



Original Article

Simultaneous Quantification of Hederacoside C and α -hederin in *Hedera Nepalensis* K.Koch Using HPLC-UV

Do Thi Thuy Linh¹, Hoang Thanh Duong¹, Nguyen Tuan Hiep¹,
Pham Thanh Huyen¹, Nguyen Minh Khoi¹, Dinh Doan Long^{2,*}

¹National Institute of Medicinal Materials, 3 Quang Trung, Hoan Kiem, Hanoi, Vietnam

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

Received 06 April 2020

Revised 22 April 2020; Accepted 03 June 2020

Abstract: This study develops a high performance liquid chromatography with ultraviolet detection (HPLC-UV) for simultaneous quantification of hederacoside C and α -hederin in *Hedera nepalensis* K. Koch. The method proposed in this study was validated in terms of the analytical parameters such as high repeatability, high accuracy and good sensitivity. The method was used to determine the content of hederacoside C and α -hederin in *Hedera nepalensis* K. Koch, which had been collected in Ha Giang, Lao Cai and Lai Chau. The study results show that the content of hederacoside C and the content of α -hederin ranged from 0.40 to 4.01% and 0.21 – 0.54% based on absolute dry mass, respectively.

Keywords: *Hedera nepalensis* K. Koch, hederacoside C, α -hederin, HPLC-UV.

* Corresponding author.

Email address: dinhdoanlong.smp@gmail.com

<https://doi.org/10.25073/2588-1116/vnumps.4227>

Định lượng hederacoside C và α -hederin trong dây thường xuân (*Hedera nepalensis* K. Koch) bằng HPLC-UV và ứng dụng

Đỗ Thị Thùy Linh¹, Hoàng Thành Dương¹, Nguyễn Tuấn Hiệp¹,
Phạm Thanh Huyền¹, Nguyễn Minh Khởi¹, Đinh Đoàn Long^{2,*}

¹*Viện Dược liệu, 3 Quang Trung, Hoàn Kiếm, Hà Nội, Việt Nam*

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

Nhận ngày 06 tháng 4 năm 2020

Chỉnh sửa ngày 22 tháng 4 năm 2020; Chấp nhận đăng ngày 03 tháng 6 năm 2020

Tóm tắt: Trong nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành phát triển phương pháp phân tích định lượng đồng thời hederacoside C và α -hederin trong loài dây thường xuân (*Hedera nepalensis* K. Koch) bằng phương pháp HPLC-UV. Kết quả thẩm định cho thấy phương pháp xây dựng có độ lặp lại cao, độ chính xác cao và độ nhạy tốt. Áp dụng phương pháp xây dựng được nhằm đánh giá hàm lượng hederacoside C và α -hederin trong các mẫu dây thường xuân thu hái tại Hà Giang, Lai Châu và Lào Cai. Kết quả thu được cho thấy hàm lượng hederacoside C dao động trong khoảng từ 0,4 – 4,01 % và α -hederin trong khoảng 0,21 – 0,54 % tính theo khối lượng khô tuyệt đối.

Từ khóa: *Hedera nepalensis* K. Koch, hederacoside C, α -hederin, HPLC-UV.

1. Mở đầu

Hedera (L.) là một chi thuộc họ Nhân sâm (Araliaceae) và ghi nhận được khoảng 15 loài, một số loài được biết có giá trị làm thuốc. Trong đó có 2 loài đến nay được sử dụng rộng rãi và nghiên cứu nhiều hơn cả về dược học là thường xuân (*Hedera helix*) và dây thường xuân (*Hedera nepalensis*). Theo đó *H. helix* được tìm thấy chủ yếu ở Châu Âu và một phần Nam Á, còn *H. nepalensis* được ghi nhận phân bố ở một số nước ở Châu Âu, dãy Himalaya và một số vùng núi cao của Việt Nam [1,2].

Ở Châu Âu, loài thuộc chi *Hedera* được biết đến và sử dụng làm thuốc từ lâu đời ở nhiều quốc gia. Các nghiên cứu tiền lâm sàng và lâm sàng khẳng định hiệu quả của cao chiết thường xuân có tác dụng như giãn cơ trơn, chống co thắt phế

quản, giảm tiết nhày, long đờm, chống viêm, chống nhiễm khuẩn, bảo vệ gan, chống oxy hóa [3-7].

