

Xây dựng qui trình định lượng hydroxychavicol trong cao Trầu không (*Piper betle* L. piperaceae) bằng sắc kí lỏng hiệu năng cao

Phan Thị Thanh Thủy, Nguyễn Đình Nga

Khoa Dược – Đại học Nguyễn Tất Thành
ptthuy@ntt.edu.vn

Tóm tắt

Dịch chiết Trầu không đã được chứng minh có khả năng kháng nấm da và kháng khuẩn rất tốt. Thành phần chính có hoạt tính trong dịch chiết là hydroxychavicol. Hydroxychavicol trong cao trầu không (*Piper betle* L. Piperaceae) được định lượng bằng sắc kí lỏng hiệu năng cao sử dụng cột C18 (5 μ m x 2,1 mm x 250 mm) để chạy với pha động là acetonitril: orthophosphoric acid 0,05 % (30 : 70), tốc độ dòng 0,5 mL/min, thể tích tiêm mẫu 2 μ L. Kết quả thẩm định theo hướng dẫn của ICH cho thấy quy trình có độ đặc hiệu cao, đạt độ tuyến tính, đạt độ lặp lại với RSD = 1,12 %, đạt độ đúng với tỉ lệ hồi phục 96 %. Quy trình đã cung cấp các thông số nhằm góp phần xây dựng tiêu chuẩn kiểm nghiệm cao Trầu không của Việt Nam. Nghiên cứu đã sử dụng quy trình trên để đánh giá hàm lượng hydroxychavicol trong cao chiết nước phân đoạn dicloromethan của Trầu không cho thấy hàm lượng hydroxychavicol khoảng 85 %.

Nhận 01.10.2021
Được duyệt 09.11.2021
Công bố 06.04.2022

Từ khóa
Trầu không, *Piper betle*,
hydroxychavicol, HPLC

© 2022 Journal of Science and Technology - NTTU

1 Đặt vấn đề

Trầu không (TrK) là cây thuốc được sử dụng từ lâu đời trong y học cổ truyền nước ta và một số nước châu Á dùng chữa cảm, giảm đau trong bong gân, làm lành vết thương, se niêm mạc, kích thích tiết men gan, làm lành vết thương, kích thích sinh dục, trị hắc bào, lang beng [1,2]. Đặc biệt tác dụng kháng nấm, kháng khuẩn của TrK đã được nhiều nghiên cứu trên thế giới kiểm chứng [3,6,7]. Cao chiết từ lá TrK với ethanol có thành phần chính là hydroxychavicol đã được chứng minh là có tác động kháng nấm da *Malassezia furfur* và *Candida* spp **Error! Reference source not found.** Ngoài ra cao chiết lá TrK tươi bằng phương pháp đun hồi lưu với nước cho được khả năng kháng *C. albican*, *M. furfu*, *E.coli*, *S. aureus*.

Các nghiên cứu trên thế giới cũng cho thấy thành phần có hoạt tính sinh học (kháng viêm, chống oxy hóa, kháng ung thư, chống kết tập tiểu cầu, kháng khuẩn, kháng nấm,...) trong lá TrK là hydroxychavicol

[8,13,14]. Phương pháp định lượng bằng sắc kí lỏng hiệu năng cao (High Performance Liquid Chromatography – HPLC) cho thấy hàm lượng hydroxychavicol trong cao chiết nước lá TrK nhiều hơn so với các loại cao chiết n – hexan, ethyl acetat, ethanol [11]. Hơn nữa, cao chiết nước lá TrK tươi còn cho được khả năng kháng khuẩn và kháng nấm mạnh hơn các cao chiết bằng từ phương pháp khác [12]. Hiện nay, lá TrK ở nước ta thường sử dụng ở dạng nước sắc hoặc cao nhưng trong Dược điển Việt Nam vẫn chưa có tiêu chuẩn kiểm nghiệm cho cao dược liệu này. Nhằm khai thác nguồn dược liệu lá TrK làm thuốc kháng nấm và kháng khuẩn, góp phần xây dựng tiêu chuẩn cho cao lá TrK, mục tiêu nghiên cứu là xây dựng qui trình định lượng hydroxychavicol trong cao TrK bằng phương pháp HPLC.

