

Nghiên cứu định lượng Wedelolacton trong cao khô dược liệu Cỏ nhọ nổi bằng phương pháp HPLC

Nguyễn Minh Túy*, Phan Hiền Lương, Ngô Thanh Hòa

Công ty cổ phần dược Danapha

Ngày nhận bài 7.5.2015, ngày chuyển phản biện 11.5.2015, ngày nhận phản biện 8.6.2015, ngày chấp nhận đăng 12.6.2015

Cỏ nhọ nổi có tên khoa học là *Eclipta alba* Hassk (hoặc *Eclipta prostrata* L.) thuộc họ cúc *Asteraceae*, có tác dụng bổ máu, cầm máu, bổ thận, giải độc gan... Trong đó, Wedelolacton là một dược chất sinh học quan trọng có tác dụng chữa bệnh của Cỏ nhọ nổi. Bài báo trình bày phương pháp nghiên cứu định lượng Wedelolacton trong cao khô dược liệu Cỏ nhọ nổi bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) với các điều kiện sắc ký: cột Acclaim 120 A°, C18 (100x4,6 mm, 3 μ m); bước sóng phát hiện: 350 nm; tốc độ dòng: 1,0 ml/phút; thể tích tiêm: 20 μ l; pha động: Acetonitril - nước cất (ACN-H₂O) (23:77). Kết quả nghiên cứu cho thấy, phương pháp này đáp ứng các tiêu chí về: tính thích hợp, tính đặc hiệu, khoảng nồng độ tuyến tính, độ đúng, độ lặp lại và độ chính xác trung gian, giới hạn định lượng, giới hạn phát hiện. Do đó, có thể áp dụng để định lượng Wedelolacton trong cao khô Cỏ nhọ nổi, góp phần kiểm soát và nâng cấp tiêu chuẩn chất lượng nguồn nguyên liệu sản xuất thuốc.

Từ khóa: Cỏ nhọ nổi, sắc ký lỏng hiệu năng cao, Wedelolacton.

Chỉ số phân loại 3.4

QUANTITATIVE RESEARCH OF WEDELOLACTON IN DRIED ECLIPTA PROSTRATA L. BY HPLC

Summary

This article presents a quantitative research of Wedelolacton in dried *Eclipta prostrata* L. by high performance liquid chromatography (HPLC). The method has been carried out by using a column C18 (100x4.6 mm, 3 μ m) with the flow rate of mobile phase which is maintained at 1.0 ml per minute, the injection volume: 20 μ l, and a mixture of acetonitrile and distilled water with the ratio 23:77 as mobile phase. A detector has been set up at 350 nm for Wedelolacton. The method has been validated in specificity, linear range, accuracy, precision.

Keywords: *Eclipta prostrata* L., high performance liquid chromatography, Wedelolacton.

Classification number 3.4

Đặt vấn đề

Cỏ nhọ nổi có tên khoa học là *Eclipta prostrata* L. hoặc *Eclipta alba* (L.) Hassk, từ lâu đã được sử dụng trong dân gian làm thuốc bổ máu, cầm máu bên trong và bên ngoài, chữa ho ra máu, có tác dụng bổ thận, giải độc gan, làm khô xương cốt [1, 2]... Một trong những thành phần hoạt tính sinh học quan trọng có tác dụng chữa bệnh của Cỏ nhọ nổi chính là Wedelolacton [3, 4]. Chất chuẩn Wedelolacton cũng đã được Viện Công nghệ Hóa học TP Hồ Chí Minh phân lập và cung cấp cho các đơn vị sử dụng.

Hiện nay, Công ty cổ phần dược Danapha đang sử dụng Cỏ nhọ nổi trong sản phẩm VG5 - một trong 3 sản phẩm tiêu biểu của Công ty, là kết quả của Dự án thuộc Chương trình khoa học và công nghệ trọng điểm cấp nhà nước giai đoạn 2011-2015 (KC10/11-15). Sản phẩm này có tác dụng hạ men gan, tăng cường chức năng gan, phục hồi tế bào gan và hỗ trợ điều trị viêm gan cấp và mạn tính.