Bên cạnh đó các nghiên cứu về thành phần hóa học cho thấy trong Thường xuân có khoảng 2,5 – 6,0 % bidesmosidic triterpene saponin, ngoài ra còn có flavonoid, coumarin, phytosterol, acid amin. Trong đó thành phần có saponin có hàm lượng lớn nhất và chủ yếu có chứa hederacoside C và một số hederacoside khác [1,8,9].

Ở Châu Âu, *H. helix* L. đã được Cơ quan quản lý dược Châu Âu (EMA – European Medicines Agency) đưa vào Dược điển châu Âu [10]. Đến nay, mặc dù loài thường xuân chưa được tìm thấy có trong tự nhiên ở nước ta, nhưng loài cây này đã được trồng tại một số địa phương (Đà Lạt, Lâm Đồng) nhưng với quy mô rất nhỏ,

* Tác giả liên hệ.

Địa chỉ email: dinhdoanlong.smp@gmail.com

<https://doi.org/10.25073/2588-1132/vnumps.4227>

chủ yếu để làm cảnh [11]. Trong khi đó gần đây, kết quả điều tra dược liệu ở miền núi phía Bắc Việt Nam đã phát hiện được ở Hà Giang, Lào Cai, Lai Châu có sự phân bố khá phong phú của loài dây Thường xuân (*H. nepalensis* K. Koch) với trữ lượng ước tính ban đầu khoảng hàng chục tấn nhưng lại chưa được nghiên cứu khai thác và phát triển. Chính vì vậy, nhóm nghiên cứu của chúng tôi dựa trên các nghiên cứu trong và ngoài nước để tiến hành xây dựng phương pháp định lượng hederacoside C và α -hederin trong loài *H. nepalensis* K. Koch là cơ sở cho các nghiên cứu tiếp theo về loài dây thường xuân.

2. Nguyên liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Nguyên liệu

Mẫu dược liệu: mẫu dây thường xuân được thu hái 8/2018 tại một số tỉnh miền Bắc Việt Nam. Sau khi thu hái, lá được tách ra khỏi dây, sấy khô ở nhiệt độ 50°C và bảo quản trong túi polymer. Mẫu được Khoa Tài nguyên Dược liệu, Viện Dược liệu giám định tên khoa học và lưu tại Khoa Công nghệ Chiết xuất và Khoa Tài nguyên Dược liệu, Viện Dược liệu.

Dung môi hóa chất: methanol và acetonitril (Fisher – Hàn Quốc, HPLC grade), acid formic (Merck – Đức, HPLC grade), H_3PO_4 80% (Merck - Đức, HPLC grade), nước cất hai lần đạt tiêu chuẩn HPLC; các dung môi dùng để chiết xuất mẫu đạt tiêu chuẩn phân tích.

Chất chuẩn hederacoside C (CAS number 14216-036) độ tinh khiết > 98% và chất chuẩn α -hederin (CAS number 27013-91-8) độ tinh khiết > 98% do viện công nghệ hóa học cung cấp.

2.2. Thiết bị

Hệ thống HPLC (Shimadzu) bao gồm: bơm LC-20AD, bộ tiêm mẫu tự động SIL -20AHT, detector SPD – M20A, lò cột CTO – 10AS VP, cột Shim – pack GIST C18 (250 × 4,6 mm, 5 μ m).

Một số thiết bị khác: cân phân tích AND GR – 120 (độ chính xác 0,1 mg), máy chiết Soxhlet Velp SER 148.

2.3. Phương pháp nghiên cứu

2.3.1. Điều kiện sắc ký

Hệ thống sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) Shimadzu, cột Shim- pack GIST C₁₈ (250 × 4,6 mm, 5 μ m), nhiệt độ cột: 25 °C, thể tích tiêm: 20 μ L, tốc độ dòng: 1 ml/ phút, bước sóng phát hiện: 210 nm, pha động: acetonitrile (Kênh A) và dung dịch acid phosphoric 0,1% (Kênh B). Rửa giải theo chương trình gradient trình bày trong Bảng 1 [10].

