



Original Article

Development of an HPLC Method for Simultaneous Quantification of Rosmarinic Acid, Sinensetin in *Herba Orthosiphonis spiralis*

Pham Quoc Tuan^{1,*}, Nguyen Thi Minh Diep¹, Tran Thi Van Anh¹,
Ha Thanh Hoa¹, Nguyen Thanh Hai², Nguyen Xuan Truong³, Dao Viet Hung¹,
Ngo Thi Xuan Thinh¹, Nguyen Thi Bich Huong¹, Hoang Thi Thao³

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

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

³East Asia University of Technology, University Village, Vo Cuong, Bac Ninh, Vietnam

Received 10 April 2023

Revised 5 May 2023; Accepted 10 June 2023

Abstract: The purpose of this study was to develop an HPLC method for the simultaneous quantification of rosmarinic acid and sinensetin in *Herba Orthosiphonis spiralis*. The chromatographic separation was performed on an Ascentis®C8 column (250 × 4.6 mm, 5 μm) using a gradient elution mode with acetonitrile and water containing 0.1% formic acid as mobile phase. The flow rate was maintained at 0.6 mL/min. The injection volume was 10 μL. The column temperature was set at 40 °C. Analytes were detected by a PDA detector at a wavelength of 329 nm. The method was validated for specificity, system suitability, linearity, accuracy, precision, detection limit, and quantitation limit according to ICH and AOAC. The results of validation showed that the method met all the acceptance criteria and was suitable for simultaneous quantification of rosmarinic acid and sinensetin in *Herba Orthosiphonis spiralis*.

Keywords: *Herba Orthosiphonis spiralis*; Simultaneous Quantification; Sinensetin; Rosmarinic acid; HPLC.

* Corresponding author.

E-mail address: phamquoctuan@duocphutho.edu.vn

<https://doi.org/10.25073/2588-1132/vnumps.4505>

Xây dựng phương pháp định lượng đồng thời Acid rosmarinic, Sinensetin trong dược liệu Râu mèo (*Herba Orthosiphonis spiralis*) bằng hệ thống Sắc ký lỏng hiệu năng cao

Phạm Quốc Tuấn^{1,*}, Nguyễn Thị Minh Diệp¹, Trần Thị Vân Anh¹, Hà Thanh Hòa¹, Nguyễn Thanh Hải², Nguyễn Xuân Trường³, Đào Việt Hưng¹, Ngô Thị Xuân Thịnh¹, Nguyễn Thị Bích Hương¹, Hoàng Thị Thảo³

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

³Trường Đại học Công nghệ Đông Á, Làng Đại học, Võ Cường, Bắc Ninh, Việt Nam

Nhận ngày 10 tháng 4 năm 2023

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

Tóm tắt: Mục đích của nghiên cứu này là xây dựng một phương pháp định lượng đồng thời acid rosmarinic, sinensetin trong dược liệu râu mèo (*Herba Orthosiphonis spiralis*) bằng sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC). Phương pháp được thực hiện trên cột Ascentis[®]C8 (250 × 4,6 mm, 5 μm), pha động là hỗn hợp acetonitril và acid formic 0,1% trong nước được chạy theo chế độ rửa giải gradient. Tốc độ dòng của pha động duy trì ở 0,6 ml/phút. Thể tích tiêm là 10 μl. Nhiệt độ cột cài đặt ở 40 °C. Các chất phân tích được phát hiện bởi detector PDA ở bước sóng 329 nm. Phương pháp được thẩm định về độ đặc hiệu, tính thích hợp của hệ thống, khoảng tuyến tính, độ đúng, độ lặp lại, giới hạn phát hiện và giới hạn định lượng theo hướng dẫn của ICH, AOAC. Kết quả thẩm định cho thấy phương pháp đạt các yêu cầu và phù hợp để định lượng đồng thời acid rosmarinic và sinensetin trong dược liệu râu mèo.

Từ khóa: Râu mèo; Định lượng đồng thời; Acid rosmarinic; Sinensetin; Sắc ký lỏng hiệu năng cao.

1. Mở đầu

Cây râu mèo còn có tên khác là cây bông bạc, tên khoa học là *Orthosiphon aristatus* (syn.: *O. stamineus*, *O. spicatus*, *O. spiralis*,...), họ Hoa môi (Lamiaceae) [1, 2]. Cây mọc tự nhiên phổ biến tại Ấn Độ, Indonesia, Malaysia, Thái Lan, Lào, Campuchia, Việt Nam và châu Phi [2].

Dược liệu râu mèo (*Herba Orthosiphonis spiralis*) là phần trên mặt đất của cây râu mèo (*Orthosiphon aristatus*). Theo Y học cổ truyền Việt Nam, râu mèo có vị ngọt, nhạt, tính mát, quy

vào các kinh thận, bàng quang; công năng: thanh lợi thấp nhiệt; chủ trị: viêm thận, viêm bàng quang, sỏi thận, sỏi mật, viêm gan [3]. Ngoài ra còn dùng chữa bệnh thấp khớp, gout [2].

Các nghiên cứu về thành phần hóa học chỉ ra rằng râu mèo chứa các nhóm chất chính: flavonoid [4, 5], diterpenoid [6], phenolic [6, 7], tinh dầu [8],... Cao chiết và các chất phân lập được từ râu mèo có nhiều tác dụng sinh học tiềm năng trong phòng và điều trị bệnh như: chống oxy hóa [9], chống viêm [10], độc với tế bào, chống khối u [5], lợi tiểu, hạ huyết áp [11], hạ

* Tác giả liên hệ.

