



Original Article

Simultaneous Quantification of Kirenol, Daurutoside,
and Darutigenol in *Siegesbeckia orientalis* L.
by HLPC-DPA Method

Tran Thi Van Anh^{1,*}, Pham Quoc Tuan¹, Nguyen Van Khanh²,
Dao Viet Hung¹, Nguyen Thanh Hai², Nguyen Quoc Tuan^{1,3},
Nguyen Thi Minh Diep¹, Ngo Thi Xuan Thinh¹, Ha Thanh Hoa¹

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

³College of Pharmacy, Wonkwang University, Iksan 54538, Korea

Received 13 April 2022

Revised 24 May 2022; Accepted 25 May 2022

Abstract: Kirenol (**1**), daurutoside (**2**), and darutigenol (**3**), which are major active diterpenoids isolated from *Herba Siegesbeckiae*, are reported for analgesic activity and inflammatory effects. Currently, in Vietnamese Pharmacopoeia V, there is no requirement for the contents of active ingredients in this medicinal plant. In this study, a high-performance liquid chromatography (HPLC) method, which was developed with good repeatability and recovery, was used for simultaneous quantification of **1**, **2**, and **3** in *Herba Siegesbeckiae*. This method was successfully applied to quantify **1-3** in samples of *Herba Siegesbeckiae* collected from different locations. The results showed that the content of compound **1** accounted for 0 – 5.77 mg/g, compound **2** ranged from 0.82 to 5.48 mg/g, and compound **3** ranged from 0.37 to 3.18 mg/g. These results are considered a reference for upgrading the specification and quality control of *Herba Siegesbeckiae*.

Keywords: *Herba Siegesbeckiae*; kirenol; daurutoside; darutigenol; HPLC.

* Corresponding author.

E-mail address: anhthu23081985@gmail.com

<https://doi.org/10.25073/2588-1132/vnumps.4399>

Định lượng đồng thời Kirenol, darutosid và darutigenol trong dược liệu Hy thiêm (*Siegesbeckia orientalis* L.) bằng HPLC-DPA

Trần Thị Vân Anh^{1,*}, Phạm Quốc Tuấn¹, Nguyễn Văn Khanh²,
Đào Việt Hưng¹, Nguyễn Thanh Hải², Nguyễn Quốc Tuấn^{1,3},
Nguyễn Thị Minh Diệp¹, Ngô Thị Xuân Thịnh¹, Hà Thanh Hòa¹

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

³Khoa Dược, Trường Đại học Wonkwang, Iksan 54538, Hàn Quốc

Nhận ngày 13 tháng 4 năm 2022

Chỉnh sửa ngày 24 tháng 5 năm 2022; Chấp nhận đăng ngày 25 tháng 5 năm 2022

Tóm tắt: Ba hợp chất kirenol (1), darutosid (2) và darutigenol (3) là những diterpenoid chính trong dược liệu hy thiêm, có tác dụng giảm đau, chống viêm. Chuyên luận hy thiêm trong Dược điển Việt Nam V hiện nay chưa có yêu cầu về chỉ tiêu định lượng hoạt chất. Trong nghiên cứu này, đã xây dựng một phương pháp HPLC có độ lặp lại, độ thu hồi tốt cho định lượng đồng thời hợp chất 1, 2 và 3 trong dược liệu hy thiêm. Phương pháp định lượng được áp dụng thành công để xác định hàm lượng của hợp chất 1-3 trong các mẫu hy thiêm thu hái tại các điểm khác nhau. Kết quả cho thấy hàm lượng của hợp chất 1 khoảng từ 0 – 5,77 mg/g, hợp chất 2 dao động từ 0,82 – 5,48 mg/g và hợp chất 3 dao động từ 0,37 – 3,18 mg/g. Những kết quả thu được gợi ý làm cơ sở tham khảo cho việc nâng cấp tiêu chuẩn và kiểm tra chất lượng dược liệu hy thiêm.

