

Development of quantitation method for andrographolide in *Andrographis paniculata* by high performance thin layer chromatography (HPTLC)

Nguyen Mai Huong¹, Nguyen Thu Hien¹, Ngo Minh Thuy¹, Le Dinh Chi²,
Tong Thi Thanh Vuong^{1,*}

¹Faculty of Analytical Chemistry & Drug Quality Control, Hanoi University of Pharmacy

²National Institute of Pharmaceutical Technology, Hanoi University of Pharmacy

*Corresponding author: 0904298899, vuongttt@hup.edu.vn

ABSTRACT

Andrographolide (AP) is a diterpen lactone with important roles in biological activities of *Andrographis paniculata* (Burm.f) Nees. Controlling its content provides a good insight on the quality of this medicinal plant. In this study, an HPTLC method was developed for quantitation of AP in *Andrographis paniculata*. The chromatographic separation was done on a Silica gel 60 F 254 thin layer using a mixture of chloroform and methanol (7:1, v/v) as mobile phase. After the development step and evaporation of mobile phase, the chromatograms were scanned at wavelength of 223 nm by densitometer to record and calculate the peak response of AP. The method had linear range for AP from 199.2 to 996.0 ng per spot with quantitation limit at 199.2 ng of AP per spot. The method was fully validated according the current guideline of AOAC International on performance of analytical method in term of accuracy, precision, linearity and was proved as reliable for intended purpose. The method was applied to quantify AP in several samples of *Andrographis paniculata* purchased at different locations in Vietnam, yielding the content of AP (% w/w) varying from 0.5 % to 3.0 %. The HPTLC method developed in this study was a reliable analytical tool which can be used in routine quality control of *Andrographis paniculata*. Furthermore, because TLC technique was widely employed in identification test of medicinal plant, therefore, the assay of AP by HPTLC can be integrated with the identification test of *Andrographis paniculata*, saving time and materials.

Keywords: andrographolide, quantitaion, HPTLC, *Andrographis paniculata*.



Xây dựng phương pháp định lượng andrographolid trong Xuyên tâm liên bằng sắc ký lớp mỏng hiệu năng cao (HPTLC)

Nguyễn Mai Hương¹, Nguyễn Thu Hiền¹, Ngô Minh Thúy¹, Lê Đình Chi²,
Tống Thị Thanh Vương^{1,*}

¹Khoa Hóa Phân tích – Kiểm nghiệm thuốc, Trường Đại học Dược Hà Nội

²Viện Công nghệ Dược phẩm Quốc gia, Trường Đại học Dược Hà Nội

*Tác giả liên hệ: 0904298899, email: vuongttt@hup.edu.vn

(Ngày gửi đăng: 07/01/2023 – Ngày duyệt đăng: 25/02/2023)

TÓM TẮT

Andrographolid (AP) là một diterpen lacton có vai trò quan trọng trong tác dụng sinh học của Xuyên tâm liên (*Andrographis paniculata* (Burm.f) Nees), kiểm soát hàm lượng AP cung cấp thông tin quan trọng về chất lượng của dược liệu này. Trong nghiên cứu này, một phương pháp HPTLC được xây dựng để định lượng AP trong Xuyên tâm liên. Quá trình tách sắc ký được thực hiện trên bản mỏng Silica gel 60 F 254 sử dụng cloroform - methanol (7: 1, tt/tt) làm pha động. Sau khi bay hơi dung môi, sắc ký đồ được quét tại bước sóng 223 nm để ghi đáp ứng pic của AP. Phương pháp có khoảng tuyến tính từ 199,2 đến 996,0 ng AP trên vết chấm. Phương pháp được thẩm định theo hướng dẫn của AOAC International về độ đúng, độ lặp lại, khoảng tuyến tính, kết quả thẩm định chứng tỏ phương pháp tin cậy với ứng dụng dự kiến. Phương pháp đã được áp dụng định lượng AP trong một số mẫu Xuyên tâm liên mua trên thị trường, với hàm lượng AP thu được từ 0,5 % - 3,0 % (kl/kl). Phương pháp HPTLC phát triển trong nghiên cứu cung cấp công cụ phân tích tin cậy có thể sử dụng trong kiểm nghiệm thường quy Xuyên tâm liên, đồng thời có thể kết hợp việc định lượng AP với định tính Xuyên tâm liên bằng TLC, giúp tiết kiệm thời gian và vật tư.

Từ khóa: andrographolid, định lượng, HPTLC, Xuyên tâm liên.

Đặt vấn đề

Xuyên tâm liên (*Andrographis paniculata* (Burm.f) Nees) là một dược liệu đã được sử dụng phổ biến để điều trị các bệnh nhiễm khuẩn, chống viêm, chống ung thư, đái tháo đường, điều hòa miễn dịch, bảo vệ tế bào thần kinh... và hiện rất được quan tâm nghiên cứu vì cho thấy có tác dụng ức chế sự phát triển của virus SARS-CoV-2 [2]. Diterpen lacton là nhóm hoạt chất đặc trưng và quan trọng nhất quyết định tác dụng của Xuyên

tâm liên, trong đó andrographolid (AP) là diterpen lacton chính, đóng vai trò là chất chỉ điểm "marker" trong tiêu chuẩn hóa chất lượng Xuyên tâm liên [2], [7]. Hiện tại, Dược điển Việt Nam đã có chuyên luận Xuyên tâm liên với phép thử định tính bằng sắc ký lớp mỏng và định lượng tổng diterpen lacton bằng tạo màu đo quang so sánh với chất chuẩn AP, một phép thử định lượng không đặc hiệu. Hiện nay, sự ra đời của các loại bản mỏng và hệ thống thiết bị đã cho phép sắc ký