Địa chỉ email: phamquoctuan@duocphutho.edu.vn

<https://doi.org/10.25073/2588-1132/vnumps.4505>

acid uric huyết [12], kháng khuẩn [13],... Các công bố về hóa học cho thấy, trong râu mèo chứa nhiều các methoxylat flavon thân dầu (eupatorin, sinensetin, 3'-hydroxy -5,6,7,4'-tetramethoxyflavon) [14] và phenolic (acid rosmarinic, dẫn xuất của acid caffeic) [7]. Hiện nay, chuyên luận râu mèo trong Dược điển Việt Nam V chưa có chỉ tiêu định lượng các chất chính [3]. Mặt khác, theo tra cứu của chúng tôi ở Việt Nam chưa có nghiên cứu nào đề cập tới định lượng đồng thời acid rosmarinic với các flavon khác. Để có cơ sở khoa học và thực tiễn xây dựng chỉ tiêu về định lượng dược liệu râu mèo, chúng tôi phát triển phương pháp định lượng đồng thời acid rosmarinic, sinensetin trong râu mèo trên hệ thống sắc ký lỏng hiệu năng cao với detector PDA (HPLC-PDA).

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

2.1. Nguyên liệu

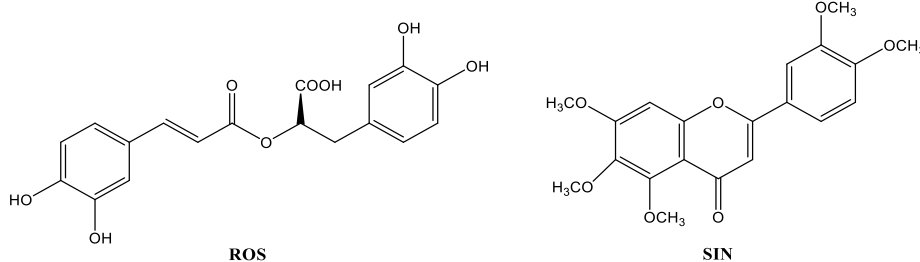
Mẫu nghiên cứu xây dựng phương pháp định lượng là bộ phận trên mặt đất (lá, thân, hoa) của cây râu mèo thu hái tại Vườn Thực vật - Trường Cao đẳng Y Dược Phú Thọ (RM.01.PT/2022); các mẫu râu mèo khảo sát: RM.02.PT/2022 -

RM.06.PT/2022 được thu hái lần lượt tại các huyện: Tân Sơn, Thanh Sơn, Tam Nông, Lâm Thao, Đoan Hùng (tỉnh Phú Thọ); mẫu RM.01.TQ/2022: được thu hái tại huyện Chiêm Hóa (tỉnh Tuyên Quang). Tất cả các mẫu cây thu hái vào tháng 10/2022, gồm các bộ phận lá, thân, hoa và được giám định tên khoa học là *Orthosiphon aristatus* (Blume) Miq. bởi TS. Phạm Thanh Loan, Viện Nghiên cứu Ứng dụng và Phát triển - Trường Đại học Hùng Vương, Phú Thọ.

Các mẫu dược liệu được rửa sạch, phơi khô, nghiền mịn (độ ẩm $\leq 12\%$), bảo quản trong túi PE kín, tránh ánh sáng.

2.2. Hóa chất, dung môi

Các dung môi, hóa chất sử dụng nghiên cứu gồm: acetonitril (MeCN), ethanol (EtOH), methanol (MeOH) được mua của hãng Merck KGaA (Đức), dùng cho HPLC; acid formic ($\geq 88,0\%$) cung cấp bởi Xilong Scientific Co., Ltd. (Trung Quốc); nước cất hai lần (H_2O). Chất chuẩn: acid rosmarinic (**ROS**) (Cat. No. PRF9102642) mua từ hãng Chengdu Biopurity Phytochemicals Ltd. (Trung Quốc), độ tinh khiết 98,0%; sinensetin (**SIN**) (Cat. No: CFN99599) cung cấp bởi hãng ChemFaces (Trung Quốc), có độ tinh khiết 98,5%.



Hình 1. Cấu trúc hóa học của acid rosmarinic (**ROS**) và sinensetin (**SIN**).

2.3. Thiết bị

Hệ thống HPLC: CBM-20A (Shimadzu, Nhật Bản) detector Diode Array SPD-M20A, cột sắc ký Ascentis®C8 (250 × 4,6 mm, 5 μ m); bể chiết siêu âm D-78224 (Đức); cân phân tích AUW220D (Shimadzu, Nhật Bản); tủ sấy chân không LabTech (Hàn Quốc) và các dụng cụ thủy tinh chính xác class A.

2.4. Phương pháp nghiên cứu

2.4.1. Khảo sát bước sóng tối ưu

Xác định quang phổ hấp thụ UV-Vis của **ROS**, **SIN**; lựa chọn bước sóng hấp thụ cực đại (λ_{max}) và bước sóng phân tích tối ưu cho cả hai chất.