2 Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

2.1 Đối tượng nghiên cứu

Lá TrK tươi được chọn là loại bánh tẻ (không được quá non hay quá già), có khả năng kháng khuẩn và kháng nấm tốt [4], không bị sâu bệnh hay dập úng thu hái ở Bà Điểm - Hóc Môn, Thành phố Hồ Chí Minh. Lá trà được rửa sạch với nước, cắt nhỏ (2-4) mm².

2.2 Thiết bị- hóa chất: máy sắc kí lỏng cao áp (HPLC) phân tích Waters 2695 Separation Modules, LC – 20 A (Shimadzu, Japan), cột GL C18 5 μm (2,1 mm x 250 mm); dicloromethan (Trung Quốc); Acid orthophosphoric 0,1 % (Merck); acetonitril (Merck); Hydroxychavicol (Merck).

2.3 Phương pháp nghiên cứu

2.3.1 Quy trình chiết xuất [1,2]

Dựa vào điều kiện chiết xuất tối ưu đã được khảo sát với sự hỗ trợ của phần mềm BCPharsoft [4] chúng tôi đưa ra quy trình chiết cao TrK như sau:

- Chia mỗi lô gồm 200 g dược liệu lá TrK tươi; đun sôi hồi lưu (100 °C) với 1 lít nước trong 3 giờ, thu dịch chiết, lọc qua giấy lọc.

- Dịch lọc được cô bay hơi dung môi (100 °C) đến thể tích 64 mL thu được dịch chiết nước cô đặc, lắc phân bố với dichloromethan.

- Phân đoạn dichloromethan được cô quay thu hồi dung môi để có cao TrK, hút ẩm đến khối lượng không đổi trước khi xác định khối lượng cao.

2.3.2 Xây dựng phương pháp định lượng

- *Khảo sát điều kiện sắc kí*

Dựa vào nghiên cứu của KY. Pin [13] điều kiện sắc kí được đề xuất như sau:

+ Nhiệt độ cột: nhiệt độ phòng;

+ Bước sóng phát hiện: 210 nm, là bước sóng hấp thụ cực đại của hydroxychavicol;

+ Khảo sát tỉ lệ pha động acetonitril – acid orthophosphoric 0,05 %: triển khai mẫu chuẩn qua cột GL C18 (5 μm x 2,1 mm x 250 mm) với các tỉ lệ pha động khác nhau;

+ Khảo sát tốc độ dòng: 0,3; 0,5 (mL/min);

+ Khảo sát thể tích tiêm mẫu: (20; 10; 5 và 2) μL.

- *Thẩm định qui trình định lượng*

Dung dịch chuẩn: cân chính xác một lượng chất chuẩn hydroxychavicol. Hòa tan trong pha động để thu được dung dịch có nồng độ 25 μg/mL.

Dung dịch thử: cân chính xác khoảng 15 mg cao, pha trong bình định mức 20 mL, pha loãng 20 lần với dung môi acetonitril. Lọc dịch chiết qua màng lọc milipore 0,45 μm.