Bảng 1. Chương trình dung môi rửa giải

Thời gian (phút)	A (%)	B (%)
0	20	80
25	60	40
30	100	0
40	100	0

2.3.2. Chuẩn bị mẫu

Dung dịch thử: cân chính xác 1 g mẫu bột dược liệu thêm khoảng 70 ml ethanol 50 %, đun hồi lưu trong 2 giờ, sau đó lấy phần dịch trong. Phần bã lại thêm khoảng 70 ml ethanol 50% và tiến hành chiết lặp lại. Quá trình lặp lại 2 lần, gộp phần dịch chiết thu được cô quay chân không tới cạn. Hòa tan hoàn toàn cặn bằng methanol và định mức 50 ml, lọc qua màng lọc 0,45 μ m thu được dung dịch thử tiêm sắc ký [10-13].

Dung dịch chuẩn: cân chất chuẩn hederacoside C và α -hederin và hòa tan trong methanol để thu được dãy dung dịch chuẩn có nồng độ chính xác là: 25, 50, 100, 200, 500, 1000 μ g/ml.

2.3.3. Thẩm định phương pháp phân tích

Phương pháp phân tích được thẩm định theo yêu cầu chung của ICH (International Conference on Harmonisation), AOAC (Association of Official Analytical Chemists) bao gồm: tính phù hợp của hệ thống, độ đặc hiệu, giới hạn phát hiện, giới hạn định lượng, khoảng tuyến tính, độ lặp lại và độ thu hồi [14,15].

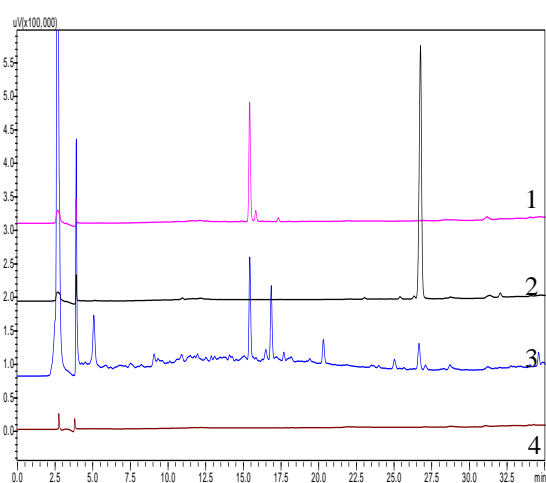
2.3.4. Xử lý số liệu

Hàm lượng hederacoside C và α -hederin (%) có trong mẫu lá thường xuân được tính theo công thức:

$$X\% = \frac{C \times 50 \times P \times 100}{m \times (1 - W) \times 10^6}$$

3. Kết quả

3.1. Xây dựng và thẩm định quy trình



Hình 1. Sắc ký đồ của chuẩn hederacoside C (1), chuẩn α -hederin (2), mẫu dịch chiết dây thường xuân (3), mẫu trắng (4).

Tính đặc hiệu: tiến hành sắc ký với mẫu trắng, mẫu thử và mẫu chuẩn theo quy trình phân tích (mục 2.3.1). Ghi lại sắc ký đồ, xác định thời gian lưu của mẫu chuẩn và mẫu thử (Hình 1).

Kết quả: trên sắc ký đồ của dung môi pha mẫu không xuất hiện peak ở trong khoảng thời gian lưu của peak trên sắc ký đồ dung dịch chuẩn. Trên sắc ký đồ của dung dịch thử có peak đáp ứng với thời gian lưu của peak chuẩn hederacoside C và α -hederin. Bên cạnh đó sắc ký đồ thu được cho các peak tách rõ ràng, nhiễu nền thấp, chứng tỏ phương pháp và hệ thống sắc ký có tính chọn lọc cao.

Tính tương thích của hệ thống: phân tích lặp lại 6 lần hỗn hợp dung dịch chuẩn hederacoside C và α -hederin có nồng độ 50 $\mu\text{g/ml}$, tiến hành sắc ký với điều kiện đã lựa chọn (mục 2.3.1). Giá trị độ lệch chuẩn tương đối (RSD) của diện tích peak và thời gian lưu đối với hederacoside C lần lượt là 0,09 và 0,56%, của α -hederin lần lượt là: 0,07 và 0,47% (Bảng 2). Các giá trị RSD đều nhỏ hơn 2,0% chứng tỏ hệ thống và phương pháp phân tích sử dụng phù hợp cho phân tích hederacoside C và α -hederin trong loài *H. nepalensis* [14,15].

