



Original Article

Simultaneous Quantification of Acid chlorogenic, Acid caffeic and Rutin in *Herba Siegesbeckiae orientalis* by HPLC Method

Tran Thi Van Anh^{1,*}, Pham Quoc Tuan¹, Nguyen Van Khanh², Dao Viet Hung¹,
Nguyen Thanh Hai², Tran Van Thao³, Nguyen Thi Hong Nhung²,
Ngo Thi Xuan Thinh¹, Ha Thanh Hoa¹, Nguyen Xuan Truong⁴

¹Phu Tho College of Medicine and Pharmacy, 2201 Hung Vuong, Gia Cam, Viet Tri, Phu Tho, Vietnam

²VNU University of Medicine and Pharmacy, 144 Xuan Thuy, Cau Giay, Hanoi, Vietnam

³Golden Dragon Pharmaceutical Co., Ltd, 165 Cau Giay, Dich Vong, Cau Giay, Hanoi, Vietnam

⁴East Asia University of Technology, University Village, Vo Cuong, Bac Ninh, Vietnam

Received 16 May 2023

Revised 25 May 2023; Accepted 10 June 2023

Abstract: *Herba Siegesbeckiae* is a medicinal material derived from the aerial part of *Siegesbeckia orientalis*, which is used to treat various types of pain such as back, knees, bones, joints, and numbness of limbs. This plant contains several phenolic compounds, including chlorogenic acid (1), caffeic acid (2), and rutin (3). They were chosen as marker compounds to develop a quantification method. In this study, a high-performance liquid chromatography (HPLC) method with a DAD detector was used to simultaneously quantify these three compounds (1-3). The Agilent C18 column (250 x 4.6 mm; 5 µm) was used for the separation of the analytes, and the mobile phase consisted of MeCN - 0.1% phosphoric acid in water with gradient elution. The flow rate was 1.0 ml/min, and the detection wavelength was 320 nm for 1 and 2, and 360 nm for 3. The injection volume was 20 µl. The method was validated according to the guidelines of ICH and AOAC on system suitability, specificity, linearity, precision, and accuracy. The established quantification method was applied to determine the content of compounds 1, 2, and 3 in samples of *Herba Siegesbeckiae*, which were found to be 0.09-0.82 mg/g, 0.02-0.21 mg/g, 0.07-0.52 mg/g, respectively. This quantification method can be used to assess the quality of *Herba Siegesbeckiae* and related products.

Keywords: *Herba Siegesbeckiae*; chlorogenic acid; caffeic acid; rutin; HPLC.

* Corresponding author.

E-mail address: anhthu23081985@gmail.com

<https://doi.org/10.25073/2588-1132/vnumps.4522>

Định lượng đồng thời acid chlorogenic, acid caffeic và rutin trong dược liệu Hy thiêm bằng phương pháp HPLC

Trần Thị Vân Anh^{1,*}, Phạm Quốc Tuấn¹, Nguyễn Văn Khanh², Đào Việt Hưng¹,
Nguyễn Thanh Hải², Trần Văn Thảo³, Nguyễn Thị Hồng Nhung²,
Ngô Thị Xuân Thịnh¹, Hà Thanh Hòa¹, Nguyễn Xuân Trường⁴

¹Trường Cao đẳng Y Dược Phú Thọ, 2201 Hùng Vương, Gia Cẩm, Việt Trì, Phú Thọ, Việt Nam

²Trường Đại học Y Dược, Đại học Quốc gia Hà Nội, 144 Xuân Thủy, Cầu Giấy, Hà Nội, Việt Nam

³Công ty Trách nhiệm Hữu hạn Dược phẩm Rồng Vàng,

165 Cầu Giấy, Dịch Vọng, Cầu Giấy, Hà Nội, Việt Nam

⁴Trường Đại học Công nghệ Đông Á, Làng Đại học, Võ Cường, Bắc Ninh, Việt Nam

Nhận ngày 16 tháng 5 năm 2023

Chỉnh sửa ngày 25 tháng 5 năm 2023; Chấp nhận đăng ngày 10 tháng 6 năm 2023

Tóm tắt: Dược liệu Hy thiêm là phần trên mặt đất của cây Hy thiêm, được sử dụng làm thuốc điều trị đau lưng, gối, xương khớp, chân tay tê buốt. Trong Hy thiêm chứa nhiều phenolic như acid chlorogenic (**1**), acid caffeic (**2**) và rutin (**3**) và chúng được lựa chọn làm chất marker để xây dựng phương pháp định lượng. Trong nghiên cứu này, phương pháp định lượng đồng thời **1-3** bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao với đầu dò DAD được xây dựng. Cột sắc ký sử dụng tách các chất là Agilent C18 (250 x 4,6 mm; 5 μ m) được duy trì ở nhiệt độ $25 \pm 0,1$ °C. Pha động gồm MeCN - acid phosphoric 0,1% trong nước, được rửa giải theo chế độ gradient. Tốc độ dòng là 1,0 ml/phút. Bước sóng phát hiện là 320 nm đối với chất **1** và **2**, 360 nm đối với chất **3**. Thể tích tiêm là 20 μ l. Phương pháp được thẩm định và đạt các yêu cầu theo hướng dẫn của ICH, AOAC về tính tương thích hệ thống, độ đặc hiệu, khoảng tuyến tính, độ chính xác và độ đúng. Áp dụng phương pháp định lượng đã xây dựng, xác định được hàm lượng các chất **1**, **2**, **3** trong các mẫu Hy thiêm lần lượt là 0,09-0,82 mg; 0,02-0,21 mg/g và 0,07-0,52 mg/g. Phương pháp định lượng này có thể góp phần đánh giá chất lượng dược liệu Hy thiêm và các sản phẩm liên quan.

