gradient

Thời gian (phút)	% ACN	% acid phosphoric 0,2%
0	19,5	80,5
7,5	19,5	80,5
11,5	28,5	71,5
26	28,5	71,5
28	19,5	80,5
33	19,5	80,5

Hàm lượng rutin và hederacoside C trong siro được tính theo công thức (1).

$$X (mcg/ml) = \frac{St}{Sc} \times \frac{mc}{Nc} \times Nt \times 1000 \quad (1)$$

Trong đó: Sc là diện tích pic rutin hoặc hederacoside C trong sắc ký đồ mẫu đối chiếu.

St là diện tích pic rutin hoặc hederacoside C trong sắc ký đồ mẫu thử.

mc là khối lượng cân rutin hoặc hederacoside C đối chiếu (mg).

Nc là độ pha loãng mẫu đối chiếu.

Nt là độ pha loãng mẫu thử.

Quy trình định lượng đồng thời rutin và hederacoside C trong siro được thẩm định: tính tương thích của hệ thống, tính đặc hiệu, tính tuyến tính, độ lặp lại, độ chính xác trung gian, độ đúng theo hướng dẫn của ICH^[5].

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1 Tính tương thích hệ thống

Tiến hành sắc ký 6 lần liên tiếp mẫu dung dịch đối chiếu. Kết quả RSD% của thời gian lưu và diện tích pic rutin và hederacoside C thu được sau 6 lần sắc ký nhỏ hơn 2% (Bảng 2). Các thông số sắc ký như hệ số dung lượng k', hệ số đối xứng As, số đĩa lý thuyết N, độ phân giải Rs đều đạt yêu cầu. Quy trình định lượng đạt tính tương thích hệ thống.

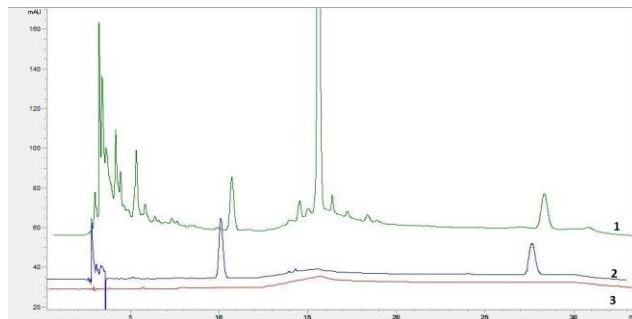
Bảng 2. Kết quả tính tương thích hệ thống

STT	Rutin		Hederacoside C	
	t _R (phút)	Spic (mAU*s)	t _R (phút)	Spic (mAU*s)
1	9,926	478,228	27,320	408,877
2	9,951	478,880	27,419	412,263
3	9,959	478,945	27,462	411,880
4	10,051	477,435	27,692	412,292
5	10,075	476,669	27,645	413,552
6	10,001	477,435	27,607	411,675
TB	9,994	477,932	27,524	411,757
RSD%	0,593	0,190	0,530	0,378

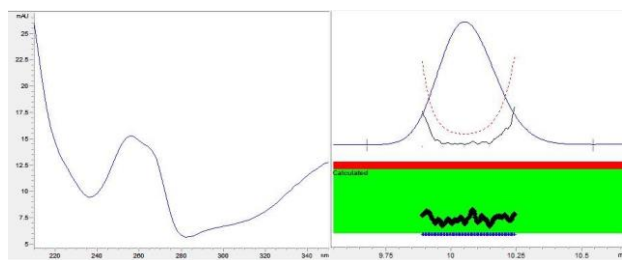
3.2 Tính đặc hiệu

Tiến hành sắc ký mẫu đối chiếu, mẫu thử, mẫu thử thêm đối chiếu, mẫu dung môi. Kết quả cho thấy sắc ký đồ mẫu

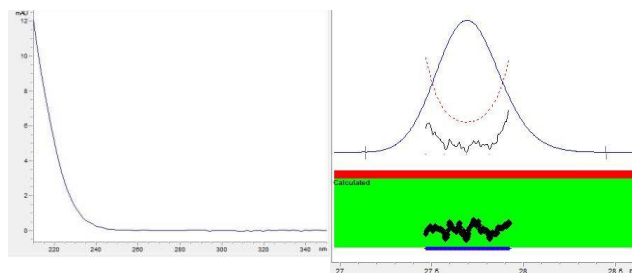
đối chiếu cho pic có thời gian lưu tương đương pic trong sắc ký đồ mẫu thử. Phổ UV của pic trong sắc ký đồ mẫu đối chiếu và mẫu thử có hình dạng giống nhau và có cùng bước sóng hấp thụ cực đại. Độ tinh khiết các pic đều đạt yêu cầu. Mẫu thử thêm đối chiếu cho pic có diện tích lớn hơn pic trong sắc ký đồ mẫu đối chiếu và mẫu thử. Mẫu dung môi không cho pic tại thời gian lưu tương ứng với pic trong sắc ký đồ mẫu đối chiếu. Quy trình định lượng có tính đặc hiệu (Hình 1, 2 và 3).