Từ khóa: Dược liệu hy thiêm; kirenol; darutosid; darutigenol; HPLC.

1. Mở đầu

Cây hy thiêm có tên khoa học là *Siegesbeckia orientalis* L., thuộc họ Cúc (Asteraceae) [1]. Cây phân bố nhiều ở các nước nhiệt đới và cận nhiệt đới như Trung Quốc, Ấn Độ, Nhật Bản, Australia,... [2]. Ở Việt Nam, hy thiêm mọc hoang ở nhiều tỉnh miền núi phía Bắc, đến các tỉnh miền trung như Thanh Hóa, Nghệ An và các tỉnh Tây Nguyên [1, 3]. Hy thiêm được dùng làm thuốc thường thu hái phần trên mặt đất của cây vào tháng 4 đến tháng 6 lúc cây sắp ra hoa hoặc mới có ít hoa. Trong y học cổ

truyền, hy thiêm được dùng để điều trị phong thấp, nhức xương, yếu chân, bán thân bất toại, gân cốt nhức lạnh, lưng gối tê dại, khớp sưng nóng đỏ và đau nhức, đau lưng, mỏi gối, mụn nhọt lở ngứa, kinh nguyệt không đều [3].

Một số nghiên cứu tác dụng sinh học của dịch chiết hy thiêm cho thấy chúng có nhiều hoạt tính ý nghĩa như chống viêm, chống dị ứng, chống nhiễm khuẩn, và chống oxy hóa [4-7]. Về thành phần hóa học, nhiều công trình nghiên cứu đã công bố chỉ ra trong hy thiêm chứa các nhóm chất chính là sesquiterpenoid, diterpenoid, steroid và phenolic,... [5-8]. Trong đó, kirenol,

* Tác giả liên hệ.

Địa chỉ email: anhthu23081985@gmail.com

<https://doi.org/10.25073/2588-1132/vnumps.4399>

darutosid và darutigenol là những diterpenoid được nghiên cứu nhiều trong những năm gần đây cho thấy có tác dụng giảm đau, chống viêm rất tốt [8-9]. Hơn thế nữa, trong chuyên luận hy thiêm của Dược điển Trung Quốc (DĐTQ, 2015) có chỉ tiêu định lượng hoạt chất kirenol không được thấp hơn 0,05% bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao [10]. Trong khi đó, Dược điển Việt Nam V (ĐĐVN V, 2017) chưa có quy định về chỉ tiêu định lượng hoạt chất chính [11]. Do đó, trong nghiên cứu này tiến hành xây dựng phương pháp định lượng đồng thời kirenol, darutosid và darutigenol trong dược liệu hy thiêm sẽ góp phần làm cơ sở khoa học xây dựng tiêu chuẩn nguyên liệu đầu vào cho các sản phẩm thuốc và thực phẩm bảo vệ sức khỏe chứa hy thiêm.

2. Mục tiêu

Định lượng đồng thời các chất kirenol, darutosid và darutigenol trong dược liệu hy thiêm.

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

3.1. Nguyên liệu, hóa chất, thiết bị

3.1.1. Nguyên liệu

Dược liệu hy thiêm là phần trên mặt đất phơi hoặc sấy khô của cây hy thiêm (*Siegesbeckia orientalis* L.). Mẫu nghiên cứu xây dựng phương pháp là hy thiêm được mua từ tỉnh Hồ Bắc, Trung Quốc (HT-TQ). Các mẫu khảo sát hàm lượng: HT-PT.01 - HT-PT.05 được trồng trọt,

thu hái tại các huyện, thành thị 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.

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

3.1.2. Hóa chất, dung môi

Các dung môi sử dụng cho nghiên cứu gồm acetonitril (MeCN) và methanol (MeOH) được mua của hãng Merck (Đức). Chất đối chiếu kirenol (**1**), darutosid (**2**) do Trung tâm Nghiên cứu và Chuyển giao Công nghệ Dược cung cấp, độ tinh khiết 98% (HPLC). Chất chuẩn darutigenol (**3**) (Lot. CFN97006) mua từ hãng Wuhan ChemFaces Biochemical Co. Ltd., có độ tinh khiết 98% (HPLC).