Để góp phần đảm bảo chất lượng và hiệu quả trị liệu cho sản phẩm VG5, chúng tôi tiến hành “Nghiên cứu định lượng Wedelolacton trong cao khô dược

*Tác giả chính: Email: quangtri@danapha.com

liệu Cỏ nhọ nổi bằng phương pháp HPLC” làm cơ sở để nâng cấp tiêu chuẩn chất lượng cao Cỏ nhọ nổi, góp phần kiểm soát tốt chất lượng nguồn nguyên liệu đưa vào sản xuất sản phẩm VG5.

Thực nghiệm

Thiết bị, dụng cụ, hóa chất, chất chuẩn

Thiết bị, dụng cụ: các thiết bị được hiệu chuẩn đạt yêu cầu của phòng thí nghiệm đạt tiêu chuẩn GLP; hệ thống sắc ký lỏng hiệu năng cao Dionex Ultimax RSLC 3000 trang bị detector DAD; hệ thống HPLC Merck Hitachi D7000; cân phân tích ADN có độ chính xác 0,01 mg, các bình định mức và pipet...

Hóa chất, chất chuẩn: chất chuẩn đối chiếu Wedelolacton hàm lượng 98,0% do Viện Công nghệ Hóa học TP Hồ Chí Minh cung cấp; Acetonitrin loại dùng cho HPLC; Ethanol 70%, nước cất...

Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

Đối tượng nghiên cứu: mẫu cao khô Cỏ nhọ nổi được sản xuất bởi Công ty cổ phần dược Danapha.

Phương pháp nghiên cứu:

Điều kiện sắc ký: cột Acclaim 120 A°, C18 (100x4,6 mm, 3 µm); bước sóng phát hiện: 350 nm; tốc độ dòng: 1,0 ml/phút; thể tích tiêm: 20 µl; pha động: Acetonitrin - nước cất (ACN-H₂O) (23:77).

Phương pháp xử lý mẫu:

- Dung dịch chuẩn: pha dung dịch chuẩn Wedelolacton trong Ethanol 70% để có nồng độ 10 µg/ml, sau đó lọc qua màng lọc 0,45 µm thu được dung dịch chuẩn.

- Dung dịch thử: cân chính xác khoảng 300 mg cao khô Cỏ nhọ nổi, cho vào bình định mức 50 ml, thêm Ethanol 70% đến vạch, lắc siêu âm trong 45 phút cho tan hoàn toàn. Để nguội đến nhiệt độ phòng, lọc qua màng lọc 0,45 µm thu được dung dịch thử.

- Mẫu trắng: dung dịch Ethanol 70%, lọc qua màng lọc 0,45 µm.

Thẩm định quy trình phân tích với các tiêu chí: tính thích hợp, tính đặc hiệu, khoảng nồng độ tuyến tính, độ đúng, độ lặp lại và độ chính xác trung gian, giới hạn định lượng, giới hạn phát hiện.

Ứng dụng của phương pháp:

- Định tính: dựa vào 2 tiêu chí: 1. Thời gian lưu: so

sánh thời gian lưu của pic thu được từ dung dịch thử và dung dịch chuẩn Wedelolacton; 2. Phổ UV-Vis: so sánh phổ UV-Vis của pic trên sắc ký đồ thu được từ dung dịch thử và dung dịch chuẩn 2 phổ phải tương ứng với nhau.

- Định lượng: dựa trên diện tích pic thu được từ dung dịch thử và dung dịch chuẩn, tính hàm lượng Wedelolacton có trong cao khô được liệu Cỏ nhọ nổi.