lớp mỏng, nhất là sắc ký lớp mỏng hiệu năng cao (high performance thin layer chromatography - HPTLC), trở thành một kỹ thuật phân tích có độ lặp lại, độ đúng đủ tốt cho ứng dụng định lượng bên cạnh ứng dụng định tính truyền thống. Nhờ vậy, phương pháp HPTLC có thể đồng thời đóng vai trò phép thử định tính và định lượng thành phần quan trọng trong các loại thảo mộc, dược liệu với ưu điểm nổi bật là thao tác đơn giản, tiết kiệm thời gian và chi phí, có thể tiến hành phân tích đồng thời nhiều mẫu cùng lúc. Đây là một hướng hiệu quả và khả thi cho việc nâng cấp kiểm tra chất lượng dược liệu nói chung, trong đó có Xuyên tâm liên. Tuy nhiên, cho tới nay tại Việt Nam chưa có nghiên cứu định lượng AP trong Xuyên tâm liên bằng HPTLC được công bố. Do vậy, nghiên cứu này được thực hiện với mục tiêu phát triển một phương pháp HPTLC tin cậy để định lượng AP trong dược liệu Xuyên tâm liên.

Nguyên liệu và phương pháp nghiên cứu

Nguyên liệu và trang thiết bị

Đối tượng nghiên cứu: AP trong dược liệu Xuyên tâm liên.

Các mẫu dược liệu Xuyên tâm liên được thu mua từ: làng Nghĩa Trai - Hưng Yên (HY), chợ Ninh Hiệp - Bắc Ninh (BN), phố Lãn Ông - Hà Nội (HN1, HN2), Hạ Long - Quảng Ninh (QN), Nghệ An (NA).

Dược liệu chuẩn (DLC) Xuyên tâm liên (số kiểm soát HP0123116, ngày ban hành: 20/3/2023) được cung cấp bởi Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương.

Chất chuẩn: Andrographolid hàm lượng 98,0 % (số lô CFS202201, hạn dùng: tháng 1/2024) cung cấp bởi Chemfaces (Trung Quốc).

Dung môi, hóa chất: methanol, cloroform, ethyl acetat, ethanol 96 %, dicloromethan loại tinh khiết phân tích (Trung Quốc).

Thiết bị: phân tích sắc ký được thực hiện với bản mỏng TLC silica gel 60 F 254, trên hệ thống HPTLC CAMAG (Thụy Sĩ) gồm: bộ phận chấm mẫu CAMAG Linomat 5, bộ phận triển khai sắc ký CAMAG ADC 2, bộ phận quét phổ CAMAG Scanner 4, phần mềm xử lý kết quả winsCAT. Các thiết bị khác được sử dụng bao

gồm: cân phân tích A&D GR-200 (Nhật Bản), máy siêu âm DAIHAN WUC A22H (Hàn Quốc), máy li tâm KUBOTA 65 (Nhật Bản), máy lắc xoáy LABINCO L46 (Hà Lan), tủ sấy WiseVen WOF-105 (Hàn Quốc)...

Dụng cụ: bình định mức (10 mL, 100 mL); ống ly tâm 50 mL; micropipet (loại 100 - 1000 μ L); màng lọc cellulose acetat 0,45 μ m; ống đong; cốc có mỏ...

Phương pháp nghiên cứu

Chuẩn bị mẫu:

Dung dịch chuẩn: dung dịch chuẩn gốc AP 1000 mg/L được pha trong dung môi methanol. Các dung dịch chuẩn làm việc 40 - 200 mg/L được pha loãng từ dung dịch chuẩn gốc với cùng dung môi.

Dung dịch thử: cân chính xác khoảng 0,4 g bột dược liệu, chiết siêu âm 4 lần, mỗi lần với 20 mL methanol trong 50 phút. Sau mỗi lần chiết, ly tâm hỗn hợp thu được ở tốc độ 4000 vòng/ phút trong 5 phút, tách lấy phần dịch trong, gộp chung dịch chiết của 4 lần vào bình định mức 100 mL, định mức bằng methanol, lắc đều. Pha loãng dung dịch trên bằng methanol (nếu cần) đến nồng độ phù hợp cho định lượng và lọc qua màng 0,45 μ m trước khi tiêm sắc ký, thể tích tiêm 20 μ L. Nồng độ làm việc AP khoảng 30 mg/L (tương đương khoảng 600 ng AP/ vết).

Dung dịch thử thêm chuẩn: cân chính xác khoảng 0,12 g bột dược liệu (tương đương với 30 % nồng độ định lượng) rồi thêm lượng chuẩn AP thích hợp và xử lý mẫu tương tự như với dung dịch thử để thu được các dung dịch thử thêm chuẩn có nồng độ tương ứng 50 %, 100 % và 150 % so với nồng độ định lượng.

Xác định hàm ẩm dược liệu: cân chính xác khoảng 1 g bột (± 10 %), sấy trong 4 giờ ở nhiệt độ 85 $^{\circ}$ C (± 2 $^{\circ}$ C) [1].

Điều kiện sắc ký: sử dụng pha tĩnh là bản mỏng TLC silica gel 60 F 254 (20 cm \times 10 cm) đã được hoạt hóa bằng cách sấy ở 110 $^{\circ}$ C trong 30 phút và pha động là hỗn hợp cloroform - methanol (7:1, tt/tt). Thể tích tiêm lần lượt là 20 μ L với các dung dịch thử, thử thêm chuẩn và 5 μ L với các dung dịch chuẩn.



Các mẫu được chấm thành dải với độ rộng 8 mm, cách mép dưới bản mỏng 8 mm. Buồng khai triển được bão hòa hơi pha động trong 20 phút và kiểm soát hàm ẩm đến khoảng 40 % trước khi tiến hành sắc ký. Cho pha động di chuyển trên bản mỏng với quãng đường là 80 mm, sau đó làm khô bản mỏng 5 phút trong bình khai triển. Sắc ký đồ thu được bằng cách sử dụng densitometer quét tại bước sóng 223 nm.