3.1.3. 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.

3.2. Phương pháp nghiên cứu

Bước sóng khảo sát: Lựa chọn bước sóng 215 nm [11-12].

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.

Bảng 1. Chương trình dung môi rửa giải

Chương trình	Thời gian (phút)			
	0-1	1-10	10-19	19-20
P1	26% A; 74% B	30→35% A; 70 →65% B	35→70% A; 65→30% B	70→26% A; 30→74% B
P2	26% A; 74% B	26→40% A; 74→60% B	40→70% A; 60→30% B	70→26% A; 30→74% B
P3	26% A; 74% B	26→35% A; 74→65% B	35→70% A; 65→30% B	70→26% A; 30→74% B
P4	26% A; 74% B	26→30% A; 74→70% B	30→70% A; 70→30% B	70→26% A; 30→74% B

Pha động tiến hành trên hệ dung môi gồm MeCN (A) và nước (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.

Khảo sát xử lý mẫu: khảo sát hệ dung môi chiết MeOH 100%, MeOH 80% và MeOH 60%, thời gian chiết lần lượt là 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50 phút, với nhiệt độ chiết xuất tại 40, 50 và 60 °C.

Chuẩn bị dung dịch chuẩn: cân và pha chính xác lượng chất chuẩn **1**, **2**, và **3** trong MeOH để được dung dịch có nồng độ chính xác 1000 µg/mL. Từ dung dịch trên pha loãng thành các dãy dung dịch chuẩn có nồng độ từ 2,0 đến 200 µg/mL, 5,0 đến 200 µg/mL, 3,0 đến 200 µg/mL lần lượt đối với chất **1**, **2**, **3**.

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

Thẩm định phương pháp: phương pháp phân tích được đánh giá về độ đặc hiệu, khoảng tuyến tính và đường chuẩn, độ lặp lại, hiệu suất thu hồi, giới hạn phát hiện (LOD) và giới hạn định lượng (LOQ) theo hướng dẫn của ICH [1].

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 (%).

4. Kết quả nghiên cứu

4.1. Khảo sát điều kiện sắc ký

Tiến hành khảo sát tỷ lệ dung môi pha động, tốc độ dòng, nhiệt độ lò cột. Kết quả điều kiện lựa chọn được như sau: bước sóng 215 nm, nhiệt độ cột $25 \pm 0,1$ °C, tốc độ dòng 1,5 mL/phút, thể tích tiêm mẫu 20 µL. Lựa chọn chương trình P4 do độ phân giải (R_s) của chất **1** và **2** là 2,8, lớn nhất so với chương trình còn lại, tất cả các pic cân đối, tách khỏi nhau hoàn toàn và có thời gian lưu (t_R) thích hợp. Như vậy, dung môi pha động là MeCN và nước với chương trình rửa giải gradient từ 0-10 phút, 26-30% MeCN; từ 10-19 phút, 30-70% MeCN; từ 19-20 phút, 70-26% MeCN.

4.2. Kết quả khảo sát xử lý mẫu

Cân chính xác khoảng 1,0 g bột dược liệu, cho vào bình nón có nút mài. Sau đó thêm chính xác 50 mL MeOH 100%, 80% và 60%, cân bình nón, siêu âm 30 phút ở nhiệt độ 50 °C, để nguội, cân lại và bổ sung lượng MeOH có nồng độ tương ứng đã hao hụt. Kết quả thu được với dung môi MeOH 100% cho diện tích pic (S_{pic}) của các chất lớn nhất có ý nghĩa thống kê.