Hàm lượng hydroxychavicol (mg/g) trong cao được

tính theo công thức:

$$C_t = \frac{S_t \times k \times C_c \times P}{S_c \times m \times (100\% - h)}$$

Trong đó:

- C_t: nồng độ chất khảo sát có trong cao (mg/1g cao)

- S_t: diện tích đỉnh thu được của mẫu đo

- S_c: diện tích đỉnh thu được mẫu chuẩn

- C_c: nồng độ chất chuẩn (μg/mL)

- P: độ tinh khiết của chất chuẩn (P = 99,8 %)

- h: độ ẩm của cao (h = 7,6 %)

- m: khối lượng cân của cao để định lượng (mg)

- k: thể tích dung dịch pha loãng của mẫu thử (k = 400 mL)

Thẩm định quy trình định lượng hydroxychavicol theo hướng dẫn của Hội nghị Quốc tế về sự Hòa hòa các yêu cầu kĩ thuật đối với dược phẩm dùng cho con người (International Conference on Harmonization – ICH) về tính tương thích hệ thống, tính đặc hiệu, tính tuyến tính, độ chính xác, độ đúng và tính chọn lọc [12].

- *Khảo sát tính tương thích hệ thống*

Tiến hành kiểm tra tính tương thích hệ thống bằng cách lần lượt bơm 6 lần liên tiếp cùng một mẫu chuẩn có nồng độ xác định vào máy HPLC. Điều kiện HPLC tối ưu đã được xác định. Xác định tính tương thích hệ thống dựa trên giá trị và độ lặp lại của các thông số kĩ thuật : S: diện tích peak, t_R: thời gian lưu, T: hệ số kéo đuôi, N: số đĩa lí thuyết, H: độ phân giải, W_{1/2}: độ rộng tại ½ chiều cao peak.

Xử lí thống kê số liệu:

Giá trị trung bình: $\bar{X} = \frac{\sum_{i=1}^n X_i}{n}$

Độ lệch chuẩn: $\sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})^2}{(n-1)}}$

Độ lệch chuẩn tương đối:

$$RSD = \frac{SD}{\bar{X}} \times 100$$

Yêu cầu: quy trình đạt tính tương thích hệ thống khi các thông số sắc kí thực hiện trên mẫu chuẩn có RSD ≤ 5 %.

- *Khảo sát tính tuyến tính*

Pha mẫu chuẩn có nồng độ chất chuẩn tăng dần để xây dựng đường tuyến tính.

Mỗi dung dịch sau khi được lọc qua màng lọc milipore 0,45 μm được bơm 2 lần vào hệ thống



HPLC. Điều kiện chạy HPLC như đã định. Dùng phần mềm Excel để lập đường tuyến tính biểu diễn sự tương quan giữa nồng độ và diện tích đỉnh. Mỗi tương quan tuyến tính được thiết lập bằng cách xác định phương trình hồi quy $y = ax + b$; tính R^2 . Tính tương thích của phương trình hồi quy được kiểm tra bằng nghiệm F; ý nghĩa của các hệ số trong phương trình kiểm tra bằng nghiệm t. Yêu cầu: $R^2 \geq 0,995$.

- Khảo sát độ lặp lại

Chuẩn bị riêng rẽ ít nhất 6 mẫu thử (chiết theo qui trình đã khảo sát) ở nồng độ xác định. Thực hiện trong cùng một ngày trên cùng điều kiện. Tiến hành định lượng bằng HPLC với các điều kiện sắc kí đã chọn sau khi khảo sát, mỗi mẫu bơm 1 lần. Tính nồng độ trung bình \bar{X} , SD, RSD (%) của các kết quả nồng độ từ 6 lần đo được. Yêu cầu theo Bảng 1.

Bảng 1 Sự thay đổi độ chính xác theo nồng độ chất phân tích

Nồng độ chất phân tích (%)	Tỉ số nồng độ	Đơn vị tương ứng	RSD %
100	1	100 %	1,3
≥ 10	10^{-1}	10 %	2,8
≥ 1	10^{-2}	1 %	2,7
$\geq 0,1$	10^{-3}	0,1 %	3,7
0,01	10^{-4}	100 ppm	5,3
0,001	10^{-5}	10 ppm	7,3
0,0 001	10^{-6}	1 ppm	11

- Khảo sát tính đúng

Thêm một lượng chất chuẩn vào mẫu thử đã xác định hàm lượng. Lượng chất chuẩn thêm vào tương đương với (80, 100 và 120) %, hàm lượng hoạt chất tương ứng trong mẫu thử. Tiến hành chiết xuất và định lượng lại các chất này theo quy trình đã xây dựng. Ở mỗi nồng độ thực hiện 3 mẫu.