Kết quả và bàn luận

Kết quả

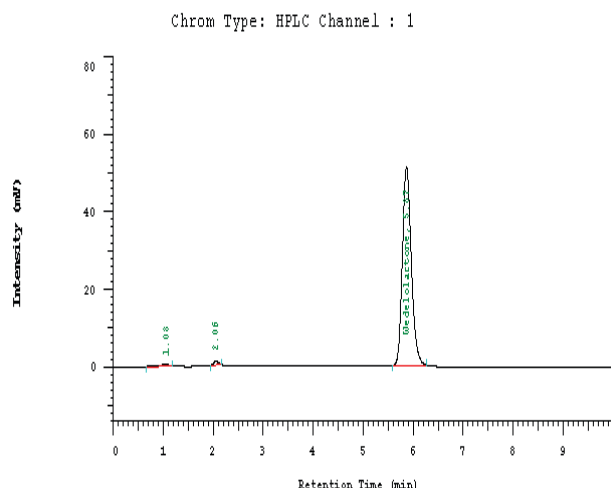
Tính thích hợp của hệ thống: tiến hành tiêm lặp lại 6 lần dung dịch mẫu chuẩn Wedelolacton có nồng độ 10 µg/ml vào hệ thống sắc ký. Kết quả thể hiện ở bảng 1.

Bảng 1: tính thích hợp của hệ thống sắc ký

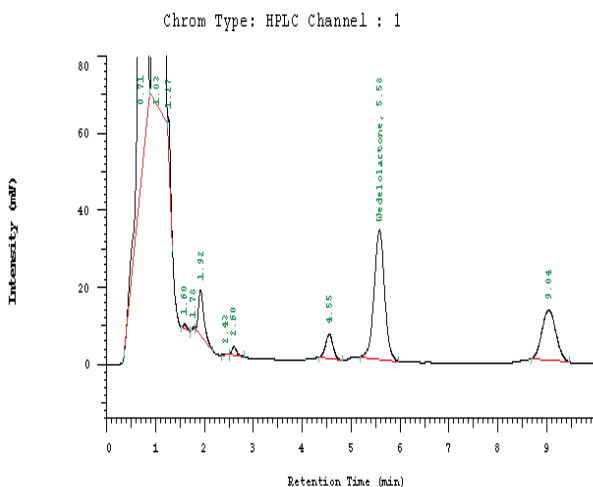
STT	Diện tích pic	Thời gian lưu
1	438790	5,87
2	437131	5,85
3	433983	5,84
4	433355	5,85
5	431009	5,86
6	421781	5,85
Trung bình (TB)	432675	5,85
Độ lệch chuẩn tương đối (RSD)	1,39%	0,18%
Số đĩa lý thuyết (N)	5363	
Hệ số đối xứng (T)	1,2	

Như vậy, hệ thống sắc ký có độ lặp lại tốt với RSD của thời gian lưu là $0,18 < 1\%$ và diện tích là $1,39 < 2\%$, hệ số đối xứng: 1,2 đáp ứng yêu cầu định lượng Wedelolacton.

Tính đặc hiệu: tiến hành tiêm các mẫu trắng, mẫu chuẩn và mẫu thử vào hệ thống sắc ký theo điều kiện đã nêu trên. Kết quả phân tích cho thấy, trên sắc ký đồ, mẫu trắng không xuất hiện pic có thời gian lưu tương ứng với thời gian lưu của Wedelolacton. Dung dịch thử cho pic chính có thời gian lưu tương ứng với thời gian lưu của pic Wedelolacton thu được từ sắc ký đồ của dung dịch chuẩn. Phổ UV-Vis của dung dịch thử tương ứng với phổ của dung dịch chuẩn và có 1 cực đại hấp thu ở bước sóng 351 ± 1 nm.