Từ khóa: Dược liệu Hy thiêm; acid chlorogenic; acid caffeic; rutin; HPLC.

1. Mở đầu

Chi *Siegesbeckia* (*Sigesbeckia*) thuộc họ Cúc (Asteraceae) trên thế giới có khoảng 4 loài [1], ở Việt Nam có 2 loài là *S. integrifolia* (Hy thiêm lá nguyên) và *S. orientalis* (Hy thiêm) [2].

Cây Hy thiêm (Cỏ dĩ, Chó đẻ hoa vàng, Cứt lợn, Cỏ bà a,...) có tên khoa học là *Siegesbeckia*

orientalis L. được phân bố ở vùng có khí hậu cận nhiệt đới và nhiệt đới. Ở Việt Nam, cây phân bố chủ yếu ở vùng núi và trung du phía Bắc, độ cao dưới 1.500 m [3]. Dược liệu Hy thiêm (*Herba Siegesbeckiae*) là bộ phận trên mặt đất đã phơi hay sấy khô của cây Hy thiêm. Theo Y học cổ truyền, Hy thiêm có tính hàn, vị khổ, qui vào kinh can, thận; công năng: trừ phong thấp, thanh

* Tác giả liên hệ.

Địa chỉ email: anhthu23081985@gmail.com

<https://doi.org/10.25073/2588-1132/vnumps.4522>

nhệt, giải độc; được sử dụng để điều trị đau lưng, gối, xương khớp, chân tay tê buốt, mụn nhọt [4].

Các công trình nghiên cứu về thành phần hóa học chỉ ra rằng trong Hy thiêm chứa các nhóm chất chính là sesquiterpenoid, diterpenoid (kirenol, darutoside, darutigenol), flavonoid (quercetin, rutin, quercitrin,...), acid phenolic (acid chlorogenic, acid caffeic,...) [5-7],... Mặt khác, cao chiết và các chất phân lập được từ Hy thiêm cũng sở hữu nhiều tác dụng sinh học có ý nghĩa như giảm đau, chống viêm, chống tăng acid uric huyết, chống oxy hóa, chống khối u, kháng khuẩn,... [5, 8, 9]. Các tác dụng như chống viêm, giảm đau, chống oxy hóa của Hy thiêm là do chứa hàm lượng cao các chất phenolic như acid caffeic và dẫn xuất, flavonoid [8]. Hiện nay, theo chuyên luận Hy thiêm trong Dược điển Việt Nam (ĐĐVN) V không có chỉ tiêu định lượng các chất chính. Để có cơ sở góp phần nâng cấp tiêu chuẩn chất lượng Hy thiêm và các chế phẩm chứa dược liệu này, công trình nghiên cứu xây dựng đồng thời một số phenolic trong Hy thiêm là cần thiết, có ý nghĩa khoa học và thực tiễn.

2. Nguyên liệu, thiết bị và phương pháp nghiên cứu

2.1. Nguyên liệu, hóa chất, thiết bị

2.1.1. Nguyên liệu

Dược liệu Hy thiêm là phần trên mặt đất phơi hoặc sấy khô của cây Hy thiêm (*Siegesbeckia orientalis* L.). Các mẫu Hy thiêm được trồng tại các điểm điểm nghiên cứu và được thu hái vào tháng 4 năm 2022. Mẫu nghiên cứu xây dựng phương pháp là Hy thiêm được thu hái từ huyện Tân Sơn, tỉnh Phú Thọ (HT-PT.01). Các mẫu khảo sát hàm lượng: HT-PT.02 - HT-PT.04 được trồng trọt, thu hái tại thành phố Việt Trì, huyện Thanh Thủy, huyện Hạ Hòa tỉnh Phú Thọ; HT-HB thu hái tại tỉnh Hòa Bình; HT-SL trồng trọt, thu hái tại xã Chiềng Ngần, thành phố Sơn La, tỉnh Sơn La; HT-TH thu hái tại tỉnh Thanh Hóa; HT-YB thu hái tại tỉnh Yên Bái.

Các mẫu dược liệu được sấy khô (độ ẩm $\leq 10\%$), nghiền thành bột mịn, rây qua rây 350, đóng túi PE, buộc kín.

2.1.2. Hóa chất, dung môi và chất chuẩn

- Hóa chất, dung môi: acetonitril (MeCN) và methanol (MeOH) được mua của hãng Merck (Đức); acid phosphoric đạt tiêu chuẩn tinh khiết dùng cho HPLC.

- Chất đối chiếu: acid chlorogenic (**1**), rutin (**3**) do Trung tâm Nghiên cứu và Chuyển giao Công nghệ Dược, Trường Cao đẳng Y Dược Phú Thọ cung cấp, độ tinh khiết 98% (HPLC). Chất chuẩn: acid caffeic (**2**) (Lot. CFN99190) mua từ hãng Wuhan ChemFaces Biochemical Co. Ltd., có độ tinh khiết 98% (HPLC).