Hình 1. Sắc ký đồ của mẫu thử (1), mẫu đối chiếu (2) và mẫu dung môi (3)



Hình 2. Phổ UV và độ tinh khiết của pic rutin trong mẫu thử



Hình 3. Phổ UV và độ tinh khiết của pic hederacoside C trong mẫu thử

3.3 Tính tuyến tính

Tiến hành sắc ký các mẫu dung dịch đối chiếu ở các mức nồng độ khoảng 20 - 250% so với nồng độ định lượng. Sử dụng trắc nghiệm thống kê F cho thấy nồng độ rutin và hederacoside C có trong các dung dịch đối chiếu tương quan chặt chẽ với diện tích pic thu được trên sắc ký đồ (Bảng 3). Kiểm tra ý nghĩa của các hệ số trong phương trình hồi quy bằng phép kiểm t cho thấy các hệ số b tự do không có ý nghĩa thống kê ($\alpha = 0,05$).

Bảng 3. Kết quả tính tuyến tính

Rutin (µg/ml)	Spic rutin (mAU*s)	Hederacoside C (µg/ml)	Spic hederacoside C (mAU*s)
0,392	79,765	6,552	66,441
1,175	240,602	19,656	208,506
2,350	475,801	39,312	410,726
3,524	716,716	58,968	615,337
5,874	1200,535	98,280	1037,201

3.4 Độ lặp lại

Tiến hành sắc ký 6 mẫu thử được chuẩn bị riêng biệt. Kết quả cho thấy hàm lượng rutin và hederacoside C trong siro thu được cho RSD nhỏ hơn 2% (Bảng 4). Quy trình đạt yêu cầu về độ lặp lại.

Bảng 4. Kết quả độ lặp lại

	Spic rutin (mAU*s)	HL rutin (mcg/ml)	Spic HdC (mAU*s)	HL HdC (mcg/ml)
	412,956	50,983	459,174	1098,728
	414,440	51,166	459,639	1099,841
	413,303	51,025	458,367	1096,797
	412,707	50,952	456,738	1092,899
	412,262	50,897	460,018	1100,748
	417,195	51,506	468,280	1120,517
TB		51,088		1101,588
RSD%		0,438		0,879

3.5 Độ chính xác trung gian

Thực hiện quy trình định lượng với hai kiểm nghiệm viên khác nhau, mỗi người chuẩn bị 6 mẫu thử riêng biệt và ở hai ngày làm việc khác nhau. Kết quả cho thấy hàm lượng rutin và hederacoside C thu được của hai kiểm nghiệm viên khác nhau không có ý nghĩa thống kê ($\alpha = 0,05$) (Bảng 5). Như vậy quy trình định lượng đạt độ chính xác trung gian.

Bảng 5. Kết quả độ chính xác trung gian

	Spic rutin (mAU*s)	HL rutin (mcg/ml)	Spic HdC (mAU*s)	HL HdC (mcg/ml)
	412,042	50,870	460,130	1101,016
	418,098	51,617	467,367	1118,333
	412,282	50,899	458,094	1096,151
	411,107	50,754	457,713	1095,232
	410,859	50,724	453,831	1085,943
	419,632	51,807	460,323	1101,477
TB		51,112		1099,692
RSD%		0,926		0,974

3.6 Độ đúng

Chuẩn bị các mẫu thử thêm đối chiếu ở các nồng độ 80%, 100% và 120% so với nồng độ định lượng. Mỗi nồng độ thực hiện 3 mẫu riêng biệt. Tiến hành sắc ký các mẫu trên. Kết quả cho thấy tỷ lệ hồi phục ở các mức nồng độ đều nằm trong khoảng 98 - 102%. RSD% của các tỷ lệ hồi phục đều nhỏ hơn 2% (Bảng 6 và 7). Quy trình đạt yêu cầu về độ đúng.

