

Định lượng đồng thời hederacosid C và α -hederin trong cao khô Thường xuân (*Hedera helix* L.) bằng phương pháp HPLC-DAD

Trần Mộng Kha¹, Ngô Thị Mỹ Duyên¹, Lê Thị Minh Thu², Vũ Huỳnh Kim Long^{1*}

¹Khoa Dược, Trường Đại học Tôn Đức Thắng, Thành phố Hồ Chí Minh, Việt Nam

²Trường Dược, Đại học Y Dược Thành phố Hồ Chí Minh, Thành phố Hồ Chí Minh, Việt Nam

TÓM TẮT

Đặt vấn đề: Cây Thường xuân (*Hedera helix* L. - TX) là dược liệu được sử dụng từ lâu trong y học cổ truyền để điều trị các bệnh đường hô hấp. Tuy nhiên, hiện nay vẫn chưa có phương pháp phù hợp để đánh giá chất lượng cao chiết TX, gây khó khăn cho công tác kiểm soát chất lượng nguyên liệu. **Mục tiêu nghiên cứu:** Xây dựng và thẩm định quy trình định lượng đồng thời hederacosid C và α -hederin trong cao khô TX bằng phương pháp HPLC-DAD. **Phương pháp nghiên cứu:** Tối ưu hóa điều kiện sắc ký và quy trình chuẩn bị mẫu thử, thẩm định quy trình định lượng. **Kết quả:** Đã xây dựng phương pháp HPLC-DAD nhanh chóng, đơn giản và hiệu quả để định lượng đồng thời hederacosid C và α -hederin cao khô TX. Phương pháp thể hiện tính đặc hiệu cao, tuyến tính tốt ($r \geq 0.999$), giới hạn phát hiện thấp (0.015 mg/mL đối với hederacosid C và 0.010 mg/mL đối với α -hederin, đạt độ chính xác ($RSD \leq 2.00\%$) và độ đúng (98.27% - 100.04%, $RSD \leq 1.98\%$). Hàm lượng hederacosid C và α -hederin trong cao khô TX lần lượt là 17.26% và 9.63%. **Kết luận:** Phương pháp đã xây dựng và thẩm định phù hợp cho việc xác định đồng thời hederacosid C và α -hederin trong cao khô TX và có thể ứng dụng cho kiểm nghiệm chất lượng các chế phẩm chứa TX.

Từ khóa: cao chiết, Thường xuân, *Hedera helix* L., hederacosid C, α -hederin, HPLC-DAD

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Thường xuân (*Hedera helix* L. - TX) là loài thực vật thuộc họ Araliaceae và là một cây thuốc có nguồn gốc từ châu Âu, Bắc Mỹ và Tây Á. TX đã được chứng minh có nhiều tác dụng dược lý trong điều trị các bệnh về đường hô hấp [1], đái tháo đường [2], viêm khớp [3], bảo vệ gan [4] và các bệnh hô hấp cấp và mạn tính. Ngoài ra, các nghiên cứu cũng xác nhận các hoạt tính chống co thắt, kháng khuẩn, kháng nấm, chống oxy hóa, chống khối u và chống viêm của dịch chiết lá TX. Các saponin triterpene là nhóm hợp chất có hoạt tính sinh học chính, mang đến các tác dụng dược lý của TX. Trong đó, hederacosid C và α -hederin là các hợp chất saponin triterpene quan trọng, có hoạt tính trên thụ thể β_2 -adrenergic và đóng vai trò chủ yếu trong các tác dụng sinh học của lá TX. Thực tế, α -hederin đã được báo cáo có khả năng ức chế sự phát triển của tế bào ung thư đại tràng, ung thư phổi [5], ung thư vú [6], đồng thời thể hiện hoạt

tính chống oxy hóa [7, 8], chống viêm [8], và tác dụng kháng *Candida albicans* - một loại nấm gây nhiễm trùng miệng và sinh dục ở người [8]. Hederacosid C cho thấy hiệu quả trong điều trị các bệnh hô hấp như nhiễm trùng đường hô hấp, viêm phế quản và ho [9]. Ngoài ra, một số nghiên cứu cũng chỉ ra rằng hederacosid C có hoạt tính chống viêm trên mô hình chuột và có hiệu quả đối với một số chủng vi khuẩn như *Bacillus* spp., *Staphylococcus* spp., *Salmonella* spp. và *Escherichia coli* [10].