Hình 1: sắc ký đồ mẫu chuẩn Wedololactone

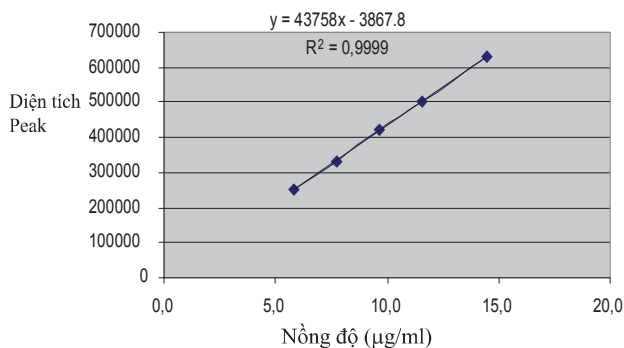


Hình 2: sắc ký đồ mẫu cao khô Cỏ nhọ nổi

Tính tuyến tính: pha một dãy các dung dịch chuẩn trong Ethanol 70% có nồng độ Wedololactone từ 6,0 đến 15,0 µg/ml. Tiến hành sắc ký các dung dịch theo các điều kiện đã nêu. Kết quả thể hiện ở bảng 2 và hình 3.

Bảng 2: kết quả khảo sát tính tuyến tính

Dung dịch	1	2	3	4	5
Nồng độ (µg/ml)	5,8	7,7	9,7	11,6	14,5
Diện tích pic	248966	333196	421357	502086	629269
Phương trình hồi quy: $y = 43758x - 3867,8$ Hệ số tương quan: $r = 0,9999$					



Hình 3: đồ thị khảo sát sự tương quan tuyến tính giữa nồng độ và diện tích pic Wedololactone

Kết quả cho thấy, trong khoảng nồng độ khảo sát từ 6,0 đến 15,0 µg/ml có sự phụ thuộc tuyến tính giữa nồng độ Wedololactone với diện tích pic với hệ số tương quan $r \approx 1,000$. Khoảng xác định 80-120% của nồng độ định lượng, tương ứng nồng độ trong dung dịch thử là 8,0 đến 12,0 µg/ml Wedololactone: nằm trong khoảng tuyến tính.

Độ lặp lại và độ chính xác trung gian: độ lặp lại của phương pháp được xác định trên 6 mẫu thử khác nhau. Kết quả thu được ở bảng 3 và 4.

Bảng 3: độ lặp lại của phương pháp với hoạt chất Wedololactone - Kiểm nghiệm viên 1

Mẫu	Thử 1	Thử 2	Thử 3	Thử 4	Thử 5	Thử 6
Khối lượng cân (g)	0,29715	0,30128	0,30083	0,30000	0,30279	0,30273
Diện tích pic	477486	498759	505415	497747	502212	488071
Hàm lượng (%)	0,1792	0,1847	0,1874	0,1851	0,1850	0,1798
Số liệu thống kê	Hàm lượng TB = 0,1835%; n = 6; RSD = 1,77%					

Kết quả cho thấy, phương pháp có độ lặp lại tốt, RSD = 1,77% (< 2,0%), đáp ứng yêu cầu định lượng.

Bảng 4: độ lặp lại của phương pháp với hoạt chất Wedololactone - Kiểm nghiệm viên 2

Mẫu	Thử 1	Thử 2	Thử 3	Thử 4	Thử 5	Thử 6
Khối lượng cân (g)	0,29715	0,30128	0,30083	0,30000	0,30279	0,30273
Diện tích pic	67130	68191	68245	66162	67805	65453
Hàm lượng (%)	0,1938	0,1942	0,1946	0,1892	0,1921	0,1855
Số liệu thống kê	TB = 0,192%; n = 6; RSD = 1,87%					

Kết quả cho thấy, phương pháp có độ lặp lại tốt, RSD = 1,87% (< 2,0%), đáp ứng yêu cầu định lượng.

Độ chính xác trung gian: tiến hành như phần độ lặp lại nhưng tiến hành trên hệ thống thiết bị khác, ngày làm khác và người làm khác. So sánh kết quả giữa 2 lần thí nghiệm. Kết quả được nêu ở bảng 5.

Bảng 5: độ chính xác trung gian

Mẫu	Hàm lượng Wedelolacton (%)	
	Kiểm nghiệm viên 1	Kiểm nghiệm viên 2
1	0,1792	0,1938
2	0,1847	0,1942
3	0,1874	0,1946
4	0,1851	0,1892
5	0,1850	0,1921
6	0,1798	0,1855
Trung bình	0,1835	0,1916
RSD (n = 6)	1,77%	1,87%
TB (KNV 1+2)	0,1876	
RSD (n = 12)	0,82%	

Kết quả cho thấy, RSD (n = 6) < 2,0% và RSD (n = 12) < 3,0% xác nhận độ chính xác của phương pháp đáp ứng yêu cầu.