2.4.2. *Khảo sát điều kiện sắc ký*

Khảo sát thành phần và tỷ lệ pha động, tốc độ dòng, nhiệt độ lò cột, lựa chọn điều kiện sắc ký phù hợp.

2.4.3. *Khảo sát phương pháp xử lý mẫu*

Cân được liệu, chiết siêu âm với các hệ dung môi là MeOH : H₂O, EtOH : H₂O ở các tỷ lệ 100%, 80%, 60% và 40%; thời gian chiết lần lượt là 2, 3, 4, 5, 6 giờ; nhiệt độ chiết xuất ở 40, 50 và 60 °C. Mỗi thí nghiệm khảo sát thực hiện lặp lại 3 lần.

Tiến hành sắc ký ở điều kiện lựa chọn, từ đó tìm được các thông số chiết xuất tối ưu.

2.4.4. *Chuẩn bị dung dịch*

Chuẩn bị dung dịch chuẩn: cân và pha chính xác lượng chất chuẩn **ROS**, **SIN** trong MeOH 80% để được dung dịch có nồng độ chính xác 1000 µg/ml. Từ dung dịch trên pha loãng thành: dung dịch chuẩn **ROS**, **SIN** có nồng độ 50 µg/ml; dãy dung dịch chuẩn hỗn hợp các chất: **ROS** có nồng độ 5, 10, 50, 100, 200, 250, 300 µg/ml; **SIN** có nồng độ từ 1,5, 3,0, 5,0, 7,5, 10,0, 15,0, 20,0 µg/ml.

Chuẩn bị dung dịch thử: cân chính xác khoảng 1,0 g bột dược liệu (mẫu RM.01.PT/2022) cho vào bình nón có nút mài, thêm 50 ml MeOH 80%, chiết siêu âm 4 giờ ở nhiệt độ 50 °C. Lọc bỏ bã và lọc qua màng lọc 0,45 µm trước khi tiêm vào cột sắc ký.

2.4.5. *Thẩm định phương pháp*

Phương pháp phân tích được thẩm định theo hướng dẫn của ICH, AOAC về tính thích hợp của

hệ thống, độ đặc hiệu, khoảng tuyến tính, độ lặp lại, độ đúng, giới hạn phát hiện (LOD) và giới hạn định lượng (LOQ) [15, 16].

2.4.6. *Tính toán kết quả*

Hàm lượng của chất **ROS**, **SIN** được tính theo được liệu khô kiệt:

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

Trong đó:

- C: nồng độ của **ROS**, **SIN** 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);
- M: hàm ẩm của mẫu thử (%).

2.4.7. *Xử lý số liệu thống kê*

Mỗi mẫu nghiên cứu được làm lặp lại 3 lần. Kết quả được xử lý thống kê bằng phần mềm Microsoft Excel 2019.

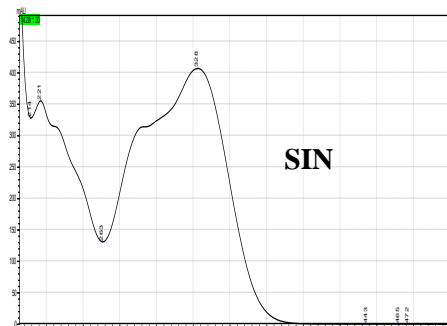
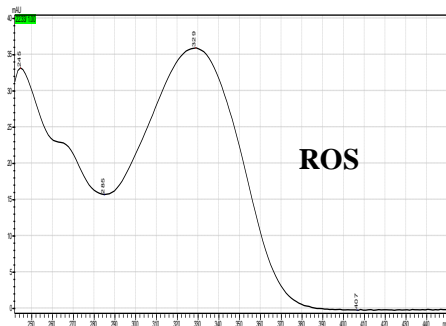
3. **Kết quả nghiên cứu**

3.1. *Lựa chọn điều kiện sắc ký*

3.1.1. *Lựa chọn bước sóng phát hiện*

Tiến hành quét phổ UV của từng dung dịch chất chuẩn riêng biệt ở 200-400 nm. Kết quả thu được ở Hình 2.

Kết quả ở Hình 2 cho thấy **ROS**, **SIN** có cực đại hấp thụ gần như nhau, lần lượt ở 329, 328 nm. Bước sóng 329 nm được lựa chọn để phân tích đồng thời hai chất trên.



Hình 2. Phổ UV của dung dịch chất chuẩn acid rosmarinic (**ROS**) và sinensetin (**SIN**).

3.1.2. Lựa chọn pha động, tốc độ dòng, nhiệt độ cột, thể tích tiêm mẫu

Kết quả khảo sát lựa chọn được hệ dung môi MeCN (A) - acid formic 0,1% trong nước (B) chạy theo chương trình gradient:

- + Từ 0-10 phút: 20→40% A, 80 →60% B;
- 10-30 phút: 40→60% A, 60→40% B;
- + Nhiệt độ cột: 30 °C; tốc độ dòng: 0,6 ml/phút, thể tích tiêm mẫu: 10 µl;
- + Bước sóng phát hiện: 329 nm.

Với điều kiện trên, **ROS** và **SIN** theo thứ tự được tách khỏi các chất khác trong dược liệu, các pic cân đối và gọn, thời gian lưu (t_R) thích hợp (Hình 3A). Như vậy, điều kiện này được lựa chọn để nghiên cứu xây dựng và thẩm định phương pháp định lượng đồng thời **ROS** và **SIN** trong dược liệu râu mèo.