Tiếp tục khảo sát thời gian siêu âm lần lượt là 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50 phút tại nhiệt độ 50 °C. Kết quả thấy rằng, S_{pic} của các chất tăng dần theo thời gian từ 20 đến 30 phút, cao nhất là 30 phút. Từ 30 phút trở đi, S_{pic} của các chất hầu như không thay đổi. Do vậy, thời gian phù hợp cho chiết xuất là 30 phút. Để khảo sát ảnh hưởng của nhiệt độ đến hiệu quả của quá trình chiết xuất, các nhiệt độ được lựa chọn là 40, 50 và 60 °C. Kết quả thu được tại nhiệt độ chiết 50 °C cho S_{pic} là lớn và tối ưu nhất. Như vậy, điều kiện chiết xuất tối ưu nhất được lựa chọn là: dung môi MeOH 100%, nhiệt độ 50 °C, thời gian 30 phút.

Bảng 2. Kết quả khảo sát tính thích hợp hệ thống

Chất phân tích	t_R (phút)		S_{pic} (mAu.s)	
	M ± SD	RSD (%)	M ± SD	RSD (%)
1	7,993 ± 0,036	0,98	690,7 ± 6,8	0,45
2	8,446 ± 0,029	1,21	371,1 ± 4,5	0,35
3	15,867 ± 0,012	0,91	186,2 ± 1,7	0,07

4.3. Thẩm định phương pháp định lượng

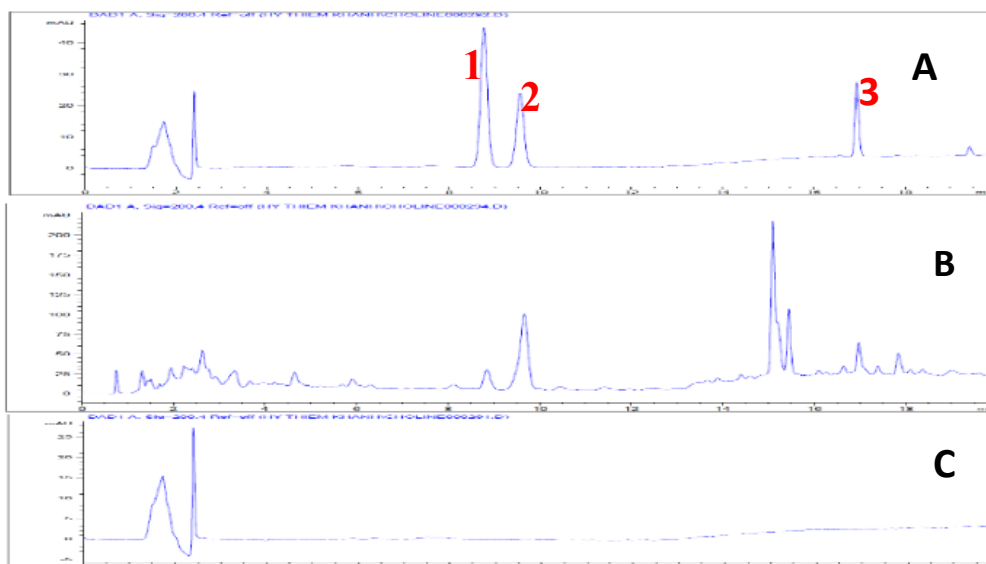
4.3.1. Tính thích hợp của hệ thống

Thực hiện chạy sắc ký dung dịch hỗn hợp các chất **1-3** (nồng độ 100 µg/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 2.

Số liệu kết quả ở Bảng 2 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.

4.3.2. Độ đặc hiệu của phương pháp

Các mẫu hỗn hợp chất đối chiếu **1-3** (nồng độ 100 µg/mL), mẫu dược liệu và mẫu trắng (MeOH) trong cùng điều kiện sắc ký. Trên sắc ký đồ của mẫu trắng không có pic tạp tại thời gian lưu của các chất **1-3** (Hình 1B), đồng thời các pic của các chất **1-3** trên sắc ký đồ của mẫu hỗn hợp chất đối chiếu và mẫu thử có hình dạng tương đồng và t_R trùng nhau (hệ số similarity của cả 3 chất là 0,999 khi chồng phổ UV). Tóm lại, phương pháp đã xây dựng có tính đặc hiệu và chọn lọc cao, thích hợp để định lượng các chất **1-3** có trong hy thiêm.