Khảo sát độ đúng của phương pháp: sử dụng phương pháp thêm chuẩn vào mẫu thử, chuẩn bị các mẫu giả định có nồng độ khoảng 80, 100, 120% so với lượng lý thuyết của Wedelolacton cần định lượng (10 µg/ml). Mỗi mức có 3 thí nghiệm, tiến hành phân tích theo phương pháp đã nêu trên. Kết quả được trình bày ở bảng 6.

Bảng 6: độ đúng của phương pháp

Mẫu	Thể tích dung dịch A (ml)	Diện tích pic	Lượng tìm thấy thêm vào thu được (mg)	Lượng thêm vào (mg)	Tỷ lệ phục hồi (%)	Tỷ lệ phục hồi TB (%)
Thử 80%	3	337101	0,0586	0,0579	101,2	100,3
Thử 80%	3	336778	0,0585	0,0579	100,9	
Thử 80%	3	334024	0,0572	0,0579	98,8	
Thử 100%	5	425346	0,0980	0,0965	101,5	99,3
Thử 100%	5	418419	0,0949	0,0965	98,3	
Thử 100%	5	417929	0,0947	0,0965	98,1	
Thử 120%	7	508428	0,1351	0,1351	99,9	99,6
Thử 120%	7	502483	0,1324	0,1351	98,0	
Thử 120%	7	510965	0,1362	0,1351	100,8	

Kết quả cho thấy, hoạt chất Wedelolacton có khả năng thu hồi từ 98,0 đến 101,5%, nằm trong giới hạn cho phép trong thẩm định độ đúng của phương pháp (98-102%).

Xác định giới hạn phát hiện: giới hạn phát hiện là nồng độ nhỏ nhất mà thiết bị có thể phát hiện được.

Từ phương trình hồi quy khi khảo sát tính tuyến tính: $y = 43758x - 3867,8$ với $S = 2809,2$ suy ra giới hạn phát hiện (LOD) là: $3,3$. $S/a = 3,3$. $2809,2/43758 = 0,2$ (ppm).

Kết quả: giới hạn phát hiện Wedelolacton là 0,2 ppm.

Giới hạn định lượng: từ phương trình hồi quy khi khảo sát tính tuyến tính: $y = 43758x - 3867,8$ với $S = 2809,2$ suy ra giới hạn định lượng (LOQ) là: 10 . $S/a = 10$. $2809,2/43758 = 0,6$ (ppm).

Kết quả: giới hạn định lượng Wedelolacton là 0,6 ppm.

Kết luận

Kết quả khảo sát cho thấy, phương pháp nghiên cứu định lượng Wedelolacton trong cao khô dược liệu Cỏ nhọ nổi bằng HPLC đã đáp ứng các tiêu chí về: tính thích hợp, tính đặc hiệu, khoảng nồng độ tuyến tính, độ đúng, độ lặp lại và độ chính xác trung gian, giới hạn định lượng, giới hạn phát hiện. Do đó, có thể áp dụng phương pháp này để định lượng Wedelolacton trong cao khô Cỏ nhọ nổi.

Tài liệu tham khảo

- [1] Bộ Y tế (2009), *Dược điển Việt Nam IV*, NXB Y học.
- [2] Đỗ Tất Lợi (2009), *Cây thuốc và vị thuốc Việt Nam*, NXB Y học.
- [3] Viện Dược liệu (2006), *Cây thuốc và động vật làm thuốc ở Việt Nam*, NXB Khoa học và Kỹ thuật, tập 2.
- [4] Murali B, Amit A, Anand M.S, Samiulla D.S (2002), "Estimation of Wedelolactone and demethylWedelolactone in Eclipta alba Hassk by improved chromatographic analysis", *Journal of Natural Remedie*, **2**(1), pp.99-101.