Xây dựng và thẩm định phương pháp

Tiến hành khảo sát và lựa chọn một số thông số của quá trình sắc ký (thành phần pha động; tỷ lệ dung môi pha động; bước sóng phát hiện) và quá trình xử lý mẫu (dung môi chiết siêu âm; tỷ lệ thể tích dung môi; thời gian chiết; số lần chiết). Quá trình này có ứng dụng tối ưu hóa đa biến sử dụng phần mềm MODDE 5.0 (Umetrics, Thụy Điển). Thiết kế thí nghiệm theo phương pháp thiết kế bề mặt đáp ứng RSM (Response surface methodology) dựa trên mô hình thiết kế trung tâm mặt phức hợp chính CCF (Central composite face-centered design) gồm 17 thí nghiệm (bố trí điều kiện và kết quả được trình bày trong bảng 2).

Phương pháp đã xây dựng được thẩm định theo hướng dẫn của AOAC 2016 [3] về các chỉ tiêu: độ phù hợp hệ thống; độ chọn lọc; khoảng tuyến tính; độ lặp lại; độ đúng; giới hạn phát hiện và giới hạn định lượng. Các số liệu được xử lý thống kê toán học bằng phần mềm Microsoft EXCEL.

Mẫu dược liệu Xuyên tâm liên BN (chợ Ninh Hiệp – Bắc Ninh) được lựa chọn cho khảo sát quá trình xử lý mẫu và thẩm định phương pháp về các chỉ tiêu độ lặp lại, độ đúng.

Ứng dụng: Phương pháp phân tích được ứng dụng để xác định hàm lượng AP trong các mẫu dược liệu Xuyên tâm liên thu mua trên thị trường dựa vào phương trình hồi quy biểu diễn mối quan hệ giữa diện tích pic và lượng hoạt chất cùng hàm ẩm của dược liệu.

Kết quả nghiên cứu

Xây dựng phương pháp

Lựa chọn điều kiện sắc ký

Lựa chọn pha động

Để phân tách tốt AP khỏi các thành phần khác của dược liệu Xuyên tâm liên, các hệ pha động khác nhau đã được khảo sát gồm cloroform - methanol (ở các tỷ lệ 10:1; 9:1; 7:1; 4:1; 1:1) và cloroform - methanol - ethyl acetat (ở các tỷ lệ 12:1,5:1; 8:1,5:1; 8:3:1). Sau khi triển khai sắc ký, phát hiện vết bằng cách dẫn xuất hóa (phun thuốc thử là dung dịch acid sulfuric 10 % trong MeOH sau đó sấy bản mỏng ở 100 °C trong 5 phút) rồi quan sát dưới đèn UV ở bước sóng 366 nm (AP cho huỳnh quang tím nhạt) [4]. Kết quả thu được (hình 1) cho thấy với pha động cloroform - methanol (7:1) (hình 1, (C)), AP được phân tách tốt nhất khỏi các thành phần khác của dịch chiết Xuyên tâm liên nên pha động này được lựa chọn cho phép định lượng AP trong Xuyên tâm liên.

Sắc ký đồ thu được sau khi quét bằng densitometer tại bước sóng 223 nm với pha động cloroform - methanol (7:1) (hình 2) cho thấy sau khi khai triển, pic AP cân đối, có R_f là 0,52 và được phân tách tốt khỏi các pic khác trong dịch chiết Xuyên tâm liên.