3.2. Kết quả khảo sát xử lý mẫu

3.2.1. Khảo sát ảnh hưởng của dung môi đối với hiệu suất chiết

Cân chính xác khoảng 1,0 g bột dược liệu, cho vào bình nón có nút mài, thêm chính xác 50 ml các dung môi EtOH, MeOH 100%, 80%, 60%, 40%. Cân bình nón và tiến hành chiết siêu âm trong 4 giờ ở nhiệt độ 50 °C. Để dịch chiết nguội, cân lại và bổ sung lượng dung môi tương ứng đã hao hụt. Kết quả thực nghiệm cho thấy với MeOH 80% cho diện tích pic (S_{pic}) của các chất lớn nhất có ý nghĩa thống kê ($p<0,05$). Do đó lựa chọn MeOH 80% để nghiên cứu tiếp.

3.2.2. Khảo sát ảnh hưởng của tỷ lệ dược liệu và dung môi đối với hiệu suất chiết

Cân chính xác lần lượt khoảng 0,5, 0,75, 1,0, 1,25, 1,5 g bột dược liệu, chiết siêu âm với 50 ml MeOH 80% ở 50 °C trong 4 giờ. Kết quả nghiên

cứ cho thấy khối lượng cân giảm từ 1,5 →1,0 g thì S_{pic} (quy về cùng khối lượng cân) của các chất tăng dần. Nếu tiếp tục giảm lượng cân thì S_{pic} cũng không tăng ($P>0,05$). Như vậy, tỷ lệ dược liệu/dung môi: 1/50 là tối ưu nhất và được lựa chọn cho nghiên cứu tiếp theo.

3.2.3. Khảo sát ảnh hưởng thời gian và nhiệt độ đối với hiệu suất chiết xuất

Khảo sát thời gian chiết siêu âm lần lượt là 2, 3, 4, 5, 6 giờ tại nhiệt độ 50 °C. Kết quả S_{pic} của các chất tăng dần theo thời gian từ 2 đến 4 giờ, sau đó hầu như không thay đổi ($p>0,05$). Như vậy, thời gian thích hợp để chiết xuất là 4 giờ.

Tiếp tục khảo sát ảnh hưởng của nhiệt độ đến hiệu suất chiết, lựa chọn các nhiệt độ nghiên cứu là 40, 50 và 60 °C. S_{pic} thu được ở nhiệt độ 50 °C lớn hơn ở 40 °C và tương đương với 60 °C. Do đó lựa chọn nhiệt độ thích hợp nhất cho chiết xuất là ở 50 °C.

Từ những kết quả thực nghiệm ở trên, nhóm nghiên cứu lựa chọn điều kiện chiết xuất tối ưu là: dung môi MeOH 80%, nhiệt độ 50 °C, thời gian 4 giờ, tỷ lệ dược liệu/dung môi là 1/50 (g/ml).

3.3. Thẩm định phương pháp định lượng

3.3.1. Tính thích hợp của hệ thống

Tiêm vào hệ thống sắc ký 6 lần lặp lại dung dịch chuẩn hỗn hợp **ROS** và **SIN** ở nồng độ mỗi chất là 50 µg/ml. Tiến hành chạy sắc ký ở điều kiện đã lựa chọn. Kết quả ghi lại ở Bảng 1.

Từ số liệu ở Bảng 1 cho thấy độ lệch chuẩn tương đối (RSD) của t_R và S_{pic} đối với hai chất < 2%. Như vậy hệ thống phù hợp cho việc xác định hàm lượng hỗn hợp **ROS** và **SIN** có trong dược liệu râu mèo.

Bảng 1. 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 (%)
Acid rosmarinic (ROS)	14,20±0,04	0,27	2330412±18613	0,80
Sensinetin (SIN)	22,42±0,02	0,08	2415457±4663	0,19

3.3.2. Độ đặc hiệu

Tiến hành sắc ký các dung dịch chuẩn **ROS**, **SIN** riêng rẽ, hỗn hợp (nồng độ 50 µg/ml), dung dịch thử và mẫu trắng (MeOH 80%) trong cùng điều kiện sắc ký. Trên sắc ký đồ của mẫu trắng không có pic tạp tại thời gian lưu của các chất chuẩn; độ tinh khiết của các pic đối với dung dịch thử, dung dịch chuẩn $\geq 0,9999$; pic của **ROS**, **SIN** trên sắc ký đồ dung dịch chuẩn riêng rẽ, hỗn hợp và dung dịch thử có hình dạng phổ UV tương đồng và thời gian lưu trùng nhau ($p > 0,05$) (Hình 3).

Như vậy, phương pháp đã xây dựng đáp ứng được yêu cầu về độ đặc hiệu.

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

Chuẩn bị dãy 07 dung dịch chuẩn của hỗn hợp **ROS**, **SIN** như mục 2.4.4. Tiến hành sắc ký, ghi kết quả, tính toán hệ số tương quan (R), xây dựng phương trình hồi quy tuyến tính.

LOD, LOQ của **ROS**, **SIN** được xác định ở nồng độ dựa trên tỷ lệ tín hiệu chất phân tích chia cho nhiễu đường nền (S/N) lần lượt là 3 và 10.