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

4.3.3. Khoảng tuyến tính, giới hạn phát hiện (LOD), giới hạn định lượng (LOQ)

Chuẩn bị dãy dung dịch chuẩn của chất **1** ở nồng độ từ 2,0 - 200,0 µg/mL; chất **2** ở nồng độ từ 5,0 - 200,0 µg/mL; chất **3** ở nồng độ từ 3,0 - 200,0 µg/mL.

LOD, LOQ của ba chất **1, 2** và **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 3.

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

Chất phân tích	Nồng độ (µg/mL)	Phương trình	Hệ số tương quan (R^2)	LOD (µg/mL)	LOQ (µg/mL)
1	2,0-200,0	$y = 6,9424x + 3,1779$	0,9996	0,36	1,09
2	5,0-200,0	$y = 3,7002x + 2,5183$	0,9993	1,22	3,69
3	3,0-200,0	$y = 1,8507x + 2,3555$	0,9997	0,82	2,48

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 0,9996, 0,9993 và 0,9997. Kết quả xác định LOD của chất **1, 2** và **3** lần lượt là 0,36, 1,22 và 0,82 $\mu\text{g/mL}$; LOQ lần lượt là 1,09, 3,69 và 2,48 $\mu\text{g/mL}$ đối với chất **1, 2** và **3**.

4.4.3. Độ lặp lại và độ chính xác trung gian

Xác định hàm lượng các chất trong mẫu dược liệu thử HT-TQ 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 4.

Kết quả ở Bảng 4 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 dược liệu hy thiêm < 2,0 %, nằm trong khoảng cho phép theo quy định của AOAC [14].

Mặt khác, độ chính xác trung gian được tiến hành như xác định độ lặp lại trong ngày kế tiếp. Kết quả RSD của cả 3 chất < 2,0% và hàm lượng của chúng trong các ngày không khác nhau có ý nghĩa thống kê ($P > 0,05$). Kết quả phân tích đánh giá độ lặp lại trong các ngày tiếp theo cũng cho thấy phương pháp có độ lặp lại tốt và đạt yêu cầu trong phân tích định lượng.

Bảng 4. Kết quả xác định độ lặp lại và độ chính xác trung gian

Số TT	Hàm lượng (mg/g) trong ngày (n=6)			Hàm lượng (mg/g) ngày kế tiếp (n=6)		
	Chất phân tích			Chất phân tích		
	1	2	3	1	2	3
1	0,282	3,276	1,324	0,285	3,251	1,328
2	0,276	3,248	1,321	0,286	3,262	1,331
3	0,286	3,260	1,342	0,283	3,248	1,330
4	0,283	3,216	1,299	0,281	3,327	1,336
5	0,278	3,327	1,330	0,279	3,308	1,335
6	0,284	3,381	1,368	0,282	3,213	1,368
Trung bình (mg/g)	0,282	3,284	1,330	0,283	3,268	1,338
RSD (%)	1,34	1,82	1,73	0,91	1,29	1,12

Bảng 5. Kết quả đánh giá độ đúng của phương pháp

Hợp chất	Hàm lượng thêm vào ($\mu\text{g/mL}$)	Hàm lượng tìm thấy ($\mu\text{g/mL}$)	Độ thu hồi (%)	RSD (%)
1	0	$7,93 \pm 0,02$	-	-
	4,0	$11,74 \pm 0,13$	95,8 - 99,6	1,99
	8,0	$15,94 \pm 0,10$	99,0 - 100,9	0,96
	16,0	$23,94 \pm 0,06$	99,6 - 101,0	0,77
2	0	$90,97 \pm 0,24$	-	-
	45,0	$132,36 \pm 1,11$	94,3 - 96,9	1,47
	90,0	$176,35 \pm 1,09$	93,7 - 96,3	1,36
	180,0	$271,40 \pm 0,86$	99,3 - 101,4	1,13
3	0	$37,56 \pm 0,09$	-	-
	20,0	$55,37 \pm 0,79$	92,7 - 95,7	1,60
	40,0	$76,89 \pm 0,44$	96,7 - 99,4	1,39
	80,0	$117,30 \pm 0,35$	98,4 - 99,8	0,78

4.5.3. 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). Mỗi mẫu thực hiện 3 lần, kết quả được trình bày trong Bảng 5.