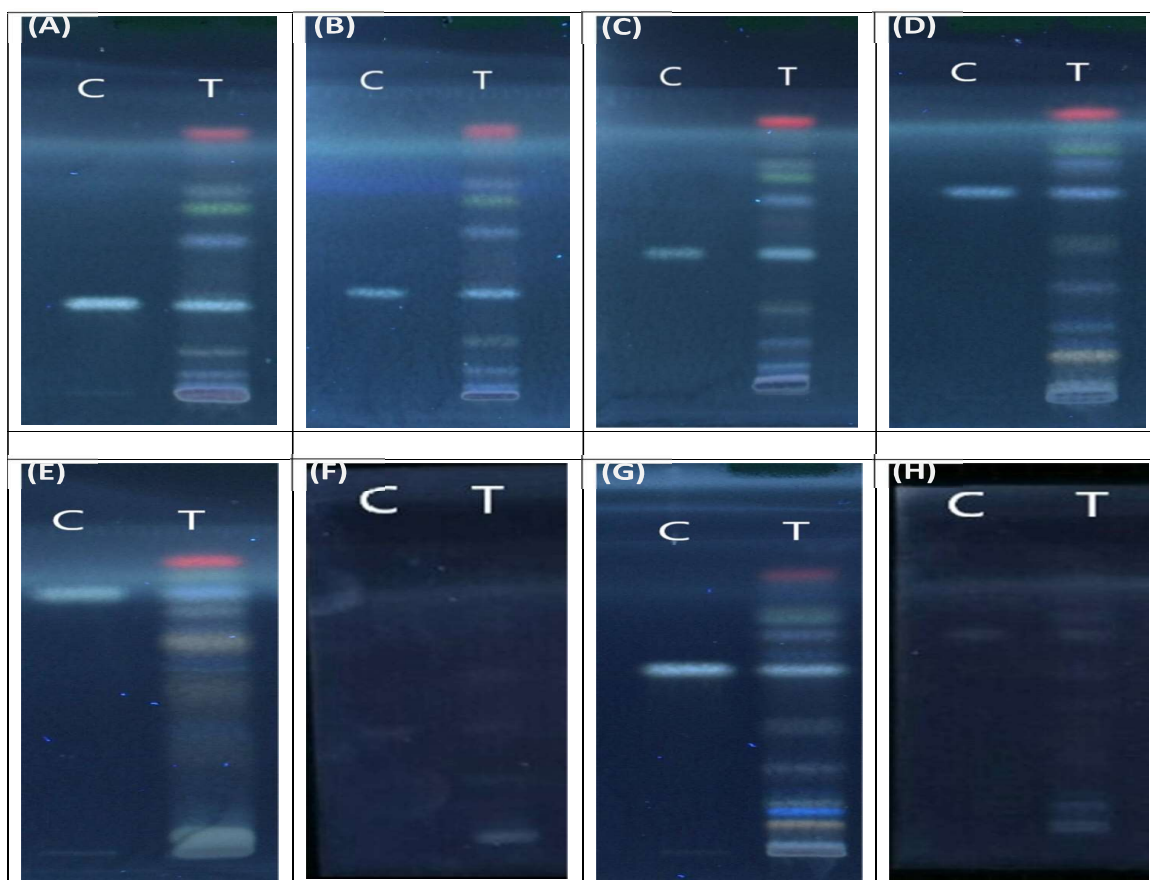
Lựa chọn bước sóng phát hiện

AP (hình 3) có khả năng hấp thụ UV với cực đại hấp thụ ở khoảng 223 nm (hình 4). Qua khảo sát, bước sóng 223 nm được lựa chọn cho phép định lượng AP trong dược liệu Xuyên tâm liên.

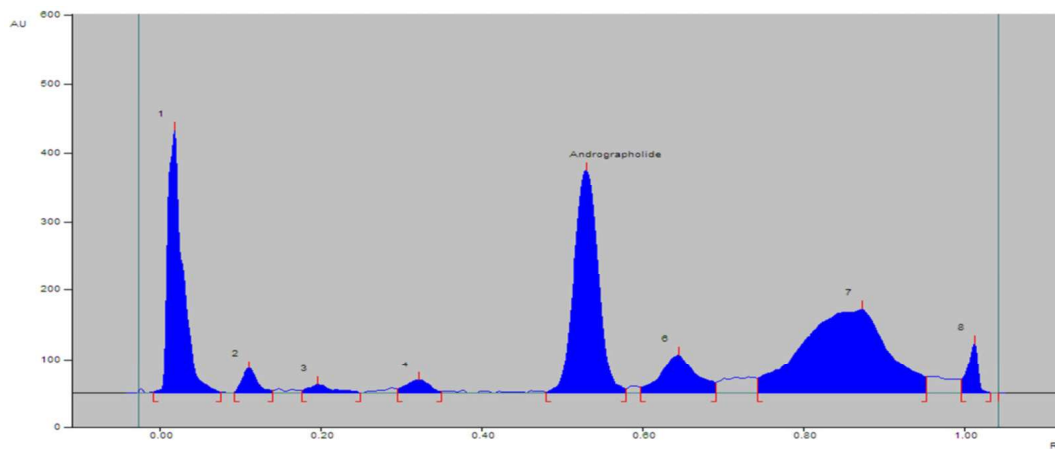
Lựa chọn điều kiện xử lý mẫu

Lựa chọn dung môi chiết siêu âm

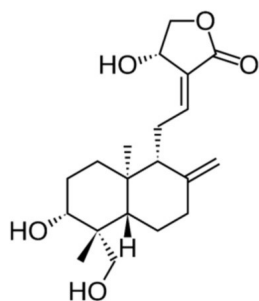
Tiến hành chiết AP trong mẫu dược liệu Xuyên tâm liên bằng phương pháp chiết siêu âm với ba dung môi được khảo sát gồm methanol, ethanol 96 % và hỗn hợp dicloromethan - methanol (1:1) với các thông số: số lần chiết là 1; thời gian chiết là 30 phút; tỷ lệ thể tích dung môi/ khối lượng dược liệu là 20 mL/g. Kết quả (bảng 1) cho thấy, khi sử dụng methanol và hỗn hợp dicloromethan - methanol (1:1) làm dung môi chiết AP từ Xuyên tâm liên cho khả năng chiết tốt, với hàm lượng AP thu được tương ứng là $1,05 \pm 0,03$ % và $0,98 \pm 0,02$ %. Methanol được lựa chọn là dung môi chiết AP từ dược liệu Xuyên tâm liên vì thành phần đơn giản, cho hiệu suất chiết cao.



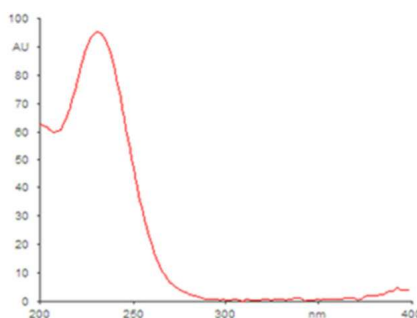
Hình 1. Kết quả triển khai sắc ký với dung dịch chuẩn AP (C) và dịch chiết dược liệu chuẩn Xuyên tâm liên (T) với các pha động (A): CHCl_3 -MeOH (10:1); (B): CHCl_3 -MeOH (9:1); (C): CHCl_3 -MeOH (7:1); (D): CHCl_3 -MeOH (4:1); (E): CHCl_3 -MeOH (1:1); (F): CHCl_3 -MeOH-EtOAc (12:1,5:1); (G): CHCl_3 -MeOH-EtOAc (8:1,5:1); (H): CHCl_3 -MeOH-EtOAc (8:3:1).



Hình 2. Sắc ký đồ dịch chiết dược liệu chuẩn Xuyên tâm liên với pha động CHCl_3 -MeOH (7:1) quét tại 223 nm.