Kết quả thực nghiệm và tính toán thu được ở Bảng 2.

Từ kết quả thực nghiệm cho thấy trong khoảng nồng độ khảo sát có sự tuyến tính giữa diện tích pic và nồng độ của **ROS**, **SIN** ($R > 0,999$).

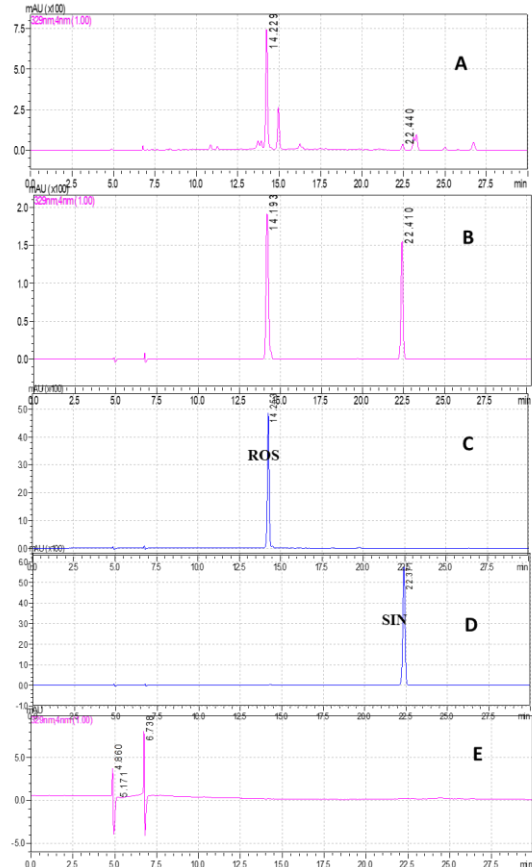
Kết quả xác định LOD lần lượt là 0,6, 0,25 µg/ml; LOQ lần lượt là 2,0, 1,0 µg/ml đối với **ROS** và **SIN**.

3.3.4. Độ lặp lại và độ chính xác trung gian

Độ lặp lại của phương pháp được xác định bởi định lượng 6 lần mẫu được liệu (RM.01.PT/2022) theo quy trình phân tích đã lựa chọn ở trên. Thêm vào đó, độ chính xác trung gian được tiến hành như xác định độ lặp lại

nhưng ở ngày kế tiếp. Kết quả thu được trình bày ở Bảng 3.

Kết quả cho thấy phương pháp định lượng đáp ứng được yêu cầu độ lặp lại và độ chính xác trung gian với RSD của hai chất trong rêu mèo qua các thí nghiệm đều $< 2\%$, phù hợp với hướng dẫn của AOAC [16].



Hình 3. Sắc ký đồ HPLC của dung dịch thử (A), hỗn hợp chất chuẩn (B), acid rosmarinic (C), sinensetin (D), mẫu trắng (E).

Bảng 2. Kết quả khảo sát khoảng tuyến tính, LOD, LOQ của acid rosmarinic và sinensetin

Chất phân tích	Nồng độ (µg/ml)	Phương trình	Hệ số tương quan (R)	LOD (µg/ml)	LOQ (µg/ml)
Acid rosmarinic (ROS)	5,0-300,0	Y = 46575X + 21996	0,9999	0,60	2,0
Sensinetin (SIN)	1,5-20,0	Y = 51638X - 22195	0,9996	0,25	1,0

Bảng 3. Kết quả xác định độ lặp lại và độ chính xác trung gian

Số TT	Phân tích trong ngày					Phân tích khác ngày					
	Khối lượng được liệu (g)	ROS		SIN		Khối lượng được liệu (g)	ROS		SIN		
		Spic (mAU.s)	Hàm lượng (mg/g)	Spic (mAU.s)	Hàm lượng (mg/g)		Spic (mAU.s)	Hàm lượng (mg/g)	Spic (mAU.s)	Hàm lượng (mg/g)	
1	1,014	6062707	6,997	319941	0,357	1,007	5941954	6,905	314678	0,352	
2	1,003	5954231	6,947	331605	0,374	1,011	5850848	6,772	320534	0,362	
3	1,005	5997324	6,983	323927	0,365	1,000	5991375	7,011	322347	0,363	
4	1,001	5783784	6,761	323460	0,366	1,006	5760000	6,699	330496	0,373	
5	1,010	5908592	6,846	329695	0,369	1,013	6102262	7,050	320496	0,359	
6	1,015	6131816	7,070	320414	0,358	1,009	5923880	6,870	329850	0,367	
TBROS: 6,94 mg/g; RSDROS = 1,61%			TBSIN: 0,365 mg/g; RSDSIN = 1,78%			TBROS: 6,88 mg/g; RSDROS = 1,96%			TBSIN: 0,363 mg/g; RSDSIN = 1,96%		
TBROS = 6,909 mg/g, RSD = 1,75% (n=12). TBSIN = 0,364 mg/g, RSD = 1,83% (n=12).											