Kết quả trên cho thấy hiệu suất thu hồi trung bình đối với kirenol từ 95,8% đến 101,0%, darutosid từ 93,7% đến 101,4%, darutigenol từ 92,7% đến 99,8%, độ lệch chuẩn tương đối của 3 chất từ 0,78 đến 1,99 %. Như vậy, phương

pháp có độ đúng và độ chính xác cao, đạt yêu cầu theo AOAC về hiệu suất thu hồi.

4.4. Định lượng kirenol, darutosid và darutigenol trong dược liệu hy thiêm

Kết quả thẩm định phương pháp cho thấy phương pháp đáng tin cậy cho việc định lượng đồng thời kirenol, darutosid và darutigenol trong hy thiêm. Áp dụng phương pháp định lượng đã xây dựng ở trên để xác định hàm lượng kirenol, darutosid và darutigenol trong các mẫu hy thiêm có nguồn gốc Trung Quốc, thu mua trên địa bàn tỉnh Phú Thọ và một số tỉnh khác. Kết quả phân tích được trình bày trong Bảng 6 (n=3).

Bảng 6. Kết quả định lượng kirenol, darutosid và darutigenol trong dược liệu hy thiêm

Mẫu	Hàm lượng (M±SD, mg/g)		
	(1)	(2)	(3)
HT-TQ	0,27 ± 0,01	3,31 ± 0,19	1,31 ± 0,10
HT-SL	5,77 ± 0,09	2,38 ± 0,17	2,22 ± 0,14
HT-HB	0,02 ± 0,01	4,45 ± 0,13	3,18 ± 0,15
HT-PT.01	-	5,48 ± 0,50	2,46 ± 0,22
HT-PT.02	0,03 ± 0,01	4,98 ± 0,16	1,95 ± 0,07
HT-PT.03	-	5,07 ± 0,23	2,10 ± 0,19
HT-PT.04	0,02 ± 0,0	3,19 ± 0,14	0,39 ± 0,05
HT-PT.05	-	0,82 ± 0,19	0,37 ± 0,09

5. Bàn luận

Phương pháp xây dựng được cho các hợp chất phân tích tách rời khỏi nhau trên sắc ký đồ, thời gian lưu của các hợp chất không quá dài (kirenol $t_R = 7,993$ phút, darutosid $t_R = 8,446$ phút và darutigenol $t_R = 15,867$ phút) nên tiết kiệm được dung môi, thời gian và dễ dàng triển khai thực hiện. Ngoài ra, phương pháp có sự ổn định thông qua đánh giá độ lặp lại, độ thu hồi đều đạt yêu cầu theo hướng dẫn của ICH, AOAC. Hiện nay, trong nước và trên thế giới cũng đã có các công bố về xây dựng phương pháp định lượng đồng thời một số diterpenoid từ hy thiêm bằng HPLC. Tuy nhiên, các công bố chủ yếu đề cập đến định lượng darutosid và 16-O-

acetyldarutosid [15], darutosid và hythimosid A [16]; kirenol và darutigenol [17]. Y. Zhang và cộng sự sử dụng phương pháp chiết pha rắn, sau đó xác định hàm lượng **1-3** bằng HPLC-UV, cột Boltimate C18 (3,0 x 100 mm, 2,7 μ m), bước sóng 215 nm, hệ dung môi MeCN : đệm phosphat 0,01% cho kết quả chính xác, độ đúng cao [12]. Kết quả nghiên cứu này là dữ liệu để chúng tôi tham khảo, xây dựng phương pháp cho phù hợp với điều kiện thực tế tại các cơ sở trong nước. Đây là công trình được công bố đầu tiên tại Việt Nam về phương pháp định lượng đồng thời 3 hợp chất diterpenoid bằng HPLC từ hy thiêm.