2.1.3. Thiết bị

Hệ thống HPLC: Agilent 1260 Technologies với đầu dò DAD, bơm mẫu tự động (Agilent, Mỹ) detector Diode Array SPD-M20A, cột sắc ký Agilent C18 (250 x 4,6 mm; 5 μ m); bể chiết siêu âm D-78224 (Đức); cân phân tích AUW220D (Shimadzu, Nhật Bản) và các dụng cụ thủy tinh, bình định mức, pipet, micropipet có độ chính xác thích hợp.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Phương pháp phân tích

Khảo sát điều kiện sắc ký: dựa trên thành phần pha động, tỷ lệ pha động, tốc độ dòng, nhiệt độ lò cột, bước sóng. Pha động tiến hành trên hệ dung môi gồm acid phosphoric 0,1% (A) và MeCN (B) với các tỷ lệ khác nhau, rửa giải gradient theo các chương trình như Bảng 1. Lựa chọn pha động, chương trình rửa giải, tốc độ dòng và nhiệt độ lò cột cho hiệu quả tách tốt nhất.

2.2.2. Chuẩn bị các dung dịch chuẩn và thử

- Dung dịch chuẩn: cân và pha chính xác lượng chất chuẩn **1**, **2** và **3** trong MeOH 60% để được dung dịch có nồng độ chính xác 1.000 μ g/mL. Từ dung dịch trên pha loãng trong MeOH 60% thành các dung dịch **1**, **2**, **3** có nồng độ 100 μ g/mL và các dãy dung dịch hỗn hợp 3 chất chuẩn có nồng độ từ 1, 2, 10, 20, 50, 100 μ g/mL.

- Dung dịch thử: cân chính xác khoảng 1,0 g dược liệu (đã nghiền thành bột và xác định độ ẩm) vào bình nón có nút mài, thêm 50 mL MeOH

60%, siêu âm 30 phút, tại nhiệt độ 50 °C. Lọc bỏ bã. Lọc qua màng lọc 0,22 µm trước khi chạy sắc ký.

Bảng 1. Chương trình dung môi rửa giải

Chương trình	Thời gian (phút)	Acid phosphoric 0,1% (% v/v)	MeCN (% v/v)
P1	0-9	80 → 40	20 → 60
	9-10	60 → 100	40 → 0
	10-11	100 → 20	0 → 80
	10-11	20	80
P2	0-17	20	80
P3	0-5	5 → 20	95 → 80
	5-10	20	80
	10-13	20 → 100	80 → 0
	13-14	100 → 05	0 → 95
	14-15	05	95
P4	0-5	15 → 20	85 → 80
	5-10	20	80
	10-13	20 → 100	80 → 0
	13-14	100 → 15	0 → 85
	14-15	15	85

2.2.3. Khảo sát phương pháp xử lý mẫu

Cân chính xác 1,0 g dược liệu, tiến hành khảo sát các điều kiện chiết xuất: hệ dung môi chiết MeOH 60%, 80%, 100%; thời gian chiết: 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60 min; nhiệt độ chiết xuất: 40, 50 và 60 °C.

2.2.4. Thẩm định phương pháp

Phương pháp phân tích được đánh giá về độ đặc hiệu, tính thích hợp hệ thống, khoảng tuyến tính và đường chuẩn, độ lặp lại, độ đúng, giới hạn phát hiện (LOD) và giới hạn định lượng (LOQ) theo hướng dẫn của ICH [10].

2.2.5. Tính kết quả

Hàm lượng của chất **1**, **2**, và **3** được tính theo dược liệu khô kiệt:

$$\text{Hàm lượng (mg/g)} = \frac{C \times V}{m \times (100 - B) \times 10}$$

Trong đó:

- C: nồng độ của **1**, **2**, và **3** có trong dung dịch mẫu thử (µg/mL) được tính từ đường chuẩn;
- V: thể tích pha mẫu thử (mL);

- m: khối lượng mẫu thử (g);

- B: hàm ẩm của mẫu thử (%).

3. Kết quả nghiên cứu

3.1. Lựa chọn điều kiện sắc ký

3.1.1. Lựa chọn cột

Qua nghiên cứu các tài liệu về định lượng đồng thời acid chlorogenic (**1**), acid caffeic (**2**) và rutin (**3**) trong dược liệu [11, 12], cũng như các đặc điểm hóa lý các chất và phù hợp với điều kiện sẵn có, nghiên cứu lựa chọn cột sắc ký Agilent C18 (250 x 4,6 mm; 5 µm).

3.1.2. Lựa chọn bước sóng phát hiện

Thực hiện quét phổ UV dung dịch chuẩn đơn của ba chất ở dải bước sóng 200-400 nm. Kết quả cho thấy chất **1** và **2** đều hấp thụ cực đại tại bước sóng khoảng 320 nm, còn chất **3** có cực đại hấp thụ tại bước sóng khoảng 360 nm. Do đó, lựa chọn bước sóng 320 nm để phân tích đồng thời

chất **1-2** và bước sóng 360 nm đối với phân tích chất **3**.