Bảng 4. Kết quả đánh giá độ đúng của phương pháp

Hợp chất	Hàm lượng thêm vào (µg/ml)	Tổng hàm lượng (µg/ml)	Hàm lượng tìm thấy (µg/ml)	Hiệu suất thu hồi (%)	Trung bình hiệu suất thu hồi (%)
Acid rosmarinic (ROS)	0	60,16	-	-	100,58
	30	90,94	28,95	102,60	
	60	120,36	60,20	100,33	
	90	151,79	91,63	101,81	
Sinensetin (SIN)	0	3,71	-	-	96,44
	1,5	5,22	1,35	96,67	
	3,0	6,58	2,79	93,67	
	9,0	12,68	8,51	99,00	

Bảng 5. Kết quả định lượng acid rosmarinic, sinensetin trong các mẫu râu mèo

Số TT	Mẫu	Khối lượng mẫu (g)	Độ ẩm (%)	Hàm lượng (mg/g)	
				ROS	SIN
1	RM.01.PT/2022 (Việt Trì)	1,008	8,60	6,909±0,121	0,364±0,007
2	RM.02.PT/2022 (Tân Sơn)	1,005	9,40	7,211±0,065	0,427±0,003
3	RM.03.PT/2022 (Thanh Sơn)	1,006	9,00	6,738±0,356	0,415±0,022
4	RM.04.PT/2022 (Tam Nông)	1,006	6,33	7,080±0,027	0,419±0,007
5	RM.05.PT/2022 (Lâm Thao)	1,003	10,06	6,551±0,070	0,416±0,005
6	RM.06.PT/2022 (Đoan Hùng)	1,003	8,46	6,761±0,067	0,412±0,010
7	RM.01.TQ/2022 (Chiêm Hóa, Tuyên Quang)	1,007	8,06	6,869±0,091	0,414±0,022

3.4. Ứng dụng định lượng acid rosmarinic, sinensetin trong các mẫu râu mèo thu hái tại tỉnh Phú Thọ và Tuyên Quang

Các mẫu dược liệu thu hái tại các huyện tỉnh Phú Thọ và Tuyên Quang (Mục 2.1) được phân tích theo quy trình đã thẩm định ở trên. Kết quả phân tích được trình bày trong Bảng 5 (n=3).

5. Bàn luận

Trong râu mèo, **ROS** và **SIN** là một trong những thành phần hóa học chính, chúng có nhiều tác dụng sinh học có ý nghĩa như: chống oxy hóa [7, 9, 17]; chống viêm [10, 18], chống ung thư [18, 19]. Ngoài ra, **SIN** còn có tác dụng lợi tiểu, giãn mạch, chống đái tháo đường, kháng khuẩn [19]. Cùng với các thành phần khác, góp phần chứng minh tác dụng của râu mèo được sử dụng theo Y học cổ truyền.

Hiện nay có một số công trình nghiên cứu xác định hàm lượng các chất trong râu mèo bằng phương pháp HPLC được công bố. Các nghiên cứu đa phần tập trung vào định lượng đồng thời các hợp chất flavonoid và phenolic, trong đó có **ROS** và **SIN**. W. Sumaryono và cs (1990) dùng phương pháp HPLC để định tính, định lượng đồng thời 20 phenolic trong lá và thân cây râu mèo; sử dụng cột pha đảo, pha động: MeCN-H₂O chứa 1% acid phosphoric (hoặc 1% acid acetic rửa giải gradient, sau đó đẳng dòng, bước sóng phát hiện 360 nm. Chiết xuất bằng MeOH 80%, kết quả hàm lượng **ROS** cao nhất: 22,2 $\mu\text{mol/g}$ (~8,0 mg/g), dicaffeoyl tartrat chiếm 7,4 $\mu\text{mol/g}$ (~3,5 mg/g), tiếp đến là euparotin (**EUP**), **SIN** lần lượt 5,5 $\mu\text{mol/g}$ (~ 2,1 mg/g) và 5,3 $\mu\text{mol/g}$ (~2,0 mg/g) [7]. Akowuah G. A. và cs (2004) đã xây dựng phương pháp tách và định lượng đồng thời ba methoxylat flavon: **EUP**, **SIN**, 3'-hydroxy-5,6,7,4'-tetramethoxyflavon (**TMF**) và **ROS** trong lá râu mèo bằng HPLC. Sử dụng hệ dung môi MeOH : H₂O: tetrahydrofuran (40 : 50 : 5), pH=3 (acid phosphoric); bước sóng: 340 nm. Kết quả, hàm lượng các chất dao động rất lớn phụ thuộc vào nơi thu hái, trong đó **ROS** là thành phần chính,

lớn nhất, nồng độ là 5,1-29,9% so với tổng khối lượng lá khô, **EUP**, **SIN**, **TMF** lần lượt trong khoảng 0,34-3,37%, 0,22-1,76% và 0,34%-3,37% [9]. Nhóm nghiên cứu N. H. Saidan và cs (2014) xây dựng và thẩm định phương pháp định lượng đồng thời 4 chất như công trình [9] bằng HPLC-DAD trong cao chiết lá râu mèo với hệ dung môi khác nhau sử dụng phương pháp chiết hồi lưu và soxhlet. Pha động dùng cho sắc ký là acid formic 1%: MeCN rửa giải gradient, tốc độ dòng 1 ml/phút, thể tích tiêm: 5 μl ; bước sóng phát hiện: 320 nm. Kết quả cho thấy hàm lượng các chất xác định được trong lá râu mèo phụ thuộc vào hệ dung môi và phương pháp chiết xuất: hàm lượng **EUP**, **SIN**, **TMF** trong cao lá râu mèo cao nhất với phương pháp soxhlet, dung môi MeOH lần lượt là 5,27 \pm 0,321%, 1,80 \pm 0,003%, 0,28 \pm 0,005%; **ROS** cao nhất với dung môi là MeOH 50% [17].