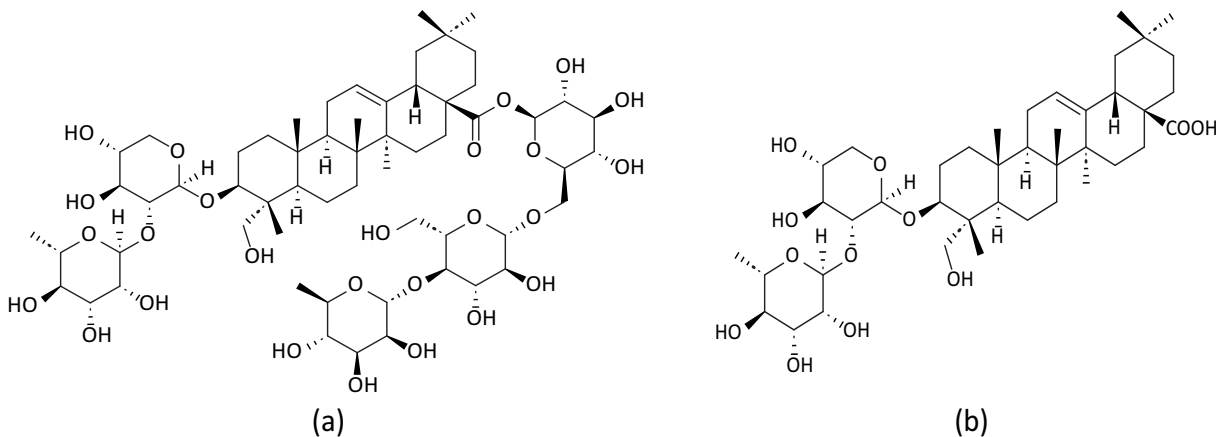
Dựa trên các nghiên cứu đã công bố, có thể thấy được TX có rất nhiều tác dụng dược lý nổi trội, có tiềm năng để phát triển thêm nhiều loại sản phẩm có công dụng hữu ích. Cao chiết từ TX được sử dụng rộng rãi làm nguyên liệu trong sản xuất các chế phẩm từ *H. helix*, như siro và viên ngậm, nhằm điều trị ho. Dược liệu khô lá TX đã được mô tả trong Dược điển châu Âu 11.0 và Dược điển Anh 2022,

Tác giả liên hệ: Vũ Huỳnh Kim Long

Email: vuhuyhkimlong@tdtu.edu.vn

trong đó hederacosid C được quy định là chất đánh dấu trong định lượng. Tuy nhiên, Dược điển Việt Nam V chưa có chuyên luận dành cho TX, kể cả cao khô. Điều này dẫn đến việc thiếu các tiêu chuẩn kỹ thuật cần thiết cho việc tiêu chuẩn hóa và kiểm

soát chất lượng nguyên liệu và các chế phẩm. Vì vậy, nghiên cứu này được thực hiện với mục tiêu xây dựng và thẩm định phương pháp HPLC-DAD để định lượng đồng thời hederacosid C và α -hederin trong cao khô TX.



Hình 1. Cấu trúc hóa học của (a) hederacoside C và (b) α -hederin

2. PHƯƠNG PHÁP VÀ VẬT LIỆU NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu

Lá TX được thu hái vào tháng 3 năm 2023 tại xã An Toàn, huyện An Lão, tỉnh Bình Định. Mẫu nghiên cứu được định danh bởi Công ty TNHH MTV Sinh hóa Phù Sa với tên khoa học *Hedera helix* L., thuộc họ Araliaceae. Lá TX được sấy khô ở 50°C, nghiền thành bột và rây qua rây 0.5 mm.

Các chất chuẩn được sử dụng gồm hederacosid C và α -hederin, có độ tinh khiết lần lượt là 94.72% và 98.52%, được cung cấp bởi Chromadex (Mỹ). Các hóa chất được sử dụng trong nghiên cứu gồm có: Acetonitrile và methanol đạt cấp độ HPLC (J.T. Baker, Mỹ), acid formic (Merck, Đức), ethanol 96% (Công ty Khả Doanh, Việt Nam) và nước cất hai lần lọc qua màng lọc 0.45 μ m. Phân tích HPLC được thực hiện trên hệ thống Agilent Technologies 1260 Infinity II (Hoa Kỳ) ghép nối với đầu dò DAD. Quá trình phân tách được tiến hành trên cột Phenomenex Luna C18 (150 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m).

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Quy trình chiết xuất lá TX

1.5 kg bột lá được chiết bằng phương pháp hồi lưu đun nóng ở 70 $\pm$ 5°C với dung môi chiết xuất là ethanol 74%, tỷ lệ dung môi (mL)/ dược liệu (g) là 16:1. Quá trình chiết được tiến hành 3 lần, mỗi lần 2 giờ. Các dịch chiết thu được được gộp lại, sau đó cô dưới áp suất giảm để thu cao đặc. Cao đặc tiếp

tục được sấy trong tủ sấy chân không ở nhiệt độ 40°C nhằm thu được cao khô TX.

2.2.2. Khảo sát điều kiện sắc ký

Quy trình định lượng hederacosid C và α -hederin được thực hiện bằng kỹ thuật HPLC-DAD pha đảo. Pha động được bơm với tốc độ dòng 1.0 mL/phút, thể tích tiêm 20 μ L. Quá trình phân tách được tiến hành trên cột C18 (150 $\times$ 4.6 mm i.d., 5 μ m). Bước sóng phát hiện dùng để định lượng đồng thời hai hoạt chất được lựa chọn dựa trên kết quả quét phổ hấp thụ UV của hederacosid C và α -hederin. Chương trình rửa giải gradient của pha động được tối ưu nhằm đảm bảo tách hoàn toàn các pic của hederacosid C và α -hederin khỏi các pic khác trên sắc ký đồ. Pha động gồm acetonitrile (dung môi A) và nước (dung môi B), có bổ sung 0.1% acid formic. Hai chương trình rửa giải gradient được khảo sát như sau: (1): 0 phút, 20% A và 80% B; 14 phút, 43% A và 57% B; 20 phút, 67% A và 33% B; 24 - 34 phút, 95% A và 5% B; 35 - 40 phút, 20% A và 80% B. (2): 0 phút, 20% A và 80% B; 14 phút, 39% A và 61% B; 20 - 25 phút, 65% A và 35% B; 26 phút, 70% A và 30% B; 27 - 37 phút, 90% A và 10% B; 38 - 45 phút, 20% A và 80% B.