Bảng 6. Kết quả độ đúng đối với rutin

Mức nồng độ	Lượng đối chiếu thêm vào (mcg/ml)	Spic rutin (mAU*s)	Lượng đối chiếu tìm thấy (mcg/ml)	Tỷ lệ hồi phục (%)
80%	1,88	798,561	1,900	101,08
	1,88	798,659	1,900	101,11
	1,88	798,203	1,898	100,99
TB				101,057
RSD%				0,062
100%	2,35	891,852	2,361	100,47
	2,35	892,263	2,363	100,56
	2,35	892,319	2,363	100,57
TB				100,532
RSD%				0,053
120%	2,82	989,847	2,845	100,89
	2,82	992,977	2,860	101,44
	2,82	990,530	2,848	101,01
TB				101,112
RSD%				0,285

Bảng 7. Kết quả độ đúng đối với hederacoside C

Mức nồng độ	Lượng đối chiếu thêm vào (mcg/ml)	Spic rutin (mAU*s)	Lượng đối chiếu tìm thấy (mcg/ml)	Tỷ lệ hồi phục (%)
80%	31,450	788,296	31,387	99,80
	31,450	786,997	31,263	99,41
	31,450	787,489	31,310	99,56
TB				99,587
RSD%				0,20
100%	39,312	871,165	39,319	100,02
	39,312	870,755	39,279	99,92
	39,312	870,991	39,302	99,97
TB				99,970
RSD%				0,05
120%	47,174	955,671	47,407	100,49
	47,174	955,546	47,395	100,47
	47,174	958,445	47,673	101,06
TB				100,672
RSD%				0,33

3.7 Ứng dụng quy trình cho một số chế phẩm siro

Quy trình sau khi thẩm định được ứng dụng để xác định hàm lượng rutin và hederacoside C trong một số chế phẩm siro.

Bảng 8. Kết quả hàm lượng rutin và hederacoside C trong một số siro

Mẫu siro	HL rutin (mcg/ml)	HL Hederacoside C (mcg/ml)
A	51,284	1107,405
B	-	-
C	6,642	-
D	17,383	764,750
E	11,852	-

Dấu “-“ : không phát hiện

Kết quả định lượng cho thấy chỉ có mẫu siro A và B có chứa rutin và HdC, tuy nhiên mẫu B hàm lượng cả hai chất đều thấp hơn gần $\frac{1}{2}$ so với mẫu A. Các mẫu còn lại đều không phát hiện vết HdC cùng với đó là hàm lượng rutin rất thấp.

4. KẾT LUẬN

Đề tài đã xây dựng và thẩm định quy trình định lượng đồng thời rutin và hederacoside C trong siro trị ho từ cao chiết Thường xuân. Ứng dụng quy trình xác định được hàm lượng hai chất này trong một số mẫu siro trên thị trường. Quy trình phân tích này có thể được ứng dụng để định lượng cao chiết, thành phẩm chứa cao lá Thường xuân trên thị trường, góp phần xây dựng tiêu chuẩn chất lượng cho các sản phẩm từ cao lá Thường xuân.

Từ kết quả định lượng chỉ ra rằng nhiều sản phẩm trị ho với tuyên bố có chứa cao lá Thường xuân trên thị trường hiện nay có khả năng cao được sản xuất từ nguồn nguyên liệu lá Thường xuân không đạt chất lượng hoặc thực sự không chứa cao lá Thường xuân.

5. TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Julia Lutsenko, *Heba polonica Journal*, Hedera helix as medical plant, Vol. 56 No. 1, 2010.
- [2] Bezruk, I., Marksa, M., Georgiyants, V., Ivanauskas, L., & Raudone, L. (2020). Phytogeographical profiling of ivy leaf (*Hedera helix* L). *Industrial Crops & Products*, 154, 112713.
- [3] Miao Yu, Young June Shin, Nanyoung Kim, Guijeae Yoo, Determination of saponins and flavonoids in Ivy leaf extracts using HPLC-DAD, *Journal of chromatographic science*, **2015**, 53(4), 478-483.
- [4] Ola M. Abdallah, Amira A. Motaal, Sara A. A. Elbahrawy, Development of a validated reversed phase HPLC-UV method for a simultaneous determination of hederacoside C and thymol in Ivy-thyme cough syrup, *Chemistry research journal*, **2018**, 3(2), 33-41.
- [5] ICH harmonised tripartite guideline, Validation of analytical procedures: Text and methodology, 2005.