Xác định diện tích đỉnh trung bình, tính ra hàm lượng rồi tính % tỉ lệ phục hồi ở từng nồng độ thêm vào.

Yêu cầu theo Bảng 2

Bảng 2 Mối liên quan giữa tỉ lệ phục hồi và nồng độ chất phân tích

Nồng độ chất phân tích (%)	Tỉ lệ nồng độ	Đơn vị tương ứng	Tỉ lệ phục hồi TB (%)
100	1	100 %	98 – 102
≥ 10	10^{-1}	10 %	98 – 102
≥ 1	10^{-2}	1 %	97 – 103
$\geq 0,1$	10^{-3}	0,1 %	95 – 105

0,01	10^{-4}	100 ppm	90 – 107
0,001	10^{-5}	10 ppm	80 – 110
0,0 001	10^{-6}	1 ppm	80 – 110

- Khảo sát tính chọn lọc

Tính chọn lọc được kiểm tra bằng sắc kí đồ của:

- Mẫu thử
- Mẫu chuẩn
- Mẫu thử thêm chuẩn
- Dung môi hòa tan mẫu

Quan sát và so sánh thời gian lưu của peak khảo sát trong các dung dịch.

Yêu cầu:

Thời gian lưu của peak khảo sát trong mẫu thử phải tương đương với thời gian lưu của peak chất khảo sát trong mẫu chuẩn, đồng thời mẫu trắng không có peak trùng với peak của chất khảo sát.

Peak của chất khảo sát tách hoàn toàn các peak khác trong sắc kí đồ mẫu thử.

Khi thêm một lượng chất chuẩn của chất khảo sát vào mẫu thử, chiều cao và diện tích peak của chất khảo sát tăng lên so với trước khi thêm chất chuẩn.

Dung môi hòa tan mẫu không cho peak của chất khảo sát.

3 Kết quả và bàn luận

3.1 Chiết xuất

200 g dược liệu thu được khối lượng cao trung bình qua 3 lần chiết 0,71 g.

Bảng 3 Kết quả chiết cao

	1	2	3	TB
Khối lượng cao (g)	0,74	0,72	0,71	0,723
Hiệu suất (%)	0,37	0,36	0,355	0,362

3.2 Khảo sát điều kiện sắc kí HPLC

- Khảo sát tỉ lệ pha động acetonitril – acid orthophosphoric 0,05 %:

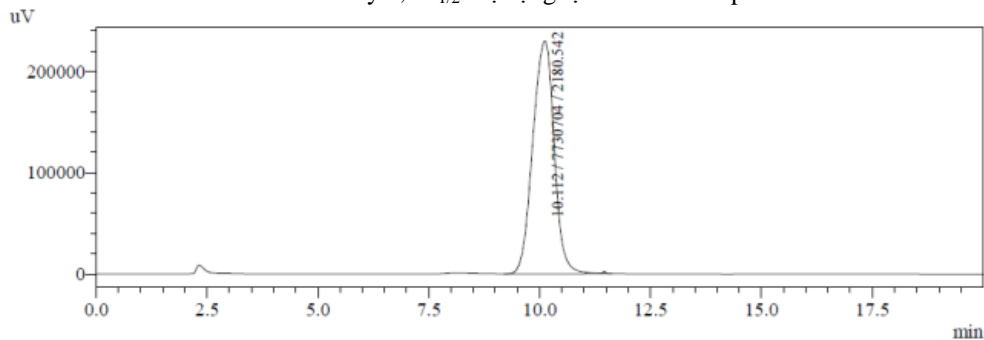
Kết quả khảo sát tỉ lệ pha động với điều kiện thể tích tiêm 20 μ L, tốc độ dòng 0,3 mL/min được thể hiện ở Bảng 3.