2.2.3. Dung dịch chuẩn gốc và dung dịch chuẩn

Dung dịch chuẩn gốc: Cân chính xác 3.0 mg chất đối chiếu hederacosid C và 2.0 mg chất đối chiếu α -hederin, cho vào bình định mức 2 mL, thêm

khoảng 1.5 mL methanol 80%, lắc nhẹ. Siêu âm 15 phút ở nhiệt độ phòng, để nguội, thêm tiếp methanol 80% đến vạch, lắc đều, thu được dung dịch đối chiếu gốc. Dung dịch chuẩn: Pha loãng dung dịch chuẩn gốc với methanol 80% để thu được dãy dung dịch chuẩn hederacosid C (0.174 - 1.475 mg/mL) và α -hederin (0.118 - 1.000 mg/mL). Tất cả các dung dịch đều được lọc qua màng lọc 0.45 μ m trước khi phân tích.

2.2.4. Khảo sát quy trình chuẩn bị dung dịch thử

Cân chính xác 35.0 mg cao khô TX, cho vào bình định mức 10 mL và chiết siêu âm trong dung môi thích hợp trong 15 phút. Tiến hành khảo sát dung môi chiết với hỗn hợp methanol và nước ở các tỉ lệ khác nhau (methanol 60%, 80% và 100%). Dung môi cho hiệu suất chiết các chất phân tích cao nhất được lựa chọn, đồng thời khảo sát tối ưu số lần chiết bằng dung môi này nhằm bảo đảm chiết kiệt hai chất phân tích.

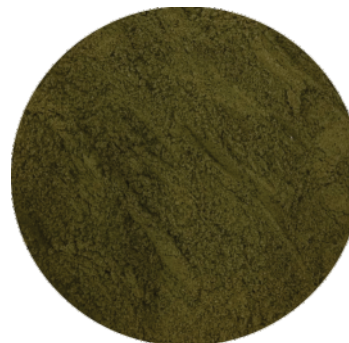
2.2.5. Thẩm định quy trình định lượng hederacosid C và α -hederin trong cao khô TX

Quy trình định lượng được thẩm định theo hướng dẫn của ICH, bao gồm các chỉ tiêu tính đặc hiệu, tính phù hợp của hệ thống, tính tuyến tính, giới hạn phát hiện, giới hạn định lượng, độ chính xác (độ lặp lại và độ chính xác trung gian), độ đúng [11].

3. KẾT QUẢ

3.1. Chiết xuất cao khô lá TX

Từ 1.5 kg nguyên liệu lá TX, cao khô TX được điều chế ở quy mô phòng thí nghiệm thu được 393 g cao TX với độ ẩm 4.65%, hiệu suất chiết là 26.2% (Hình 2).



Hình 2. Cao khô TX

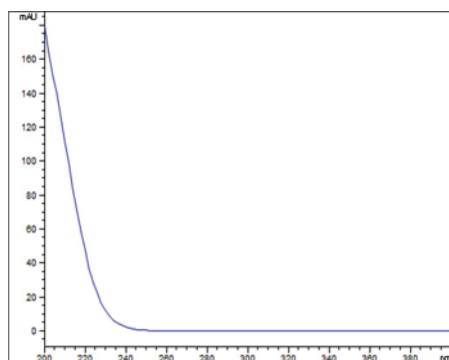
3.2. Khảo sát điều kiện sắc ký

Dựa trên kết quả quét phổ của hederacosid C và α -hederin (Hình 3), bước sóng phát hiện 205 nm được lựa chọn để định lượng đồng thời hai hợp chất này. Kết quả trình bày trong Bảng 1 cho thấy hệ số bất đối xứng của pic α -hederin khi phân tích theo chương trình gradient (1) nằm ngoài khoảng cho phép 0.8 - 1.5 ($A_s = 1.8$). Quan sát sắc đồ ở Hình 4 cho thấy chương trình gradient (2) cho khả năng tách giữa pic hederacosid C và pic kế cận tốt hơn so với chương trình gradient (1). Do đó, chương trình gradient (2) được lựa chọn làm điều kiện sắc ký cho các phân tích tiếp theo.