3.1.3. Lựa chọn pha động

Tiến hành chạy sắc ký với các pha động được trình bày ở bảng 1. Căn cứ vào độ phân giải và thời gian lưu của chất **1-3**, lựa chọn chương trình P4 có độ phân giải lớn nhất so với các chương

trình còn lại, tất cả các pic cân đối, tách khỏi hoàn toàn và có thời gian lưu thích hợp. Như vậy, sau quá trình khảo sát thực nghiệm, đã lựa chọn được điều kiện sắc ký như sau: cột sắc ký Agilent C18 (250 x 4,6 mm; 5 μ m). Pha động gồm acid phosphoric 0,1% trong nước tinh khiết và MeCN được phối hợp theo chương trình dung môi dưới đây:

Bảng 2. Chương trình dung môi rửa giải gradient

Thời gian (phút)	Acid phosphoric 0,1% (% v/v)	MeCN (% v/v)
0-5	85 $\rightarrow$ 80	15 $\rightarrow$ 20
5-10	80	20
10-13	80 $\rightarrow$ 0	20 $\rightarrow$ 100
13-14	0 $\rightarrow$ 85	100 $\rightarrow$ 15
14-15	85	15

Tốc độ dòng: 1,0 ml/phút.

Detector: DAD bước sóng 320 nm đối với chất **1-2**, bước sóng 360 nm đối với chất **3**.

Nhiệt độ cột: $25 \pm 0,1$ °C.

Thể tích tiêm: 20 μ l.

3.2. Kết quả khảo sát xử lý mẫu

- Khảo sát dung môi chiết xuất: Các dung môi khảo sát gồm MeOH 100%, 80% và 60%, chiết xuất bằng phương pháp siêu âm như trong mục 2.2.2. Kết quả thu được với dung môi MeOH 60% cho diện tích pic (S_{pic}) của các chất lớn nhất có ý nghĩa thống kê.

- Khảo sát thời gian siêu âm lần lượt là 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55 và 60 phút tại nhiệt độ 50 °C. Kết quả thấy rằng, S_{pic} của các chất tăng

dần theo thời gian từ 20 đến 45 phút, cao nhất là 45 phút. Từ 45 phút trở đi, S_{pic} của các chất hầu như không thay đổi. Do vậy, thời gian phù hợp cho chiết xuất là 45 phút.

- Khảo sát nhiệt độ siêu âm tại 40, 50 và 60 °C. Kết quả thu được tại nhiệt độ chiết 60 °C cho S_{pic} là lớn và tối ưu nhất. Như vậy, điều kiện chiết xuất tối ưu nhất được lựa chọn là: Phương pháp siêu âm, dung môi MeOH 60%, nhiệt độ 60 °C, thời gian 45 phút.

3.3. Thẩm định phương pháp định lượng

3.3.1. Tính thích hợp của hệ thống

Thực hiện chạy sắc ký dung dịch hỗn hợp các chất **1-3** (nồng độ 50 μ g/mL) ở điều kiện đã lựa chọn, lặp lại 6 lần. Kết quả thu được S_{pic} và thời gian lưu (t_R) của các chất như trong Bảng 3.

Bảng 3. Kết quả khảo sát tính thích hợp hệ thống

Chất phân tích	t_R (phút)		S_{pic} (mAu.s)	
	M $\pm$ SD	RSD (%)	M $\pm$ SD	RSD (%)
Acid chlorogenic (1)	6,169 $\pm$ 0,007	0,111	804,7 $\pm$ 4,1	0,506
Acid caffeic (2)	8,760 $\pm$ 0,011	0,120	1761,0 $\pm$ 7,8	0,447
Rutin (3)	11,634 $\pm$ 0,016	0,133	375,4 $\pm$ 3,1	0,835

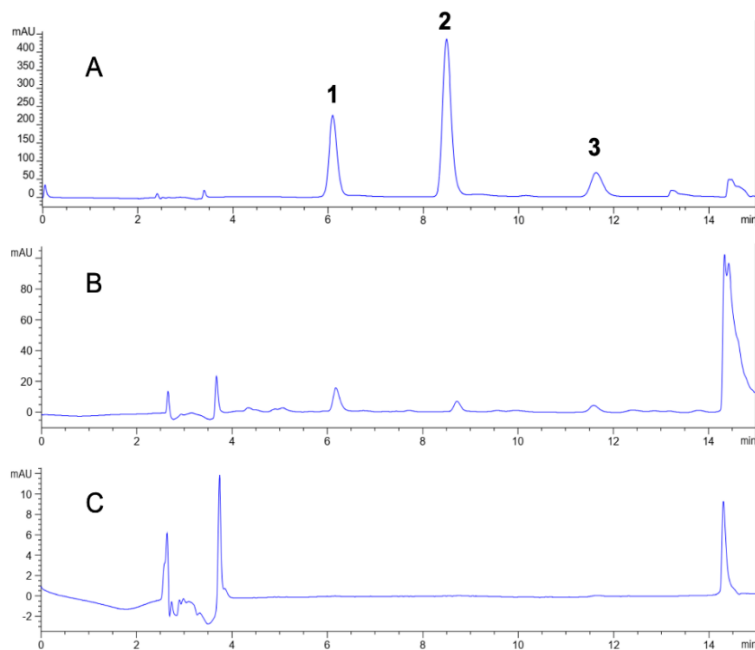
Số liệu kết quả ở Bảng 3 cho thấy, kết quả phân tích có độ lặp lại cao thông qua độ lệch chuẩn tương đối (RSD) của t_R và S_{pic} của các chất

< 2%. Điều này cho thấy hệ thống phù hợp cho việc xác định hàm lượng các chất **1-3** có trong Hy thiêm.