Ứng dụng phương pháp đã xây dựng xác định hàm lượng các chất trong hy thiêm chỉ ra rằng, hàm lượng kirenol cao nhất thu hái ở xã Chiềng Ngàn,

thành phố Sơn La, tỉnh Sơn La với $5,77 \pm 0,09$ mg/g và đạt yêu cầu ĐDTQ ($\geq 0,50$ mg/g). Các mẫu thu hái ở Phú Thọ, tỉnh Hòa Bình và mẫu thu mua từ Trung Quốc không đạt yêu cầu theo ĐDTQ, thậm chí một số mẫu kirenol rất thấp hoặc không phát hiện. Hàm lượng darutosid từ $0,82 \pm 0,29$ đến $5,48 \pm 0,50$ mg/g, cao nhất là mẫu HT-PT.01 thu hái tại huyện Hạ Hòa, tỉnh Phú Thọ; cao hơn so với mẫu nghiên cứu khác của Việt Nam do Nguyễn Thị Phương và cộng sự công bố (0,8 -1,4 mg/g) [15] và của Trung Quốc (0,30-0,9 mg/g) [12]; Ấn Độ (1,85 mg/g) [16]. Hàm lượng darutigenol từ $0,37 \pm 0,09$ đến $3,18 \pm 0,15$ mg/g, cao nhất là mẫu HT-HB thu hái tại tỉnh Hòa Bình cao hơn so với các mẫu Trung Quốc: 0,2 - 0,4 mg/g [12]. Từ những công bố tại Việt Nam cho thấy hàm lượng kirenol trong các mẫu hy thiêm trồng trọt tại Việt Nam rất thấp, không ổn định và phù hợp với nghiên cứu của chúng tôi. Mặt khác, darutosid và darutigenol có hàm lượng khá cao, đồng đều, đồng thời sở hữu các hoạt tính sinh học hữu ích vì vậy gợi ý đề xuất bổ sung chỉ tiêu định lượng chuyên luận hy thiêm trong ĐĐVN những lần tái bản sau với hoạt chất là darutosid và/hoặc darutigenol.

6. Kết luận

Nghiên cứu đã xây dựng và thẩm định phương pháp định lượng đồng thời kirenol, darutosid và darutigenol trong dược liệu hy thiêm bằng phương pháp HPLC. Đồng thời, nghiên cứu đã xác định được hàm lượng kirenol, darutosid và darutigenol trong dược liệu hy thiêm có nguồn gốc Trung Quốc, dược liệu hy thiêm thu mua tại các huyện, thành phố trên địa bàn tỉnh Phú Thọ, tỉnh Hòa Bình và tỉnh Sơn La. Phương pháp đã xây dựng có thể áp dụng để định lượng 03 hợp chất kirenol, darutosid và darutigenol 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 Bảo chế và Công nghiệp Dược phẩm, Đại học Y Dược, Trường Đại học Quốc gia Hà Nội đã hỗ trợ thực hiện nghiên cứu này.