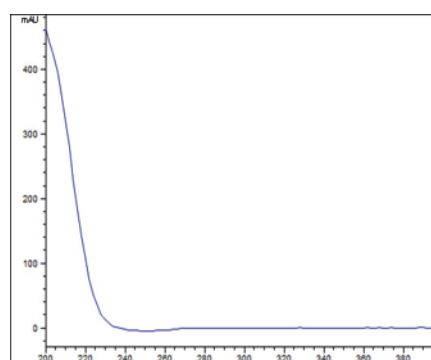
Bảng 1. Các thông số sắc ký của chương trình gradient (1) và chương trình gradient (2)

Chương trình rửa giải gradient	Dung dịch	Hederacosid C		α -hederin	
		R_s	A_s	R_s	A_s
(1)	Chuẩn	31.1	1.0	6.0	1.2
	Thử	2.6	1.0	2.4	1.8
(2)	Chuẩn	42.4	1.1	7.3	1.1
	Thử	1.7	1.3	2.1	1.1

R_s : Độ phân giải; A_s : Hệ số bất đối

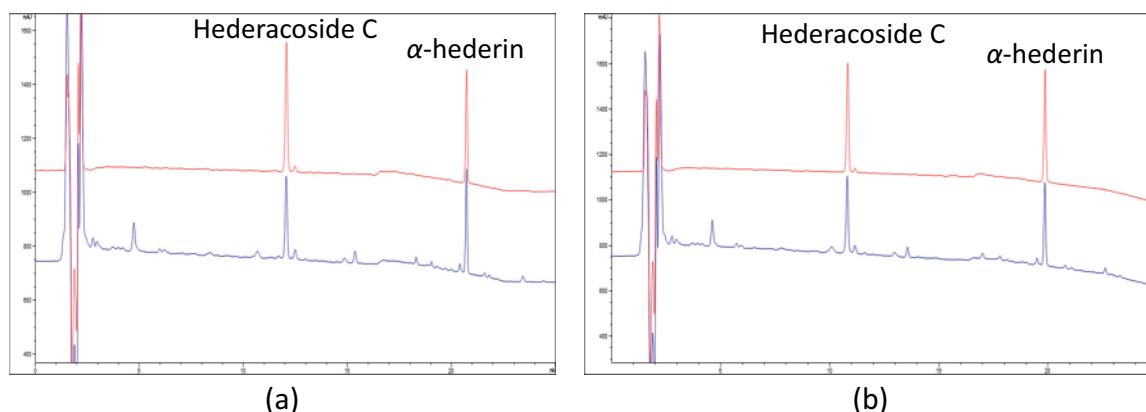


(a)



(b)

Hình 3. Phổ UV của dung dịch chuẩn (a) hederacosid C và (b) α -hederin



Hình 4. Sắc ký đồ (a) chương trình gradient (1) và (b) chương trình gradient (2) của (—) dung dịch chuẩn và (—) dung dịch thử

Như vậy, điều kiện sắc ký thích hợp để định lượng đồng thời hederacosid C và α -hederin trong cao khô TX (*Hedera helix*) như sau: Cột C18 (150 $\times$ 4.6 mm; 5 μ m); đầu dò DAD với bước sóng phát hiện 205 nm; Thể tích tiêm mẫu 20 μ L; Tốc độ dòng: 1.0 mL/phút. Pha động bao gồm acetonitrile (dung môi A) và nước (dung môi B), cả hai đều chứa 0.1% acid formic và được duy trì ở nhiệt độ phòng. Độ pH của pha động không được điều chỉnh. Chương trình rửa giải gradient được thiết lập như sau: 0 phút, 20% A và 80% B; 14 phút, 39% A và 61% B; 20 - 25 phút, 65% A và 35% B; 26 phút, 70% A và 30% B; 27 - 37 phút, 90% A và 10% B; 38 - 45 phút, 20% A và 80% B.

3.3. Khảo sát quy trình chuẩn bị dung dịch thử

Kết quả trình bày trong Bảng 2 cho thấy việc sử

dụng dung môi chiết methanol 80% mang lại diện tích pic của các hoạt chất đạt giá trị lớn nhất. Để đảm bảo chiết xuất hoàn toàn các hợp chất trong mẫu, hai thí nghiệm đã được tiến hành. Ở thí nghiệm thứ nhất, mẫu được chiết lần đầu với 10 mL methanol 80%, sau đó lặp lại hai lần, mỗi lần với 10 mL methanol 80%. Phép thử thứ hai được thực hiện tương tự, tuy nhiên ở hai lần kế tiếp, thể tích dung môi sử dụng cho mỗi lần là 2 mL methanol 80%. Dựa trên kết quả ở Bảng 3, nhận thấy diện tích pic của hai hoạt chất ở các lần chiết tiếp theo hầu như không đáng kể. Do đó, quy trình chiết được lựa chọn là một lần chiết với 10 mL methanol 80%.

Bảng 2. Kết quả khảo sát dung môi chiết

Dung môi	Tỷ lệ cao khô/dung môi (mg/mL)	Diện tích pic (mAu*s)	
		Hederacosid C	α -hederin
ethanol 100%	35.13/10	2,404.4	2,182.7
Methanol 80%	35.11/10	2,490.8	2,182.2
Methanol 60%	35.33/10	2,466.1	2,162.4

Bảng 3. Kết quả khảo sát số lần chiết

Mẫu	Khối lượng cao (mg)	Số lần chiết (lần)	Thể tích dung môi (mL)	Diện tích pic (mAu*s)		Tỷ lệ (%)	
				Hederacosid C	α -hederin	Hederacosid C	α -hederin
1	35.21	1	10	2,427.7	2,281.6	100.00	100.00
		2	10	-	-	0.00	0.00
		3	10	-	-	0.00	0.00
2	35.81	1	10	2,495.2	2,237.8	97.63	97.73
		2	2	60.6	51.9	2.37	2.27
		3	2	-	-	0.00	0.00