Hình 3. Công thức cấu tạo của AP



Hình 4. Phổ hấp thụ UV của AP

Bảng 1. Kết quả đánh giá khả năng chiết AP từ dược liệu Xuyên tâm liên với các dung môi khác nhau

Dung môi	Hàm lượng AP (% TB ± SD, n = 3)
Methanol	1,05 ± 0,03
Ethanol 96 %	0,43 ± 0,01
Dicloromethan - methanol (1:1)	0,98 ± 0,02

Bảng 2. Thiết kế thí nghiệm và kết quả thực nghiệm khi tối ưu hóa các thông số của quá trình chiết siêu âm AP từ Xuyên tâm liên theo mô hình RSM-CCF

Thí nghiệm	Số lần chiết (lần)	Thời gian chiết (phút)	Tỷ lệ thể tích dung môi/ khối lượng dược liệu (mL/g)	Hàm lượng AP định lượng được (%)
1	1	10	10	1,04
2	5	10	10	1,95
3	1	50	10	1,46
4	5	50	10	2,18
5	1	10	50	1,12
6	5	10	50	2,05
7	1	50	50	1,61
8	5	50	50	2,25
9	1	30	30	1,21
10	5	30	30	2,14
11	3	10	30	2,03
12	3	50	30	2,17
13	3	30	10	2,10
14	3	30	50	2,14
15	3	30	30	2,11
16	3	30	30	2,10
17	3	30	30	2,14

Lựa chọn các thông số của quá trình chiết siêu âm

Nghiên cứu tiến hành tối ưu hóa các thông số của quá trình chiết siêu âm với hàm mục tiêu là hàm lượng AP trong Xuyên tâm liên định lượng được sau khi chiết (%), sử dụng phần mềm MODDE 5.0 (Umetrics, Thụy Điển). Qua khảo sát, ba thông số có ảnh hưởng đến khả năng chiết AP từ Xuyên tâm liên được tối ưu hóa gồm: số lần chiết (1 đến 5 lần); thời gian chiết (10 đến 50 phút); tỷ lệ thể tích dung môi/ khối lượng dược liệu (10 đến 50 mL/g).

Kết quả tối ưu hóa sơ bộ theo mô hình RSM-CCF với phần mềm MODDE 5.0 (hình 5) cho thấy, trong khoảng giá trị khảo sát, tỷ lệ thể tích dung môi/ khối lượng dược liệu là 50 mL/g, thời gian siêu âm 50 phút và số lần chiết 3,8 lần là tối ưu nhất để chiết AP từ Xuyên tâm liên. Hệ số xác định của mô hình cao (R2 là 0,990 và R2 hiệu chỉnh là 0,978) cho thấy sự phù hợp giữa mô hình và bảng số liệu thực nghiệm, thể hiện mô hình có độ chính xác cao. Hệ số Q2 cao (đạt 0,917) và chênh lệch so với R2 không quá 0,2 cho thấy mô hình có tính bền vững và khả năng dự đoán cao.

Nghiên cứu tiếp tục tiến hành khảo sát số lần chiết (3 lần, 4 lần, 5 lần) với tỷ lệ thể tích dung môi/ khối lượng dược liệu là 50 mL/g và thời gian siêu âm là 50 phút được giữ cố định. Kết quả (bảng 3) cho thấy khi chiết 4 lần, hàm lượng AP cao hơn so với chiết 3 lần và có sự khác biệt không đáng kể về hàm lượng AP khi so sánh với chiết 5 lần. Kết quả này cũng hoàn toàn phù hợp với kết quả tối ưu hóa (hình 5),



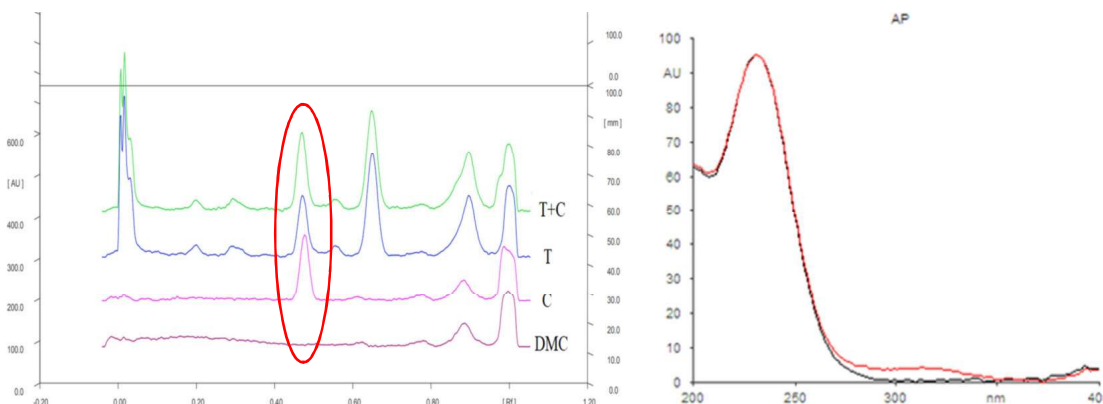
ham luong	Coeff. SC	Std. Err.	P	Conf. int(±)
Constant	2.10634	0.0261968	1.2116e-011	0.0619465
so	0.413	0.01936	1.25269e-007	0.0457798
ty	0.148	0.01936	0.00012169	0.0457798
tho	0.0439999	0.01936	0.0572476	0.0457798
so*so	-0.423591	0.0374025	9.36718e-006	0.0884439
ty*ty	0.00140848	0.0374025	0.971013	0.0884439
tho*tho	0.0214086	0.0374025	0.584967	0.0884439
so*ty	-0.0599999	0.0216452	0.0276154	0.0511834
so*tho	-0.00749991	0.0216452	0.739154	0.0511834
ty*tho	0.00500007	0.0216452	0.82392	0.0511834