3.3.2. Độ đặc hiệu của phương pháp

Tiến hành tiêm sắc ký các mẫu hỗn hợp chất chuẩn **1-3** (nồng độ 100 µg/mL), mẫu được liệu

và mẫu trắng (MeOH). Kết quả được trình bày ở Hình 1 dưới đây.



Hình 1. Sắc ký đồ HPLC của hỗn hợp chất chuẩn (A), mẫu thử (B), mẫu trắng (C).

Hình 1 cho thấy, sắc ký đồ của mẫu trắng không có pic tạp tại thời gian lưu của các chất **1-3**. Các pic của **1-3** trên sắc ký đồ của dung dịch hỗn hợp chất chuẩn và dung dịch thử có hình dạng phổ UV tương đồng và t_R trùng nhau (hệ số

similarity của cả 3 chất là 0,999 khi chồng phổ UV). Từ đó rút ra kết luận rằng phương pháp xây dựng có độ đặc hiệu và chọn lọc cao, thích hợp để định lượng các chất **1-3** có trong Hy thiêm.

Bảng 4. Kết quả phương trình tuyến tính, LOD, LOQ của **1**, **2** và **3**

STT	Nồng độ dung dịch (µg/mL)	S_{pic} (mAu.s)		
		Acid chlorogenic (1)	Acid caffeic (2)	Rutin (3)
1	1,0	14,8	5,4	32,4
2	2,0	25,7	11,7	53,0
3	10,0	150,8	68,2	322,5
4	20,0	318,4	147,2	711,9
5	50,0	806,7	372,0	1758,3
6	100,0	1571,2	724,7	3367,2
Phương trình hồi quy		$Y = 15,805 x - 0,7734$	$Y = 7,299 x - 1,0865$	$Y = 33,913 x + 6,5303$
Hệ số tương quan (R^2)		0,9998	0,9997	0,9993
LOD (µg/mL)		0,036	0,076	0,15
LOQ (µg/mL)		0,12	0,25	0,50

3.3.3. Khoảng tuyến tính, giới hạn phát hiện, giới hạn định lượng

Chuẩn bị 06 dãy các dung dịch hỗn hợp chất chuẩn 1-3 như Mục 2.2.2. Tiến hành sắc ký theo điều kiện lựa chọn ở trên.

LOD, LOQ của ba chất 1, 3 được xác định tại nồng độ khi tín hiệu chất phân tích trên tín hiệu nền lần lượt bằng 3 (S/N) và 10 (S/N). Kết quả thu được phương trình tuyến tính, hệ số tương quan (R^2), LOD, LOQ của các chất 1-3 như trong Bảng 4.

Kết quả thực nghiệm cho thấy, phương trình hồi quy tuyến tính bậc 1 của cả ba chất 1-3 trong khoảng nồng độ khảo sát có mối tương quan chặt

giữa S_{pic} và nồng độ, với R^2 của chất 1, 2 và 3 lần lượt là 0,9998, 0,9993 và 0,9997.

Kết quả xác định LOD của chất 1, 2 và 3 lần lượt là 0,04, 0,10 và 0,20 $\mu\text{g/mL}$; LOQ lần lượt là 0,12, 0,25 và 0,50 $\mu\text{g/mL}$ đối với chất 1, 2 và 3.

3.3.4. Độ lặp lại

Xác định hàm lượng các chất trong mẫu được liệu thử HT-PT.01 với 6 lần thực hiện với xử lý mẫu và các điều kiện đã lựa chọn ở trên. Kết quả thu được trình bày ở Bảng 5.

Kết quả ở Bảng 5 cho thấy phương pháp sắc ký được lựa chọn cho độ lặp lại và ổn định cao, với RSD của các chất 1-3 trong được liệu Hy thêm < 2,0%, nằm trong khoảng cho phép theo quy định của AOAC [13].

Bảng 5. Kết quả xác định độ lặp lại

TT	Acid chlorogenic (1)		Acid caffeic (2)		Rutin (3)	
	S_{pic} (mAu.s)	Hàm lượng (mg/g)	S_{pic} (mAu.s)	Hàm lượng (mg/g)	S_{pic} (mAu.s)	Hàm lượng (mg/g)
1	235,4	0,821	57,1	0,082	64,1	0,491
2	236,8	0,826	58,4	0,084	63,7	0,488
3	231,6	0,808	57,8	0,083	64,8	0,496
4	238,6	0,832	58,4	0,084	64,4	0,493
5	237,4	0,828	56,5	0,083	63,5	0,486
6	232,8	0,812	59,0	0,083	65,9	0,504
Trung bình		0,821		0,083		0,493
RSD (%)		1,15		0,91		1,31