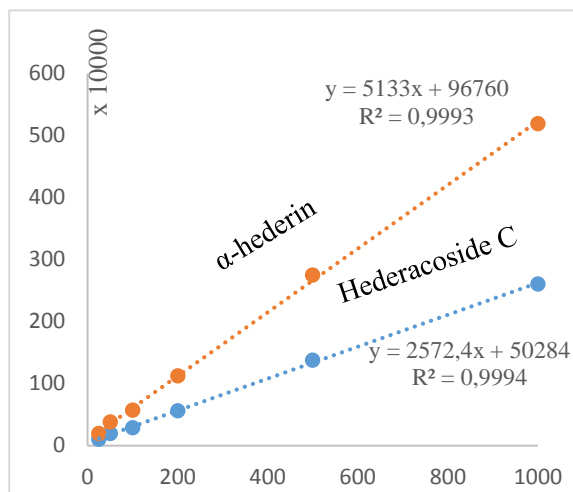
Khoảng tuyến tính và đường chuẩn: chuẩn bị dãy dung dịch chuẩn hederacoside C và α -hederin có nồng độ từ 25 – 1000 $\mu\text{g/ml}$.

Bảng 2. Kết quả khảo sát tính tương thích của hệ thống

Chất	Thời gian lưu	Diện tích	Chiều cao	Chất	Thời gian lưu	Diện tích	Chiều cao
Hederacoside C	15,458	197682	26042	α - hederin	26,702	382916	38449
	15,427	194543	26343		26,669	379514	36922
	15,419	195843	26352		26,650	380846	36994
	15,435	196053	26545		26,662	382305	37183
	15,430	196537	26559		26,660	383510	37310
	15,426	197138	26730		26,661	384431	37372
Trung bình	15,430	196299,33	26428,50	Trung bình	26,670	382253,67	37371,67
Độ lệch chuẩn tương đối	0,090	0,56	0,90	Độ lệch chuẩn tương đối	0,070	0,47	1,49

Bảng 3. Kết quả khảo sát khoảng tuyến tính của hederacoside C và α -hederin

Mẫu	Nồng độ ($\mu\text{g/ml}$)	Diện tích peak	
		Hederacoside C (mAU.s)	α -hederin (mAU.s)
1	25	99487	191851
2	50	195843	380846
3	100	286849	570365
4	200	562849	1121960
5	500	1373993	2749619
6	1000	2605857	5190277



Hình 2. Đồ thị mối tương quan giữa nồng độ và diện tích peak của hederacoside C và α -hederin

Tiến hành sắc ký dung dịch chuẩn (mỗi dung dịch tiêm 3 lần) như điều kiện mục 2.3.1. Kết quả khảo sát khoảng tuyến tính từ 25 – 1000 $\mu\text{g/ml}$ của chất chuẩn được thể hiện trong Bảng 3 và Hình 2.

Kết quả: Với hệ số tương quan tuyến tính 0.9994 của hederacoside C và 0,9993 đối với α -hederin cho thấy trong khoảng nồng độ của hederacoside C và α - hederin từ 25 – 1000 $\mu\text{g/ml}$ có sự tương quan tuyến tính giữa nồng độ và diện tích peak tương ứng [14,15].

Giới hạn phát hiện (LOD) và giới hạn định lượng (LOQ): tiến hành pha loãng dung dịch hỗn hợp chuẩn và phân tích HPLC đến khi tín hiệu của chất chuẩn định phân tích trên sắc ký đồ thu được có tỉ lệ S/N (tín hiệu/nhiều) = 2H/h đạt trong khoảng từ 2- 3; trong đó H là chiều cao peak phân tích, h là chiều cao tín hiệu nhiễu nền [14,15].

$$\text{LOD} = 2\text{H}/\text{h}$$

$$\text{LOQ} = 3,3 \times \text{LOD}$$

Kết quả: xác định được LOD và LOQ của hederacoside C lần lượt là: 1,28 và 4,27 $\mu\text{g/ml}$, của α -hederin lần lượt là: 1,05 và 3,51 $\mu\text{g/ml}$.