N = 17	Q2 = 0.917	Cond. no. = 4.4382
DF = 7	R2 = 0.990	Y-miss = 0
	R2 Adj. = 0.978	RSD = 0.0612
		Conf. lev. = 0.95

Factor	Role	Value	Low Limit	High Limit
so lan chiet	Free		1	5
ty le the tích	Free		10	50
thoi gian chiet	Free		10	50

so lan chiet	ty le the tích	thoi gian chiet	ham luong	iter	log(D)
3.8096	49.9968	49.9855	2.3965	133	-10
3.8586	49.9997	12.7889	2.3057	109	-2.0921
3.8935	49.9999	29.0247	2.3267	109	-10
4.2	50	50	2.381	0	-10
4.1556	41.7037	32.3704	2.2757	16	-0.9471
4.2	50	50	2.381	0	-10
3.8	50	30	2.3292	0	-10
3.8	34	50	2.292	5	-1.3892

Hình 5. Kết quả thu được khi tối ưu hóa các thông số của quá trình chiết siêu âm AP từ Xuyên tâm liên theo mô hình RSM-CCF với phần mềm MODDE 5.0



Hình 6. Sắc ký đồ của dung môi chiết (DMC); dung dịch chuẩn AP (C); dung dịch thử (T); dung dịch thử thêm chuẩn (T+C)

Hình 7. Phổ hấp thụ UV của pic AP trên sắc ký đồ dung dịch chuẩn AP và dung dịch thử

do đó chiết 4 lần được lựa chọn cho quá trình chiết AP từ Xuyên tâm liên.

Bảng 3. Kết quả khảo sát số lần chiết AP từ Xuyên tâm liên với tỷ lệ thể tích dung môi/ khối lượng dược liệu là 50 mL/g và thời gian siêu âm là 50 phút

Số lần chiết	Hàm lượng AP (%), TB ± SD, n = 3)
3	2,12 ± 0,02
4	2,24 ± 0,03
5	2,25 ± 0,06

Thẩm định phương pháp

Độ phù hợp hệ thống

Chấm lặp lại 6 lần, mỗi lần 5 µL dung dịch

chuẩn AP nồng độ khoảng 120 mg/L - nồng độ làm việc 100 % (tương đương khoảng 600 ng AP/ vết) thành 6 vết riêng biệt lên bản mỏng rồi tiến hành sắc ký. Kết quả phân tích cho thấy, hệ thống sắc ký phù hợp cho định lượng AP trong Xuyên tâm liên với RSD của diện tích pic (1,59 %) và Rf (0 %) đều dưới 2 %.

Độ chọn lọc

Các mẫu dung môi chiết (methanol - mẫu trắng), dung dịch chuẩn AP (nồng độ làm việc 100 %), dung dịch thử (từ dược liệu chuẩn Xuyên tâm liên) và dung dịch thử thêm chuẩn được chấm lên cùng bản mỏng rồi tiến hành phân tích. Kết quả cho thấy, trên sắc ký đồ dung dịch thử và dung dịch thử thêm chuẩn



xuất hiện pic có màu sắc, hình dạng và Rf tương đồng với pic AP trên sắc ký đồ dung dịch chuẩn với độ tinh khiết của pic trên 99,87 %; đồng thời sắc ký đồ của dung môi chiết không xuất hiện pic tại vị trí tương ứng với pic AP chuẩn (hình 6). Chồng phổ hấp thụ UV của pic AP trên sắc ký đồ dung dịch chuẩn và dung dịch thử (hình 7) cho thấy có sự tương đồng về hình dạng và đỉnh hấp thụ với hệ số match đạt 0,9991 %. Như vậy phương pháp phân tích đáp ứng yêu cầu về độ chọn lọc cho phép định lượng AP trong Xuyên tâm liên.

Khoảng tuyến tính

Kết quả (bảng 4) cho thấy, trong khoảng tuyến tính khảo sát từ 199,2 - 996,0 ng AP/ vết, có sự tương quan chặt chẽ giữa diện tích pic và lượng AP đưa lên bản mỏng với hệ số tương quan $R \geq 0,999$.

Bảng 4. Kết quả khảo sát khoảng tuyến tính

Lượng AP đưa lên bản mỏng (ng/ vết)	199,2	398,4	597,6	796,8	996,0
Diện tích pic	1346,45	2540,58	3689,86	4791,25	5797,14
Phương trình hồi quy	$y = 5,5984x + 287,44$				
R	0,9995				

Độ lặp lại

Kết quả phân tích 6 mẫu thử độc lập (bảng 5) cho thấy, phương pháp có độ lặp lại tốt với RSD của hàm lượng AP là 2,02 %, đáp ứng yêu cầu theo quy định của AOAC (không quá 2,7 %) [3].

Bảng 5. Kết quả khảo sát độ lặp lại

STT	1	2	3	4	5	6
Diện tích pic	2778,52	2834,11	2878,04	2873,54	2911,93	2962,24
Khối lượng được liệu (g)	0,4002	0,4010	0,4006	0,4013	0,4009	0,4034
Hàm lượng AP (%)	2,19	2,23	2,27	2,26	2,29	2,32
TB (%)	2,26					
RSD (%)	2,02					

Độ đúng

Tiến hành khảo sát độ đúng theo phương pháp thêm chuẩn để thu được các dung dịch thử thêm chuẩn có nồng độ tương ứng 50 %, 100 % và 150 % so với nồng độ định lượng (phần chuẩn bị mẫu); mỗi mức nồng độ làm 3 mẫu độc lập. Kết quả (bảng 6) cho thấy, độ thu hồi của AP nằm trong giới hạn cho phép từ 97,0 - 103,0 % và RSD hàm lượng tại mỗi mức nồng độ đạt yêu cầu không quá 2,7 % [3]. Như vậy, phương pháp đáp ứng yêu cầu độ đúng theo quy định của AOAC và khoảng xác định của phương pháp là từ 300,2 - 902,8 ng AP/ vết.