Ở Việt Nam, nghiên cứu về định lượng các chất trong râu mèo còn hạn chế. Hiện tại có công trình xây dựng và thẩm định phương pháp HPLC định lượng **SIN** trong cao khô sấy phun râu mèo [20], và công trình định lượng một số hợp chất trong râu mèo thu hái tại tỉnh Thái Nguyên nhưng không thẩm định phương pháp và cũng chưa chỉ ra rằng định lượng các chất có đồng thời hay riêng rẽ [21].

Từ những công trình nghiên cứu đã công bố là cơ sở khoa học cho nhóm nghiên cứu chúng tôi tham khảo lựa chọn các marker là **ROS**, **SIN** và xây dựng phương pháp chiết xuất, định lượng đồng thời các chất trong râu mèo bằng HPLC-PDA phù hợp với điều kiện trang thiết bị, dung môi, chất chuẩn sẵn có. Với phương pháp chiết siêu âm, hệ dung môi sử dụng là MeOH 80%, nhiệt độ chiết là 50 °C trong 4 giờ cho hàm lượng các chất cao nhất. Mặt khác, phương pháp định lượng được thẩm định và kết quả phù hợp theo hướng dẫn của ICH, AOAC về độ đặc hiệu, tính thích hợp của hệ thống, khoảng tuyến tính, độ đúng, độ lặp lại, LOD và LOQ. Phương pháp này chính xác, đơn giản, khả thi, dễ dàng áp dụng vào thực tiễn.

Kết quả phân tích 07 mẫu dược liệu thu hái tại Phú Thọ và Tuyên Quang cho thấy hàm lượng

hai chất ở các mẫu không có sự chênh lệch nhiều nằm trong khoảng 6,551-7,211, 0,367-0,419 mg/g lần lượt **ROS** và **SIN**. So với một nghiên cứu mẫu râu mèo thu hái tại Thái Nguyên thì hàm lượng các chất cao hơn và không dao động nhiều (**ROS**: 0,769 - 2,231 mg/g; **SIN**: 0,169-0,141 mg/g) [21]. Tuy nhiên, theo nghiên cứu của W. Sumaryono và cs cho thấy hàm lượng **ROS** (8,0 mg/g), đặc biệt là **SIN** (2,0 mg/g) cao hơn rất nhiều so với nghiên cứu của chúng tôi [7]. Nghiên cứu của chúng tôi cũng chỉ ra tỷ lệ hàm lượng **ROS/SIN** là 17-19, cao hơn nhiều so với các công bố trên thế giới: 4 [7], 2-5 [17]. Điều này có thể do ảnh hưởng khí hậu, thổ nhưỡng, điều kiện canh tác, thời điểm lấy mẫu, thậm chí giống khác nhau. Từ kết quả của công trình này, gợi ý **ROS** có hàm lượng cao, ổn định có thể sử dụng làm marker để xây dựng chỉ tiêu định lượng râu mèo; còn **SIN** cần tiếp tục được khảo sát thêm để có dữ liệu đầy đủ hơn.

6. Kết luận

Công trình này đã xây dựng và thẩm định phương pháp định lượng đồng thời acid rosmarinic và sinensetin trong dược liệu râu mèo bằng phương pháp HPLC-PDA theo các hướng dẫn của ICH, AOAC về độ đặc hiệu, tính thích hợp của hệ thống, khoảng tuyến tính, độ đúng, độ lặp lại, giới hạn phát hiện và giới hạn định lượng. Kết quả thẩm định cho thấy phương pháp đã đáp ứng được các yêu cầu để định lượng đồng thời hai chất trên trong râu mèo. Áp dụng quy trình định lượng vừa xây dựng, phân tích 07 mẫu râu mèo thu hái trên địa bàn tỉnh Phú Thọ và Tuyên Quang cho thấy hàm lượng acid rosmarinic, sinensetin lần lượt nằm trong khoảng 6,551-7,211, 0,367-0,419 mg/g.

Lời cảm ơn

Nghiên cứu này được tài trợ bởi Trường Cao đẳng Y Dược Phú Thọ.