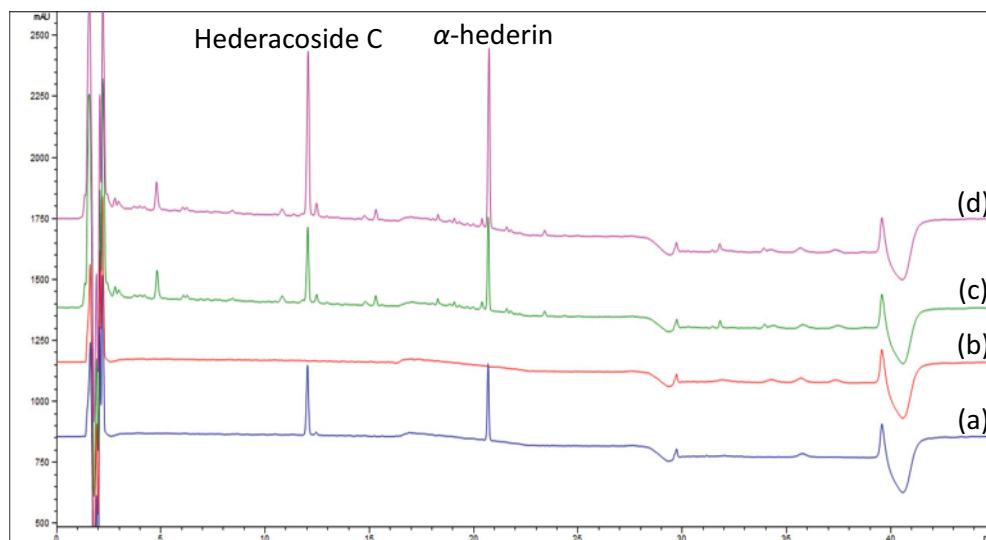
“-”: Không phát hiện

Quy trình chuẩn bị mẫu thử như sau: Cân chính xác 35 mg cao khô từ lá TX và chuyển vào bình định mức 10 mL. Thêm khoảng 9 mL methanol 80%, lắc nhẹ hỗn hợp để phân tán mẫu. Dung dịch sau đó được siêu âm trong 15 phút ở nhiệt độ phòng nhằm đảm bảo chiết xuất hoàn toàn các hoạt chất. Để nguội về nhiệt độ phòng, thêm tiếp methanol 80% đến vạch định mức, lắc đều, lọc qua màng lọc 0.45 μm trước khi tiến hành phân tích HPLC.

3.4. Thẩm định quy trình định lượng

3.4.1. Tính đặc hiệu

Các sắc ký đồ khảo sát tính đặc hiệu (Hình 5) cho thấy dung dịch thử và dung dịch thử thêm chuẩn đều xuất hiện các pic có thời gian lưu tương ứng với pic hederacosid C và α -hederin trong dung dịch chuẩn (Bảng 4). Diện tích pic của hai hợp chất trong dung dịch thử có thêm chất chuẩn tăng lên với dung dịch thử không thêm chất chuẩn. Mặt khác, các sắc ký đồ thu được cho thấy các pic rõ ràng, chứng tỏ phương pháp được xây dựng có tính đặc hiệu cao.



Hình 5. Kết quả khảo sát tính đặc hiệu: (a) Dung dịch chuẩn, (b) dung dịch trắng, (c) dung dịch thử, (d) dung dịch thử thêm chuẩn

Bảng 4. Thời gian lưu của pic hederacosid C và α -hederin trong kết quả khảo sát tính đặc hiệu

Dung dịch	Thời gian lưu (phút)	
	Hederacosid C	α -hederin
Chuẩn	12.015	20.672
Thử	12.027	20.681
Thử thêm chuẩn	12.045	20.717
Trắng	-	-

“-”: Không phát hiện

3.4.2. Tính phù hợp của hệ thống

Kết quả trình bày trong Bảng 5 cho thấy độ lệch chuẩn tương đối (RSD) của thời gian lưu và diện tích pic của hederacosid C và α -hederin đều nhỏ

hơn 2.0%. Hệ số bất đối xứng của các pic nằm trong khoảng 0.8 - 1.5 và độ phân giải đều lớn hơn 1.5. Do đó, phương pháp được xây dựng đáp ứng các tiêu chí đánh giá tính phù hợp của hệ thống.