Tài liệu tham khảo

- [1] Vietnam Academy of Science and Technology, Flora of Vietnam, Science and Technics Publishing House, Hanoi, Vol. 7, 2007, (in Vietnamese).
- [2] National Institute of Medicinal Materials, Medicinal Plants and Animals in Vietnam, Science and Technics Publishing House, Hanoi, Vol. 1, 2004 (in Vietnamese).
- [3] D. T. Loi, Vietnamese Medicinal Plants and Remedies, Medical Publishing House, Hanoi, 2004 (in Vietnamese).
- [4] X. Gao, Z. Rong, G. Long, G. Hu, T. Yan, N. Li, J. Jia, A. Wang, *ent*-Pimarane Diterpenoids from *Siegesbeckia glabrescens* with Anti-inflammatory Activity, *Bioorganic Chemistry*, Vol. 99, 2020, <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2020.103854>.
- [5] J. M. T. Chu, W. Xiong, K. G. Linghu, Y. Liu, Y. Zhang, G. D. Zhao, M. G. Irwin, G. T. C. Wong, H. Yu., *Siegesbeckia orientalis* L. Extract Attenuates Postoperative Cognitive Dysfunction, Systemic Inflammation, and Neuroinflammation, *Experimental Neurobiology*, Vol. 27, No. 6, 2018, pp. 564-573.
- [6] Q. Wang, Y. Liang, K. Li, Y. Li, F. Niu, S. Zhou, H. Wei, C. Zhou, *Herba Siegesbeckiae*: A review on Its Traditional Uses, Chemical Constituents, Pharmacological Activities and Clinical Studies, *Journal of Ethnopharmacology*, Vol. 275, 2021, pp. 114-117, <https://doi.org/10.1016/j.jep.2021.114117>.
- [7] 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, <https://doi.org/10.1186/s12906-017-1698-z>.
- [8] Y. Li, J. Zhang, G. Tian, H. Shang, H. Tang, Kirenol, Darutoside and Hesperidin Contribute to the Anti-inflammatory and Analgesic Activities of *Siegesbeckia pubescens* Makino by Inhibiting COX-2 Expression and Inflammatory Cell Infiltration, *Journal of Ethnopharmacology*,

- Vol. 268, 2021,
<https://doi.org/10.1016/j.jep.2020.113547>.
- [9] X. Gao, Z. Rong, G. Long, G. Hu, T. Yan, N. Li, J. Jia, A. Wang, Ent-Pimarane Diterpenoids from *Siegesbeckia glabrescens* with Anti-inflammatory Activity, *Bioorganic Chemistry*, Vol. 99, 2020, <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2020.103854>.
- [10] Chinese Pharmacopoeia Commission, Pharmacopoeia of the People's Republic of China, China Medical Science Press, Vol. 1, 2015.
- [11] Vietnam's Ministry of Health, Vietnamese Pharmacopoeia V, Medical Publishing House, Ha Noi, Vol. 2, 2017 (in Vietnamese).
- [12] Y. Zhang, Z. Zou, G. Chou, Fast Simultaneous Detection of three Diterpenoids in *Herba Siegesbeckiae* Using Solid Phase Extraction Followed by HPLC-UV with a Core-shell Particle Column, *Analytical Methods*, Vol. 10, No. 11, 2018, pp. 1325-1330, <https://doi.org/10.1039/C8AY00046H>.
- [13] International Conference on Harmonization, Topic Q2B: Validation of Analytical Procedures: Methodology, ICH Harmonised Tripartite Guideline, 1996.
- [14] AOAC International, Guidelines for Dietary Supplements and Botanicals, AOAC Official, 2013.
- [15] N. T. Phuong, V. V. Tuan, N. D. Quan, P. T. Thuong, L. V. Ninh, L. V. Manh, N. T. M. Anh, Isolation and Simultaneous Quantification of Two Major Diterpenoids from the *Herba Siegesbeckiae* by HPLC, *Journal of Medicinal Materials-Hanoi*, Vol. 22, No. 2, 2017, pp. 77-82 (in Vietnamese).
- [16] P. R. Goud, K. Nagaiah, B. K. Sudhakar, V. U. M. Sarma, N. M. A. Rasheed N.M.A, I. A. Khan, Isolation and Quantification of Bioactive Compounds from *Siegesbeckia orientalis* L. Using HPLC, *Annals of Phytomedicine*, Vol. 3, No. 2, 2014, pp. 66-69.
- [17] D. X. Yan, Y. J. Wang, Q. Duan, X. M. Hang, Simultaneous Determination of Kirenol and Darutigenol in *Herba Siegesbeckiae* by RP-HPLC, *Analytical Methods*, Vol. 45, No. 12, 2010, pp. 945-948.