Bảng 6. Kết quả khảo sát độ đúng

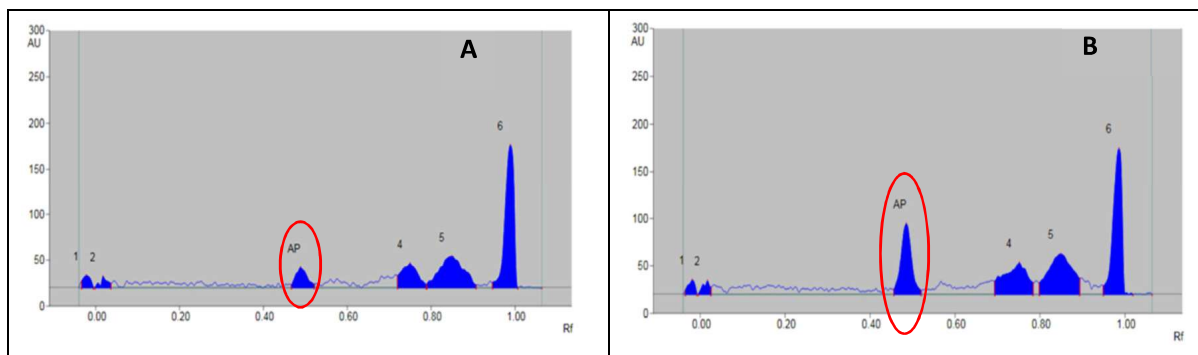
Mức nồng độ	Lượng chuẩn thêm vào (mg)	Khối lượng được liệu (g)	Lượng AP trong mẫu (mg)	Độ thu hồi (%)	RSD (%)
50%	1,79	0,1209	4,52	100,0	1,21
		0,1206	4,41	97,6	
		0,1203	4,45	98,8	
100%	6,31	0,1202	8,81	97,7	1,72
		0,1207	9,13	101,0	
		0,1202	8,90	98,6	
150%	10,83	0,1207	13,77	101,6	0,30
		0,1202	13,70	101,2	
		0,1209	13,81	101,8	

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

Phân tích các dung dịch chuẩn AP ở nồng độ giảm dần và xác định tỷ lệ S/N. Kết quả cho thấy, lượng AP đưa lên bản mỏng là 49,8 ng/ vết thì tỷ lệ S/N là 3,3 tương ứng với LOD của phương pháp (hình 8, (A)). Với lượng AP là 199,2 ng/ vết, tỷ lệ S/N là 10,2 (hình 8, (B)) được lựa chọn là điểm thấp nhất của đường chuẩn. Theo kết quả đánh giá độ đúng và khoảng xác định (bảng 6), LOQ của phương pháp là 300,2 ng/ vết.

Định lượng AP trong các mẫu dược liệu Xuyên tâm liên

Các mẫu dược liệu Xuyên tâm liên được tiến hành xử lý và sắc ký theo phương pháp đã xây dựng và thẩm định. Kết quả định lượng



Hình 8. Sắc ký đồ dung dịch chuẩn AP với lượng AP đưa lên bản mỏng là 49,8 ng/ vết (A) và 199,2 ng/ vết (B)

(bảng 7) cho thấy, trong các mẫu dược liệu đều có AP với hàm lượng khác nhau. Mẫu HN2 có hàm lượng AP cao nhất (3,00 %), trong khi các mẫu HN1 và NA có hàm lượng AP thấp (0,58 %), riêng mẫu DLC có hàm lượng AP thấp nhất (0,52 %).

Bảng 7. Kết quả định lượng AP trong một số mẫu dược liệu Xuyên tâm liên

STT	Ký hiệu mẫu	Nơi lấy mẫu	Hàm ẩm (%)	Hàm lượng AP (%) (TB ± SD, n = 3)
1	BN	Ninh Hiệp (Bắc Ninh)	6,79	2,23 ± 0,04
2	HY	Nghĩa Trai (Hưng Yên)	7,50	2,78 ± 0,03
3	HN1	Lãn Ông (Hà Nội)	6,56	0,58 ± 0,01
4	HN2	Lãn Ông (Hà Nội)	6,83	3,00 ± 0,02
5	NA	Nghệ An	7,12	0,58 ± 0,01
6	QN	Hạ Long (Quảng Ninh)	8,06	0,82 ± 0,02
7	DLC	Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương	8,70	0,52 ± 0,01

Bàn luận

Hiện nay theo quy định của Dược điển Việt Nam, định lượng tổng diterpen lacton trong Xuyên tâm liên được tiến hành bằng phương pháp đo quang sau khi tạo màu với thuốc thử Kedde và sử dụng đường chuẩn AP tiến hành trong cùng điều kiện để xác định hàm lượng diterpen lacton toàn phần theo AP [1]. Phương pháp này không đặc hiệu nên không cho phép định lượng riêng các diterpen lacton trong Xuyên tâm liên, đặc biệt là AP -

marker (diterpen lacton chính), phản ứng của AP và thuốc thử Kedde nhanh mất màu, quá trình dẫn xuất hóa tương đối phức tạp. So sánh với phương pháp định lượng theo Dược điển Việt Nam, phương pháp định lượng AP trong Xuyên tâm liên bằng HPTLC đã xây dựng có ưu điểm là độ chọn lọc tốt, cho phép xác định chính xác hàm lượng hoạt chất chính AP trong dược liệu mà không cần dẫn xuất hóa nên tiết kiệm thời gian, hóa chất. Với thao tác đơn giản, có thể phân tích đồng thời nhiều mẫu, cho kết quả phân tích nhanh, chi phí thấp, tiết kiệm dung môi, phương pháp đã xây dựng có thể dễ dàng áp dụng thường quy trong kiểm tra chất lượng dược liệu Xuyên tâm liên tại các phòng thí nghiệm được trang bị hệ thống HPTLC hiện đại.