Độ lặp của phương pháp phân tích: phân tích lặp lại 6 lần mẫu thử đây thường xuyên (xử lý mẫu và điều kiện phân tích như mục 2.3.2). Độ lặp lại của phương pháp được xác định bằng giá trị độ lệch chuẩn tương đối (RSD) của hàm lượng hederacoside C và α - hederin. Độ lệch chuẩn tương đối đều nhỏ hơn 2,7 % cho thấy phương pháp phân tích có độ lặp lại tốt (Bảng 4) [14,15].

Bảng 4. Kết quả khảo sát độ lặp của phương pháp

Mẫu	KL	Hederacoside C		α - hederin	
		Area	Hàm lượng (%)	Area	Hàm lượng (%)
1	0,5016	408430	1,61	430287	0,78
2	0,5040	430958	1,70	436029	0,79
3	0,5051	430340	1,69	432604	0,78
4	0,5042	419300	1,65	439531	0,79
5	0,5057	411219	1,61	456842	0,83
6	0,5025	422247	1,67	426848	0,77
Trung bình		420415,67	1,66	437023,50	0,79
Độ lệch chuẩn tương đối		2,24	2,35	2,44	2,66

Bảng 5. Kết quả khảo sát độ đúng

Chất	Lượng gốc (μg)	Lượng thêm chuẩn (μg)	Lượng thu hồi (μg)	Độ thu hồi (%)
Hederacoside C	248,39	281,04	280,73	99,89
	248,39	300,42	306,98	102,18
	248,39	387,64	398,51	102,80
α - hederin	39,01	34,93	35,82	102,55
	39,01	40,91	41,73	102,00

Độ đúng của phương pháp: khi thêm chuẩn ở 3 mức: 80, 100 và 120% vào mẫu phân tích, phương pháp đều cho độ thu hồi nằm trong khoảng 98 – 102% (Bảng 5). Kết quả này cho

thấy phương pháp đã xây dựng có độ thu hồi tốt, phù hợp với phương pháp định lượng hederacoside C và α -hederin trong dây thường xuân [14,15].

3.2. Đánh giá hàm lượng hederacoside C và α -hederin trong một số mẫu Dây thường xuân ở Việt Nam.

Áp dụng phương pháp xử lý mẫu và điều kiện sắc ký đã lựa chọn để phân tích một số mẫu dây thường xuân thu hái ở Việt Nam. Kết quả định lượng hederacoside C và α -hederin trong các mẫu được thể hiện ở Bảng 6.

Bảng 6. Hàm lượng hederacoside C và α -hederin trong một số mẫu dây thường xuân (*Hedera nepalensis*)

STT	Ký hiệu mẫu	Nơi thu hái	Thời gian	Hàm lượng (%)	
				Hederacoside C	α - hederin
1	TL1_170_1	Đồng Văn, Hà Giang	08/2018	3,0887	0,2407
2	TL1_170_15	Xí Mần, Hà Giang	08/2018	4,0107	0,5432
3	TL1_170_19	Sìn Hồ, Lai Châu	12/2018	2,6524	0,2152
4	TL1_170_24	Sa Pa, Lào Cai	04/2019	0,9805	0,3512
5	TL1_170_26	Sa Pa, Lào Cai	04/2019	0,4017	0,5399

Nhận xét: các kết quả cho thấy hàm lượng hederacoside C và α -hederin trong lá thường xuân ở các địa điểm khác nhau có sự chênh lệch, Hàm lượng hederacoside C giao động trong khoảng từ 0,40 – 4,01 %, trong khi đó α -hederin trong khoảng 0,21 – 0,54 % tính theo khối lượng khô tuyệt đối. Trong đó, các mẫu thu hái Hà Giang sơ bộ có hàm lượng hederacoside C cao hơn so với các mẫu thu hái tại Lai Châu và Lào Cai. Mẫu thu hái tại Lào Cai cho thấy có hàm lượng α - hederin cao nhất đạt 0,54%.

4. Kết luận

Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã tiến hành xây dựng phương pháp định lượng hederacosid C và α -hederin trong dây thường xuân (*H. nepalensis* K, Koch) bằng HPLC-UV.