Bảng 4 Kết quả khảo sát tỉ lệ pha động acetonitril – acid orthophosphoric 0,05 %

Tỉ lệ pha động	t_R (phút)	T	N	$W_{1/2}$
A: B (100: 0)	2,606	2,064	1 396	0,159
A: B (80: 20)	2,694	1,793	1 291	0,172
A : B (60: 40)	3,397	1,539	1 412	0,210
A : B (40 : 60)	5,970	1,203	1 789	0,339
A : B (30 : 70)	10,112	0,969	2 180	0,527
A : B (20 : 80)	21,344	0,822	2 770	0,962

*A: acetonitril, B: acid orthophosphoric 0,05 %, t_R : thời gian lưu, T: hệ số kéo đuôi, N: số đĩa lí thuyết, $W_{1/2}$: độ rộng tại $\frac{1}{2}$ chiều cao peak.

**Hình 1** Sắc kí đồ mẫu phân lập với pha động 30 % acetonitril

Nhận xét: từ kết quả khảo sát tỉ lệ pha động acetonitril: acid orthophosphoric 0,05 % nhận thấy với pha động 30 % acetonitril cho kết quả peak có hệ số kéo đuôi thấp (0,969), số đĩa lí thuyết lớn (2 180), peak cân đối và có thời gian lưu (t_R) 10,112 phút không quá dài nên tỉ lệ pha động acetonitril – acid

orthophosphoric 0,05 % (30 : 70) được chọn để tiếp tục nghiên cứu.

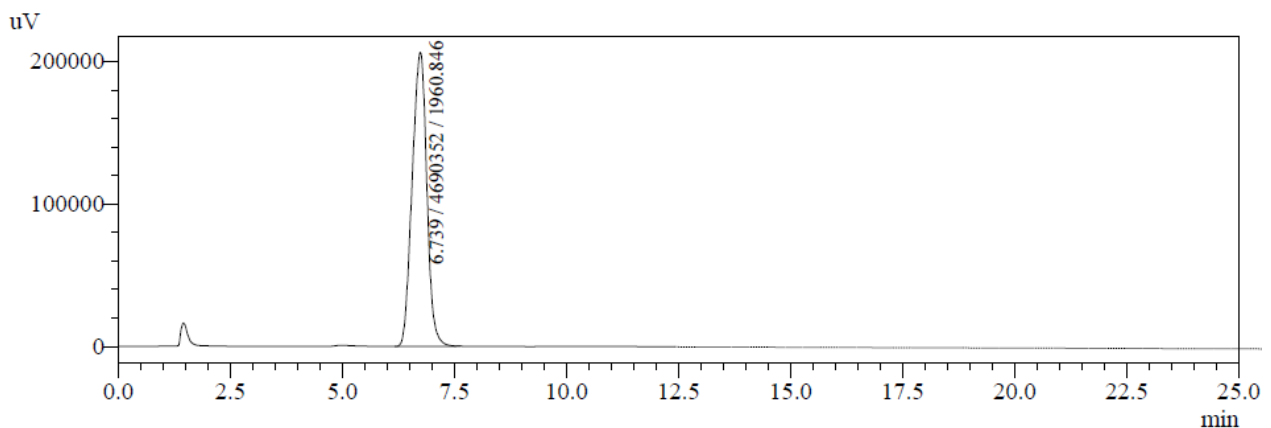
- *Khảo sát tốc độ dòng*

Kết quả khảo sát tốc độ dòng với tỉ lệ pha động A: B (30 : 70), thể tích tiêm mẫu 20 μ L được thể hiện ở Bảng 4.