Bảng 5. Kết quả khảo sát tính phù hợp của hệ thống

		Thời gian lưu (phút)	Diện tích pic (mAu*s)	Hệ số bất độ	Độ phân giải
Hederacosid C	Trung bình	12.131	2,225.1	1.1	2.4
	RSD (%)	0.27	0.67		

		Thời gian lưu (phút)	Diện tích pic (mAu*s)	Hệ số bất độ	Độ phân giải
α -hederin	Trung bình	20.781	2,236.1	1.1	2.2
	RSD (%)	0.02	0.57		

3.4.3. Tính tuyến tính, giới hạn phát hiện (LOD), giới hạn định lượng (LOQ)

Dãy dung dịch chuẩn hederacosid C và α -hederin đã được chuẩn bị để đánh giá tính tuyến tính của phương pháp. Giới hạn phát hiện (LOD) và giới hạn định lượng (LOQ) được xác định bằng cách pha loãng dung dịch chuẩn đến khi tín hiệu của chất phân tích trên sắc ký đồ đạt tỷ lệ tín hiệu trên nhiễu

(S/N) xấp xỉ 3 đối với LOD và 10 đối với LOQ. Kết quả phép thử được trình bày tại Bảng 6 cho thấy hệ số tương quan tuyến tính (r) đều lớn hơn 0.999. Giá trị Significance F nhỏ hơn 0.05 chứng tỏ các phương trình hồi quy tương thích. Các giá trị p của hệ số chặn và hệ số góc cho thấy hệ số chặn không có ý nghĩa thống kê, trong khi hệ số góc có ý nghĩa thống kê.

Bảng 6. Kết quả khảo sát tính tuyến tính, LOD, LOQ

	Hederacosid C	α -hederin
Khoảng tuyến tính	0.174 - 1.475 mg/mL	0.118 - 1.000 mg/mL
r	0.9995	0.9990
Trắc nghiệm F:	Significance F = 0.00	Significance F = 0.00
Trắc nghiệm t:		
Hệ số chặn	p-value = 0.08	p-value = 0.15
Hệ số góc	p-value = 0.00	p-value = 0.00
Phương trình hồi quy	$\hat{y} = 4,051.6x$	$\hat{y} = 6,774.6x$
LOD	0.015 mg/mL	0.010 mg/mL
LOQ	0.050 mg/mL	0.035 mg/mL

3.4.4. Độ chính xác (độ lặp lại, độ chính xác trung gian)

Một loạt các dung dịch thử ở nồng độ 100% được chuẩn bị và phân tích theo quy trình định lượng đã xây dựng. Thử nghiệm độ chính xác được thực hiện bằng cách so sánh hàm lượng hederacosid C và α -hederin được xác định trong hai ngày khác nhau bởi các kiểm nghiệm viên khác nhau. Kết

quả trình bày trong Bảng 7 cho thấy giá trị RSD trong ngày và giữa các ngày của cả hai chất đều nhỏ hơn hoặc bằng 2.0%. Phân tích thống kê Anova: Single Factor được sử dụng để đánh giá sự khác biệt giữa các ngày phân tích; kết quả cho thấy giá trị p đều lớn hơn 0.05. Do đó, phương pháp được xây dựng có độ chính xác đạt yêu cầu khi thực hiện trong hai ngày.

Bảng 7. Kết quả khảo sát độ chính xác

		Hàm lượng phần trăm trong cao khan (% kl/kl)			
		Hederacosid C		α -hederin	
		Ngày 1	Ngày 2	Ngày 1	Ngày 2
Độ lặp lại (n = 6)	Trung bình	17.32	17.19	9.60	9.66
	RSD (%)	1.08	1.74	1.27	2.00

		Hàm lượng phần trăm trong cao khan (% kl/kl)			
		Hederacosid C		α -hederin	
		Ngày 1	Ngày 2	Ngày 1	Ngày 2
Độ chính xác trung gian (n = 12)	Trung bình	17.26		9.63	
	RSD (%)	0.51		0.50	
	Anova: Single Factor	<i>p</i> -value = 0.40		<i>p</i> -value = 0.48	

3.4.5. Độ đúng

Độ đúng của phương pháp được đánh giá bằng cách thêm vào mẫu thử một lượng chính xác của mỗi chất chuẩn tương ứng. Một thể tích chính xác của dung dịch chuẩn gốc có nồng độ đã biết được thêm vào mẫu thử, tương ứng với khối lượng của hai hoạt chất ở các mức khoảng 80%, 100% và

120% so với lượng có sẵn trong mẫu, mỗi mức thực hiện 3 mẫu riêng biệt. Sau đó, dung dịch mẫu thử được chuẩn bị theo quy trình đã xây dựng. Kết quả phép thử độ đúng trình bày trong Bảng 8, cho thấy tỷ lệ thu hồi của hederacosid C và α -hederin nằm trong khoảng 98 - 102%, với giá trị RSD nhỏ hơn 2.0%.

Bảng 8. Kết quả khảo sát độ đúng

Mức	Hederacosid C			α -hederin		
	Tỷ lệ thu hồi (%)	Trung bình (%)	RSD (%)	Tỷ lệ thu hồi (%)	Trung bình (%)	RSD (%)
80% (n = 3)	98.81	100.10	1.40	98.77	99.69	1.98
	101.59			101.96		
	99.90			98.34		
100% (n = 3)	100.66	100.75	0.23	99.55	100.04	0.77
	101.01			100.93		
	100.58			99.64		
120% (n = 3)	101.89	101.20	0.60	97.09	98.27	1.16
	100.74			98.35		
	100.97			99.37		