Phương pháp được đánh giá có độ chính xác cao, độ lặp lại tốt và độ nhạy đạt yêu cầu. Bên cạnh đó, chúng tôi đã tiến hành phân tích một số mẫu dây thường xuân thu hái tại một số địa phương khác nhau. Hàm lượng hederacoside C và α -hederin thu được lần lượt giao động trong khoảng 0,40 – 4,01 % và 0,21 – 0,54 %. Kết quả thu được là cơ sở khoa học cho việc nghiên cứu loài *H. nepalensis* K. Koch trong việc phát triển vùng trồng cũng như ứng dụng làm thuốc.

Lời cảm ơn

Nghiên cứu này được tài trợ bởi đề tài: “Nghiên cứu khai thác và phát triển nguồn gen dây thường xuân (*Hedera nepalensis* K, Koch) tại một số tỉnh vùng núi Tây Bắc” có mã số NVQG-2018/02.

Tài liệu tham khảo

- [1] L. Jafri, et al, In vitro assessment of antioxidant potential and determination of polyphenolic compounds of *Hedera nepalensis* K. Koch, *Arabian Journal of Chemistry*. 10 (2017) 3699-3706. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2014.05.002>.
- [2] S. Saleem, et al, Plants *Fagonia cretica* L, and *Hedera nepalensis* K. Koch contain natural compounds with potent dipeptidyl peptidase-4 (DPP-4) inhibitory activity, *Journal of ethnopharmacology*. 156 (2014) 26-32. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2014.08.017>
- [3] D.H. Bich, Medicinal plants and animals for medicine in Vietnam, Vol 1, Science and Technics Publishing House, Hanoi, 2006 (in Vietnamese).
- [4] National Institute Of Medicinal Materials, List of medicinal plants in Vietnam, Science and Technics Publishing House, Hanoi, 2016 (in Vietnamese).
- [5] L. Jafri, et al, *Hedera nepalensis* K. Koch: A Novel Source of Natural Cancer Chemopreventive and Anticancerous Compounds, *Phytotherapy research*. 30(3) (2016) 447-453. <https://doi.org/10.1002/ptr.5546>.
- [6] S. Kanwal, et al, Antioxidant, antitumor activities and phytochemical investigation of *Hedera nepalensis* K. Koch, an important medicinal plant from Pakistan, *Pakistan Journal of Botany*. 43 (2011) 85-89.
- [7] G. Uddin, et al, Biological screening of ethyl acetate extract of *Hedera nepalensis* stem, *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 6(42) (2012) 2934-2937. <https://doi.org/10.5897/AJPP12.828>
- [8] H. Kizu, et al, Studies on Nepalese Crude Drugs, III, On the Saponins of *Hedera nepalensis* K. Koch, *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*. 33(8) (1985) 3324-3329. <https://doi.org/10.1248/cpb.33.3324>
- [9] X. Tong, et al, Extraction and GC-MS Analysis of Volatile Oil from *Hedera nepalensis* var *sinensis*, *Fine Chemicals*. 24(6) (2007) 559-561.
- [10] EDQM, European Pharmacopoeia, fifth ed., Council of Europe, France, 2015.
- [11] N.T.H. Mai, et al, Simultaneous Quantification of Hederacoside C and α -Hederin from the Leaves of *Hedera helix* L. by HPLC, *Journal of Medicinal Material*. 21(6) (2016). (in Vietnamese).
- [12] L. Havlíková, et al, Rapid Determination of α -Hederin and Hederacoside C in Extracts of *Hedera helix* Leaves Available in the Czech Republic and Poland, *Natural product communications*. 10(9) (2015). <https://doi.org/10.1177/1934578X1501000910>
- [13] M. Yu, et al, Determination of Saponins and Flavonoids in Ivy Leaf Extracts Using HPLC-DAD, *Journal of Chromatographic Science*. 53(4) (2014) 478-483. <https://doi.org/10.1093/chromsci/bmu068>.
- [14] EMEA, Validation of analytical procedures: text and methodology Q2 (R1), in International conference on harmonization, Geneva, Switzerland, 2005.
- [15] W. Horwitz, Official methods of analysis, 12 ed., Vol 1, Association of Official Analytical Chemists, Washington DC, 1975.