AP có cấu tạo (hình 3) gồm các nhóm mang màu (alken, dị vòng liên hợp) và các nhóm trợ màu (hydroxyl) nên có khả năng hấp thụ UV với cực đại hấp thụ ở khoảng 223 nm (hình 4). Vì vậy, bước sóng này được lựa chọn cho định lượng trực tiếp AP trong Xuyên tâm liên mà không cần dẫn xuất hóa [6]. Ngoài ra, tính năng UV Scanner cũng cho phép quét phổ hấp thụ của pic, đánh giá độ tinh khiết pic, chồng phổ thử và chuẩn giúp cung cấp thêm thông tin định tính chất phân tích. Phương pháp sử dụng pha tĩnh là bản mỏng TLC silica gel 60 F 254 phổ biến, cho hiệu quả phân tách tốt (hình 2) và chi phí thấp hơn so với bản mỏng HPTLC [7]. Pha động sử dụng hỗn hợp cloroform - methanol (7:1) có



ưu điểm là đơn giản, không sử dụng dung môi toluen có thể gây hại cho sức khỏe [6]. Quy trình xử lý mẫu sử dụng chiết siêu âm đơn giản, hạn chế ảnh hưởng bởi nhiệt độ vì AP dễ bị phân hủy khi tăng nhiệt độ [5].

Phương pháp xây dựng đã được thẩm định đầy đủ theo hướng dẫn của AOAC về các chỉ tiêu độ phù hợp hệ thống; độ chọn lọc (hình 6, 7); khoảng tuyến tính (bảng 4); độ lặp lại (bảng 5); độ đúng (bảng 6); giới hạn phát hiện và giới hạn định lượng (hình 8). Kết quả định lượng AP trong một số mẫu dược liệu Xuyên tâm liên được thu mua từ các nơi khác nhau trên thị trường theo phương pháp (bảng 7) cho thấy, hàm lượng AP có sự khác biệt lớn (từ 0,58 % đến 3,00 %). Riêng mẫu dược liệu chuẩn có hàm lượng AP là 0,52 % so với tổng hàm lượng andrographolid, neoandrographolid, 14-deoxyandrographolid, dehydroandrographolid được công bố là 2,0 %. Với khả năng phân tách tốt AP khỏi các thành phần khác của nền mẫu (hình 1 C, hình 2), điều kiện sắc ký được sử dụng trong phương pháp định lượng AP đã xây dựng hoàn toàn có thể được áp dụng đồng thời để định tính Xuyên tâm liên bằng cách so sánh sắc ký đồ của dịch chiết dược

liệu với sắc ký đồ của dung dịch AP chuẩn hoặc dịch chiết dược liệu chuẩn Xuyên tâm liên trên cùng bản mỏng. Như vậy, việc xây dựng phương pháp định lượng AP trong Xuyên tâm liên bằng HPTLC là rất cần thiết nhằm góp phần kiểm soát chất lượng của các mẫu dược liệu Xuyên tâm liên được sản xuất và lưu hành trên thị trường.

Kết luận

Nghiên cứu đã xây dựng thành công phương pháp định lượng AP trong Xuyên tâm liên bằng kỹ thuật HPTLC với pha tĩnh là bản mỏng TLC silica gel 60 F 254, pha động là hỗn hợp chloroform - methanol (7:1, tt/tt) và bước sóng định lượng là 223 nm. Phương pháp phân tích có độ chọn lọc cao, độ đúng (trong khoảng 97,0 - 103,0 %) và độ lặp lại (RSD dưới 2,7 %) tốt, đã được áp dụng thành công để định lượng AP trong một số mẫu dược liệu Xuyên tâm liên trên thị trường. Với quy trình xử lý mẫu đơn giản, sử dụng các hóa chất phổ biến, phương pháp có thể được ứng dụng rộng rãi tại các cơ sở phân tích có trang bị hệ thống HPTLC hiện đại để kiểm tra chất lượng của dược liệu Xuyên tâm liên được sản xuất và lưu hành trên thị trường.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Bộ Y tế (2017), Chuyên luận Xuyên tâm liên, *Dược điển Việt Nam V (tập 2)*, Nhà xuất bản y học, Hà Nội, tr. 1380-1382.
2. Phạm Thị Nguyệt Hằng, Trịnh Thị Điệp, William R. Folk (2021), "Xuyên tâm liên: Tổng quan về thành phần hóa học và tác dụng dược lý", *Tạp chí Dược liệu*, 4(26), tr. 199-211.
3. AOAC International (2016), "Appendix F: Guidelines for Standard Method Performance Requirements", *AOAC Official Methods of Analysis*, USA.
4. Council of Europe (2019), *European pharmacopoeia 10.0*, pp. 1305-1307.
5. Lee S. Y., et al. (2019), "Stability and toxicity profile of solution enhanced dispersion by supercritical fluids (SEDS) formulated *Andrographis paniculata* extract", *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, vol. 36(2), pp. 969-978.
6. Pawar R.K., et al. (2010), "Development and validation of HPTLC method for the determination of andrographolide from *Andrographis paniculata* (whole plant)", *International Journal of Chemistry Research*, vol. 1(2), pp. 15-19.
7. Sarika R. Zade, et al. (2013), "Development and validation of HPTLC method for estimation of hepatoprotective diterpenoid andrographolide in polyherbal formulations", *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, vol. 5(3), pp. 976-980.