Bảng 6. Kết quả khảo sát độ chính xác trung gian

TT	Acid chlorogenic (1)		Acid caffeic (2)		Rutin (3)	
	S_{pic} (mAu.s)	Hàm lượng (mg/g)	S_{pic} (mAu.s)	Hàm lượng (mg/g)	S_{pic} (mAu.s)	Hàm lượng (mg/g)
1	233,1	0,813	56,5	0,081	66,3	0,507
2	237,7	0,829	58,4	0,084	64,4	0,493
3	238,3	0,831	57,1	0,082	65,1	0,498
4	232,5	0,811	59,0	0,083	64,1	0,491
5	235,1	0,820	57,8	0,083	64,7	0,495
6	233,7	0,815	57,1	0,082	63,6	0,487
Trung bình	0,820 mg; n=6; RSD=1,03%		0,083 mg; n=6; RSD= 1,78%		0,495 mg; n=6; RSD= 1,39%	
2 KNV (n=12)	RSD= 1,04%		RSD=1,70%		RSD=1,31%	

3.3.5. Độ chính xác trung gian

Thực hiện quy trình định lượng với hai kiểm nghiệm viên khác nhau, mỗi người chuẩn bị 06 mẫu thử riêng biệt và ở hai ngày làm việc khác nhau. Kết quả được trình bày trong Bảng 6.

Kết quả RSD của cả 3 chất < 2,0% và hàm lượng của chúng trong các ngày và khác kiểm nghiệm viên không khác nhau có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$). Kết quả phân tích cho thấy phương pháp đạt yêu cầu về độ chính xác theo hướng dẫn của ICH.

3.3.6. Độ đúng

Độ đúng của phương pháp được đánh giá thông qua hiệu suất thu hồi.

Hiệu suất thu hồi được xác định bằng phương pháp thêm chuẩn với 3 mức (các mức thêm lượng chất tăng dần gấp đôi so với lượng thêm trước). Tại mỗi mức nồng độ thực hiện trên 3 mẫu độc lập và đem phân tích theo điều kiện đã chọn, kết quả được trình bày trong Bảng 7.

Kết quả trên cho thấy hiệu suất thu hồi trung bình đối với acid chlorogenic từ 98,7% đến 103,3%, acid caffeic từ 96,6% đến 103,8%, rutin từ 97,7% đến 101,6%. Như vậy, phương pháp có độ đúng đạt yêu cầu theo AOAC về hiệu suất thu hồi.

Bảng 7. Kết quả đánh giá độ đúng của phương pháp

Hợp chất	Hàm lượng thêm vào ($\mu\text{g/mL}$)	Hàm lượng tìm thấy ($\mu\text{g/mL}$)	Hiệu suất thu hồi (%)	RSD (%)
Acid chlorogenic (1)	0	16,42		
	8	$24,29 \pm 0,12$	100,0 – 102,6	1,47
	16	$32,03 \pm 0,17$	101,3 – 103,3	1,01
	32	$48,46 \pm 0,43$	98,7 – 101,4	1,33
Acid caffeic (2)	0	1,64		
	0,8	$2,46 \pm 0,01$	101,3 – 103,8	1,40
	1,6	$3,23 \pm 0,02$	98,1 – 100,6	1,26
	3,2	$4,74 \pm 0,01$	96,6 – 97,2	0,37
Rutin (3)	0	9,82		
	5	$14,79 \pm 0,07$	98,4 – 101,0	1,46
	10	$19,80 \pm 0,17$	98,3 – 101,6	1,67
	15	$24,71 \pm 0,24$	97,7 – 100,9	1,62

Bảng 8. Kết quả định lượng acid chlorogenic, acid caffeic và rutin trong dược liệu Hy thiêm

Mẫu	Hàm lượng ($M \pm SD$, mg/g)		
	1	2	3
HT-PT.01	$0,82 \pm 0,01$	$0,08 \pm 0,01$	$0,49 \pm 0,02$
HT-PT.02	$0,38 \pm 0,04$	$0,06 \pm 0,01$	$0,27 \pm 0,05$
HT-PT.03	$0,71 \pm 0,06$	$0,11 \pm 0,03$	$0,50 \pm 0,07$
HT-PT.04	$0,09 \pm 0,03$	$0,05 \pm 0,00$	$0,07 \pm 0,04$
HT-HB	$0,25 \pm 0,03$	$0,02 \pm 0,02$	$0,40 \pm 0,06$
HT-SL	$0,52 \pm 0,01$	$0,21 \pm 0,03$	$0,32 \pm 0,04$
HT-TH	$0,38 \pm 0,06$	$0,11 \pm 0,03$	$0,52 \pm 0,02$
HT-YB	$0,34 \pm 0,05$	$0,06 \pm 0,01$	$0,12 \pm 0,03$

3.4. Định lượng acid chlorogenic, acid caffeic và rutin trong dược liệu Hy thiêm

Kết quả thẩm định phương pháp cho thấy phương pháp đáng tin cậy cho việc định lượng đồng thời acid chlorogenic, acid caffeic và rutin trong Hy thiêm. Áp dụng phương pháp định lượng đã xây dựng ở trên để xác định hàm lượng acid chlorogenic, acid caffeic và rutin trong các mẫu Hy thiêm thu hái trên địa bàn tỉnh Phú Thọ và một số tỉnh khác. Kết quả phân tích được trình bày trong Bảng 8 (n=3).