Tài liệu tham khảo

- [1] WFO Plant List, [Online], Available: <https://wfoplantlist.org/plant-list/taxon/wfo-0000261111-2022-12?page=1> (accessed on: February 22nd, 2023).
- [2] National Institute of Medicinal Materials, Medicinal Plants and Animals in Vietnam, Hanoi: Science and Technics Publishing House, Vol. 22, 2004 (in Vietnamese).
- [3] Vietnamese Ministry of Health, Vietnamese Pharmacopoeia V, Hanoi: Medical Publishing House, Vol. 2, 2017 (in Vietnamese).
- [4] K. E. Malterud, I. M. H. Olsen, I. S. Kielland, Flavonoids from *Orthosiphon Spicatus*, *Planta Medica*, Vol. 55, No. 6, 1989, pp. 569-570.
- [5] C. To, D. T. Hoang, M. H. Tran, N. T. Huynh, P. H. Nguyen, PTP1B Inhibitory Flavonoids from *Orthosiphon Stamineus* Benth and Their Growth Inhibition on Human Breast Cancer Cells, *Natural Product Communications*, Vol. 15, No. 1, 2020, pp. 1-9.
- [6] Y. Tezuka, P. Stampoulis, A. H. Banskota, S. Awale, K. Q. Tran, I. Saiki, S. Kadota, Constituents of the Vietnamese Medicinal Plant *Orthosiphon Stamineus*, *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, Vol. 48, No. 11, 2000, pp. 1711-1719.
- [7] W. Sumaryono, P. Proksch, V. Wray, L. Witte, T. Hartmann, Qualitative and Quantitative Analysis of the Phenolic Constituents from *Orthosiphon Aristatus*, *Planta Medica*, Vol. 57, No. 2, 1990, pp. 176-180.
- [8] M. A. Hossain, Z. Ismail, A. Rahman, S. C. Kang, Chemical Composition and Anti-fungal Properties of the Essential Oils and Crude Extracts of *Orthosiphon Stamineus* Benth, *Industrial Crops and Products*, Vol. 27, No. 3, 2008, pp. 328-334.
- [9] G. A. Akowuah, I. Zhari, I. Norhayati, A. Sadikun, S. M. Khamsah, Sinensetin, Eupatorin, 3'-hydroxy-5, 6, 7, 4'-Tetramethoxyflavone and Rosmarinic Acid Contents and Antioxidative Effect of *Orthosiphon Stamineus* from Malaysia, *Food Chemistry*, Vol. 87, No. 4, 2004, pp. 559-566.
- [10] M. Laavola, R. Nieminen, M. F. Yam, A. Sadikun, M. Z. Asmawi, R. Basir, J. Welling, H. Vapaatalo, R. Korhonen, E. Moilanen, Flavonoids Eupatorin and Sinensetin Present in *Orthosiphon Stamineus* Leaves Inhibit Inflammatory Gene Expression and STAT1 Activation, *Planta Medica*, Vol. 78, No. 8, 2012, pp. 779-86.

- [11] O. M. Arafat, S. Y. Tham, A. Sadikun, I. Zhari, P. J. Haughton, M. Z. Asmawi, Studies on Diuretic and Hypouricemic Effects of *Orthosiphon Stamineus* Methanol Extracts in Rats, *Journal of Ethnopharmacology*, Vol. 118, No. 3, 2008, pp. 354-360, 2008.
- [12] W. H. Xu, H. T. Wang, Y. Sun, Z. C. Xue, M. L. Liang, W. K. Su, Antihyperuricemic and Nephroprotective Effects of Extracts from *Orthosiphon Stamineus* in Hyperuricemic Mice, *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, Vol. 72, No. 4, 2020, pp. 551-560.
- [13] A. Romulo, E. A. M. Zuhud, J. Rondevaldova, L. Kokoska, Screening of In Vitro Antimicrobial Activity of Plants Used in Traditional Indonesian Medicine, *Pharmaceutical Biology*, Vol. 56, No. 1, 2018, pp. 287-293.
- [14] M. F. Yam, L. F. Ang, I. M. Salman, O. Z. Ameer, V. Lim, L. M. Ong, M. Ahmad, M. Z. Asmawil, R. Basir, *Orthosiphon Stamineus* Leaf Extract Protects Against Ethanol-Induced Gastropathy in Rats, *Journal of Medicinal Food*, Vol. 12, No. 5, 2009, pp. 1089-1097.
- [15] ICH, Validation of Analytical Procedure: Text and Methodology Q2 (R1), 2005.
- [16] AOAC International, AOAC Official Methods of Analysis, in Guidelines for Standard Method Performance Requirements, Appendix F, 2016, pp. 3.
- [17] N. H. Saidan, A. F. A. Aisha, M. S. R. Hamil, A. M. S. A. Majid, Z. Ismail, A Novel Reverse Phase High-Performance Liquid Chromatography Method for Standardization of *Orthosiphon Stamineus* Leaf Extracts, *Pharmacognosy Research*, Vol. 7, No. 1, 2015.
- [18] S. S. Messeha, N. O. Zarmouh, A. Asiri, K. F. A. Soliman, Rosmarinic Acid-induced Apoptosis and Cell Cycle Arrest in Triple-negative Breast Cancer Cells, *European Journal of Pharmacology*, Vol. 885, 2020, pp. 173419.
- [19] L. H. Jie, I. Jantan, S. D. Yusoff, J. Jali, K. Husain, Sinensetin: An Insight on Its Pharmacological Activities, Mechanisms of Action and Toxicity, *Frontiers in Pharmacology*, Vol. 11, 2020, pp. 553404.
- [20] N. T. T. Thuy, H. T. Q. Dung, N. D. Han, N. M. Duc, Development and Validation of An HPLC Method Sinensetin Analysis from *Orthosiphon Stamineus* Spray-dry Extract, *Medical Journal, University of Medicine and Pharmacy at Ho Chi Minh City*, Vol. 22, No. 5, 2018, pp. 123-128, 2018 (in Vietnamese).
- [21] P. T. Thuy, V. V. Thong, V. P. T. Vy, Quantify Compounds in Rau Meo Herbal (*Orthosiphon Stamineus*), *TNU Journal of Science and Technology*, Vol. 194, No. 1, 2019, pp. 189-193.