4. BÀN LUẬN

Trong cao chiết lá TX, các saponin triterpenoid chủ yếu tồn tại dưới dạng glycosid, điển hình là hederacosid C, trong đó aglycone hederagenin được liên kết với một đơn vị pentose và bốn đơn vị hexose. Quá trình glycosyl hóa làm tăng khả năng hòa tan của saponin trong môi trường nước, tạo điều kiện thuận lợi cho quá trình vận chuyển và tích lũy trong tế bào, đồng thời bảo vệ aglycone khỏi sự phân hủy bởi enzyme. Ngược lại, α -hederin chỉ chứa một đơn vị pentose và

một đơn vị hexose gắn với cùng một aglycone, có thể là dạng thủy phân một phần của glycoside hoặc có thể được tổng hợp trực tiếp. Vì vậy, α -hederin hiện diện trong dược liệu TX với hàm lượng thấp hơn. Mối quan hệ sinh hóa này giải thích tại sao hederacosid C có hàm lượng cao hơn α -hederin trong cao khô TX, điều này cũng phù hợp với kết quả quan sát được trong thử nghiệm độ chính xác.

Đối với điều kiện sắc ký, acid formic (0.1%) được thêm vào dung môi pha động nhằm tối ưu hóa

quá trình phân tích do trong cấu trúc hóa học của các chất phân tích chứa nhóm carboxyl (-COOH) và nhiều nhóm hydroxyl (-OH). Môi trường acid giúp duy trì các chất phân tích chủ yếu ở dạng phân tử, đồng thời hạn chế sự tương tác giữa các chất này với các nhóm silanol tự do trên bề mặt pha tĩnh. Trong trường hợp không bổ sung acid, các tương tác giữa chất phân tích và nhóm silanol có thể xảy ra, dẫn đến hiện tượng kéo đuôi. Việc bổ sung acid formic giúp ưu tiên che phủ các nhóm silanol, từ đó làm giảm thiểu tương tác không mong muốn và cải thiện hình dạng pic sắc ký. Hederacosid C là saponin triterpenoid khung oleanan năm vòng, có aglycon là hederagenin và phần đường gồm một đơn vị pentose cùng bốn đơn vị hexose; trong khi α -hederin cũng có cùng aglycon nhưng chỉ mang một đơn vị pentose và một đơn vị hexose. Do có số lượng gốc đường nhiều hơn, hederacosid C có tính phân cực cao hơn so với α -hederin, mặc dù α -hederin vẫn thể hiện độ phân cực trung bình nhờ sự hiện diện của các đơn vị đường. Dung môi methanol 80%, với độ phân cực phù hợp, có khả năng hòa tan hiệu quả cả hai hợp chất, qua đó đảm bảo hiệu quả chiết xuất và độ tin cậy của phương pháp phân tích HPLC.

Các kết quả thu được trong nghiên cứu này cho thấy sự cải tiến so với các phương pháp HPLC đã được công bố đối với cao khô TX. Các nghiên cứu trước đây chủ yếu tập trung vào nguyên liệu thô hoặc mẫu chưa được chuẩn hóa, do đó làm hạn chế khả năng so sánh các kết quả định lượng. Một số phương pháp sử dụng cột có chiều dài lớn (250 $\times$ 4.6 mm, 5 μ m) yêu cầu thời gian phân tích kéo dài (lên đến 70 phút) hoặc chương trình rửa giải ngắn hơn (khoảng 30 phút) nhưng không báo cáo

bước tái cân bằng cột, đồng thời các giá trị LOD và LOQ được tính toán theo lý thuyết, không xác định trên thực nghiệm [12, 13]. Ngược lại, phương pháp được xây dựng trong nghiên cứu này sử dụng cột C18 có chiều dài 150 mm với chương trình phân tích 45 phút, bao gồm cả giai đoạn tái cân bằng cột, cho khả năng phân tách đáng tin cậy trong thời gian phân tích ngắn hơn. Bên cạnh đó, việc xác định LOD và LOQ bằng thực nghiệm dựa trên tỷ lệ tín hiệu/nhiều giúp cung cấp dữ liệu độ nhạy sát thực tế hơn, phù hợp cho việc định lượng saponin trong cao khô lá TX.

5. KẾT LUẬN

Trong nghiên cứu này, một phương pháp HPLC-DAD có độ tin cậy và tính ổn định cao đã được xây dựng và thẩm định nhằm định lượng đồng thời hederacosid C và α -hederin trong cao khô TX. Phương pháp sử dụng quy trình chuẩn bị mẫu đơn giản, pha động dễ áp dụng, đồng thời đáp ứng đầy đủ các yêu cầu thẩm định, bao gồm tính đặc hiệu, tính phù hợp của hệ thống, khoảng tuyến tính rộng, giới hạn phát hiện và giới hạn định lượng thấp, đạt độ chính xác và độ đúng đáp ứng đầy đủ yêu cầu của một quy trình định lượng. Với ưu điểm về tính đơn giản, độ lặp lại và khả năng tái lập tốt, phương pháp có thể được triển khai trong công tác kiểm nghiệm và kiểm soát chất lượng thường quy đối với cao TX tại Việt Nam, đồng thời đóng góp cơ sở khoa học cho việc xây dựng và hoàn thiện tiêu chuẩn dược điển quốc gia đối với các chế phẩm từ TX.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu này được tài trợ bởi Trường Đại học Tôn Đức Thắng (mã số đề tài: FOSTECT.2024.27).