5. Bàn luận

Hy thiêm được sử dụng trong y học cổ truyền để điều trị đau lưng, gối, xương khớp, chân tay tê buốt, mụn nhọt. Các nghiên cứu chỉ ra trong Hy thiêm chứa nhiều diterpenoid và chúng được chứng minh có tác dụng chống viêm, giảm đau tốt và có nhiều nghiên cứu xây dựng phương pháp định lượng nhóm chất này [14]. Bên cạnh đó, nghiên cứu của của N. T. Duong và cs (2017) chỉ ra rằng cao chiết EtOH của Hy thiêm và phân đoạn BuOH của cao chiết EtOH Hy thiêm có tác dụng chống viêm, hạ acid uric huyết [8]. Để tìm hiểu cơ chế tác dụng của cao chiết, nhóm nghiên cứu N. T. Duong đã tiến hành xác định hàm lượng phenolic và xây dựng phương pháp định tính các phenolic bằng HPLC-DAD, sử dụng cột C18 (250 × 4,6 mm; 5 μm), hệ dung môi rửa giải MeOH - acid phosphoric 0,1% chạy theo chương trình rửa giải gradient, tốc độ dòng 0,6 mL/min. Kết quả, phân đoạn BuOH chứa hàm lượng phenolic cao nhất, tiếp đó là cao EtOH lần lượt là 173,4 và 138,1 mg/g. Các phenolic xác định được là acid caffeic, các acid caffeoylquinic (acid chlorogenic, acid 3-caffeoylquinic, 4-caffeoylquinic), acid caffeoylquinic, flavonoid (rutin, quercetin,...) [8]. Hiện nay, các công trình nghiên cứu xác định hàm lượng các phenolic, trong đó có acid chlorogenic, acid caffeic, rutin trong Hy thiêm không nhiều. Năm 2017, S. K. Pradhan và cs xây dựng và thẩm định phương pháp định lượng đồng thời chlorogenic, acid caffeic trong lá Hy thiêm bằng phương pháp HPTLC thu hái ở Bắc

Ấn Độ. Kết quả định lượng thấy rằng hàm lượng các chất dao động rất lớn acid chlorogenic (0,0045 → 1,191 mg/g khô, acid caffeic (không phát hiện → 0,328 mg/g). Tuy nhiên, hàm lượng acid chlorogenic cao hơn acid caffeic [15]. Nghiên cứu của chúng tôi cũng thấy hàm lượng 2 chất này dao động cũng lớn và thấp hơn so với nghiên cứu của S. K. Pradhan và cs [15]. Phân đoạn D101 có hoạt tính của cao chiết EtOH 50% của Hy thiêm được xác định hàm lượng 4 chất chính là rutin, acid isochlorogenic A, acid isochlorogenic C và darutoside bằng HPLC-PDA, hệ dung môi ACN- acid phosphoric 0,2% rửa giải theo chế độ gradient. Kết quả hàm lượng 4 chất trong phân đoạn D101 lần lượt là $0,24 \pm 0,02$; $0,47 \pm 0,05$; $0,59 \pm 0,06$, và $3,38 \pm 0,30\%$ [16].

Kết quả nghiên cứu này cho thấy hàm lượng acid chlorogenic, acid caffeic và rutin trong các mẫu Hy thiêm lần lượt là 0,09-0,82, 0,02-0,21, 0,07-0,52 mg/g. Tổng hàm lượng 3 phenolic này là 0,21-1,39 mg/g. Hàm lượng các chất của các mẫu dao động lớn có thể do điều kiện thổ nhưỡng, khí hậu, giống và điều kiện canh tác khác nhau. Theo tra cứu của chúng tôi, hiện tại chưa có công trình nào công bố xây dựng và thẩm định phương pháp định lượng đồng thời acid chlorogenic, acid caffeic, rutin trong Hy thiêm. Việc 3 chất có hoạt tính sinh học này được lựa chọn xây dựng phương pháp định lượng là cần thiết, góp phần tiêu chuẩn hóa, đánh giá chất lượng dược liệu Hy thiêm. Kết quả nghiên cứu của nhóm chúng tôi chỉ ra rằng, phương pháp định lượng đồng thời acid chlorogenic, acid caffeic, rutin trong Hy thiêm đạt yêu cầu theo hướng dẫn của ICH, AOAC. Mặt khác, thời gian chiết xuất và thời gian lưu ngắn, tiết kiệm công lao động, hóa chất, dung môi, có thể dễ dàng triển khai áp dụng vào thực tiễn.

6. Kết luận

Nghiên cứu đã xây dựng và thẩm định phương pháp định lượng đồng thời acid chlorogenic, acid caffeic và rutin trong dược liệu Hy thiêm bằng phương pháp HPLC. Phương pháp đã xây dựng có độ chính xác cao, độ đúng

tốt, khoảng tuyến tính rộng để phân tích acid chlorogenic, acid caffeic và rutin trong dược liệu Hy thiêm. Đồng thời, nghiên cứu đã xác định được hàm lượng acid chlorogenic, acid caffeic và rutin trong dược liệu Hy thiêm thu hái tại các huyện, thành phố trên địa bàn tỉnh Phú Thọ, tỉnh Hòa Bình, tỉnh Sơn La, tỉnh Thanh Hóa và tỉnh Yên Bái. Phương pháp đã xây dựng có thể áp dụng để định lượng 3 hợp chất acid chlorogenic, acid caffeic và rutin trong dược liệu Hy thiêm.