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] J. Julien, M. Gasquet, C. Maillard, G. Balansard, and P. Timon-David, "Extracts of the ivy plant, *Hedera helix*, and their anthelmintic activity on liver flukes," *Planta medica*, vol. 51, no. 03, pp. 205-208, 1985.
- [2] A. Trute, J. Gross, E. Mutschler, and A. Nahrstedt, "In vitro Antispasmodic Compounds of the Dry Extract Obtained from *Hedera helix*," *Planta Medica*, vol. 60, no. 2, pp. 125-129, 1997.

- [3] A. Rai, "The Antiinflammatory and Antiarthritic Properties of Ethanol Extract of *Hedera helix*," *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 75, no. 1, pp. 99-102, 2013.
- [4] H. G. Jeong and H. Y. Park, "The prevention of carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in mice by α -hederin: Inhibition of cytochrome P450 2E1 expression," *Biochemistry and molecular biology international*, vol. 45, no. 1, pp. 163-170, 1998.

- [5] J. H. Lorent, C. Léonard, M. Abouzi, F. Akabi, J. Quetin-Leclercq, and M.-P. Mingeot-Leclercq, " α -Hederin Induces Apoptosis, Membrane Permeabilization and Morphologic Changes in Two Cancer Cell Lines Through a Cholesterol-Dependent Mechanism," *Planta Medica*, vol. 82, no. 18, pp. 1532-1539, 2016.
- [6] L. Cheng *et al.*, "The anticancer effect and mechanism of α -hederin on breast cancer cells," *International Journal of Oncology*, vol. 45, no. 2, pp. 757-763, 2014.
- [7] I. Gülçin, V. Mshvildadze, A. Gepdiremen, and R. Elias, "Antioxidant activity of saponins isolated from ivy: α -hederin, hederasaponin-C, hederacolchiside-E and hederacolchiside-F," *Planta Medica*, vol. 70, no. 6, pp. 561-563, 2004.
- [8] M. T. Islam, "A Pharmacological Emphasized Revision on Alpha-Hederin," *J Complement Med Alt Healthcare*, vol. 1, no. 3, p. 555564, 2017.
- [9] S. U. Rehman, M. S. Choi, I. S. Kim, S. H. Kim, and H. H. Yoo, "An ultra-high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometric method for the determination of hederacosid C, a drug candidate for respiratory disorder, in rat plasma," *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, no. 129, pp. 90-95, 2016.
- [10] Y. Lutsenko, W. Bylka, I. Matławska, and R. Darmohray, "*Hedera helix* as a medicinal plant," *Herba polonica*, vol. 56, no. 1, pp. 84-93, 2010.
- [11] ICH, "Validation of analytical procedures: Text and methodology Q2(R1)," 2005, pp. 6-13.
- [12] A. Khdair *et al.*, "A Validated RP HPLC-PAD Method for the Determination of Hederacosid C in Ivy-Thyme Cough Syrup," *International Journal of Analytical Chemistry*, pp. 1-5, 2010.
- [13] N. T. H. Mai, T. T. Diệp, and P. V. Trung, "Xây dựng phương pháp định lượng đồng thời hederacosid C và α -hederin trong lá Thường xuân bằng HPLC," *Tạp chí Dược liệu*, vol. 21, no. 6, pp. 388-392, 2016.

Simultaneous quantification of hederacosid C and α -hederin in Thuong xuan (*Hedera helix* L.) dry extract using HPLC-DAD

Tran Mong Kha, Ngo Thi My Duyen,
Le Thi Minh Thu, Vu Huynh Kim Long

ABSTRACT

Background: *Thuong Xuan (Hedera helix L. - TX)* is a medicinal plant with significant pharmacological activities, possessing considerable potential for the development of various valuable therapeutic products. However, this absence of appropriate specifications for its extract and preparations presents challenges for quality control of unregulated raw materials and commercial products. **Objectives:** This study aims to develop and validate an HPLC-DAD method for simultaneously quantifying hederacosid C and α -hederin in TX dry extract. **Material and methods:** HPLC conditions and sample preparation were optimized, and the analytical method was validated according to ICH guidelines. **Results:** A rapid, simple, and practical HPLC-DAD was established for quality evaluation of *Hedera helix* L. dry extract through a simultaneous determination of hederacosid C and α -hederin. The method demonstrated high specificity, a wide linear range ($r \geq 0.999$), low limits of detection (0.015 mg/mL for hederacosid C and 0.010 mg/mL for α -hederin) and quantification (0.050 mg/mL for hederacosid C and 0.035 mg/mL for α -hederin), and exceptional precision [relative standard deviation (RSD) $\leq 2.00\%$] and accuracy (98.27% - 100.04%, RSD $\leq 1.98\%$). The contents of hederacosid C and α -hederin were 17.26% and 9.63% (w/w, dried basis), respectively, as determined by HPLC-

DAD. Conclusion: The validated method is suitable for simultaneously determining hederacosid C and α -hederin in Hedera helix L. dry extract, and can be applied for routine quality control of TX-based products.

Keywords: *Thuong Xuan, hedera helix L., hederacosid C, α -hederin, HPLC-DAD*

Received: 06/10/2025

Revised: 08/11/2025

Accepted for publication: 01/12/2025