Lời cảm ơn

Tác giả xin chân thành cảm ơn Sở Khoa học và Công nghệ tỉnh Phú Thọ đã tài trợ kinh phí; Trung tâm Nghiên cứu và Chuyển giao Công nghệ Dược, Trường Cao đẳng Y Dược Phú Thọ; Bộ môn Bào chế và Công nghiệp Dược phẩm, Trường Đại học Y Dược, Đại học Quốc gia Hà Nội đã hỗ trợ thực hiện nghiên cứu này.

Tài liệu tham khảo

- [1] Z. Y. Wu, P. H. Raven, Flora of China, Missouri Botanical Garden Press, Vols. 20-21, 2011, pp. 320-323.
- [2] P. H. Ho, An Illustrated Flora of Vietnam, Ho Chi Minh City: Tre Publishing House, Vol. 3, 2003 (in Vietnamese).
- [3] National Institute of Medicinal Materials, Medicinal Plants and Animals in Vietnam, Hanoi: Science and Technics Publishing House, Vol. 1, 2004 (in Vietnamese).
- [4] Vietnamese Ministry of Health, Vietnamese Pharmacopoeia, Hanoi: Medical Publishing House, Vol. 2, 2017 (in Vietnamese).
- [5] Q. Wang, Y. Y. Liang, K. W. Li, Y. Li, F. J. Niu, S. J. Zhou, H. C. Wei, C. Z. Zhou, *Herba Siegesbeckiae*: A Review on its Traditional Uses, Chemical Constituents, Pharmacological Activities and Clinical Studies, Journal of Ethnopharmacology, 2021, pp. 114117.
- [6] T. T. Ha, D. T. Ha, T. T. Ngan, N. T. Thao, L. V. Dung, Phenolic Compounds Isolated from *Siegesbeckia orientalis* L., Journal of Medicinal Materials - Hanoi, Vol. 22, No. 4, 2017, pp. 200-205 (in Vietnamese).
- [7] S. K. Pradhan, R. C. Gupta, R. Goel, R. Preet, Journal of Planar Chromatography, Vol. 30, 2017, pp. 516-520.
- [8] N. T. Duong, P. T. Thuong, I. H. Hwang, H. T. K. Huyen, N. M. Khoi, N. H. Anh, M. Na., Anti-Hyperuricemic, Anti-inflammatory and Analgesic Effects of *Siegesbeckia orientalis* L. Resulting from the Fraction with High Phenolic Content, BMC Complementary and Alternative Medicine, Vol. 17, No. 1, 2017, pp. 191.
- [9] Y. Yang, H. Chen, J. Lei, J. Yu, Biological Activity of Extracts and Active Compounds Isolated from *Siegesbeckia orientalis* L., Industrial Crops and Products, Vol. 94, 2016, pp. 288-293.
- [10] ICH, Validation of Analytical Procedure: Text and Methodology Q2 (R1), 2005.
- [11] X. Niu, X. Cui, H. Su H, Y. Guo, X. Dong, Simultaneous Determination of Seven Compounds in *Lonicera Japonica* by High Performance Liquid Chromatography, Chinese Journal of Chromatography, Vol. 30, No. 2, 2012, pp. 211-214.
- [12] E. T. A. Car, M. E. Celep, M. Charehsaz, G. S. Akyüz, E. Yeşilada, Development and Validation of a High-performance Liquid Chromatography–Diode-array Detection Method for the Determination of Eight Phenolic Constituents in Extracts of Different Wine Species, Turkish Journal of Pharmaceutical Sciences, Vol. 15, No. 1, 2018, pp. 22-28.
- [13] AOAC International, AOAC Official Methods of Analysis, in Guidelines for Standard Method Performance Requirements, Appendix F, 2016, pp. 3.
- [14] T. T. V. Anh, P. Q. Tuan, N. V. Khanh, D. V. Hung, N. T. Hai, N. Q. Tuan, N. T. M. Diep, N. T. X. Thinh, H. T. Hoa, Simultaneous Quantification of Kirenot, Daurutoside, and Darutigenol in *Siegesbeckia orientalis* L. by HPLC-DPA Method, VNU Journal of Science: Medical and Pharmaceutical Sciences, Vol. 38, No. 2, 2022, pp. 26-34.
- [15] S. K. Pradhan, R. C. Gupta, R. Goel, R. Preet, Simultaneous Determination of Chlorogenic and Caffeic Acid in *Siegesbeckia Orientalis* L. (Xi Xian) by A Validated High-performance Thin-layer Chromatographic Method, Journal of Planar Chromatography – Modern TLC, Vol. 6, 2017, pp. 516-520.
- [16] J. M. T. Chu, A. Abulimiti, B. S. H. Wong, G. D. Zhao, S. H. Xiong, M. M. Zhao, Y. Wang, Y. Chen, J. Wang, Y. Zhang, R. C. C. Chang, H. Yu, G. T. C. Wong, *Siegesbeckia orientalis* L. Derived Active Fraction Ameliorates Perioperative Neurocognitive Disorders Through Alleviating Hippocampal Neuroinflammation, Frontiers in Pharmacology, Vol. 13, 2022.