Bảng 5 Kết quả khảo sát tốc độ dòng

Tốc độ dòng (mL/min)	t_R (phút)	T	N	$W_{1/2}$
0,3	10,112	0,969	2 180	0,527
0,5	6,739	0,996	1 960	0,358

* t_R : thời gian lưu, T: hệ số kéo đuôi, N: số đĩa lí thuyết, $W_{1/2}$: độ rộng tại $\frac{1}{2}$ chiều cao peak.

**Hình 2** Sắc kí đồ của chuẩn phân lập với tốc độ dòng là 0,5 mL/min

Nhận xét: kết quả khảo sát so sánh tốc độ dòng (0,3 và 0,5) mL/min cho hệ số kéo đuôi như nhau, sự chênh lệch số đĩa lí thuyết không đáng kể, nhưng thời gian lưu ở tốc độ dòng 0,5 mL/min nhanh hơn. Do đó, tốc độ dòng là 0,5 mL/min được chọn để thực hiện sắc kí.

- Khảo sát thể tích tiêm mẫu

Kết quả khảo sát thể tích tiêm mẫu với tỉ lệ pha động acetonitril – acid orthophosphoric 0,05 % (30 : 70), tốc độ dòng 0,5 mL/min được thể hiện ở Bảng 6.

Bảng 6 Kết quả khảo sát thể tích tiêm mẫu

Thể tích tiêm mẫu (µL)	t _R (phút)	T	N	W _{1/2}
20	6,645	1,084	2 528	0,333
10	6,670	1,086	3 295	0,213
5	6,699	1,025	7 474	0,178
2	6,720	1,014	8 455	0,167

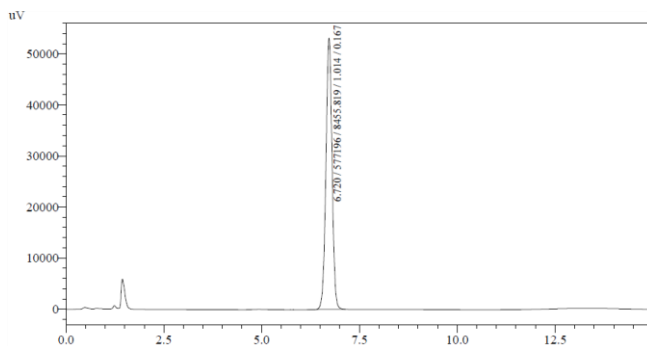
* t_R: thời gian lưu, T: hệ số kéo đuôi, N: số đĩa lí thuyết, W_{1/2}: độ rộng tại ½ chiều cao peak.

Nhận xét: từ kết quả khảo sát thể tích tiêm mẫu nhận thấy với các thể tích tiêm mẫu (20, 10, 5 và 2) µL có thời gian lưu như nhau nhưng ở thể tích tiêm mẫu 2 µL hệ số kéo đuôi thấp, số đĩa lí thuyết cao nên chọn thể tích 2 µL để thực hiện sắc kí.

Bảng 7 Kết quả khảo sát tính tương thích hệ thống

Lần bơm	S	t _R (phút)	H	N	W _{1/2}	T
1	582 435	6,666	54 962	8 680	0,163	1,048
2	584 111	6,675	54 830	8 651	0,164	1,05
3	585 023	6,671	55 089	8 659	0,163	1,05
4	584 952	6,656	55 153	8 638	0,163	1,05
5	584 985	6,645	55 384	8 671	0,163	1,051
6	584 811	6,623	55 508	8 682	0,162	1,051
Trung bình	584 386	6,656	55 154	8 664	0,163	1,050
SD	1 014,65	0,01 947	254,669	17,3 061	0,00 063	0,0 011
RSD (%)	0,17	0,29	0,46	0,20	0,39	0,10

* S: diện tích peak, t_R: thời gian lưu, T: hệ số kéo đuôi, N: số đĩa lí thuyết, H: độ phân giải, W_{1/2}: độ rộng tại ½ chiều cao peak.



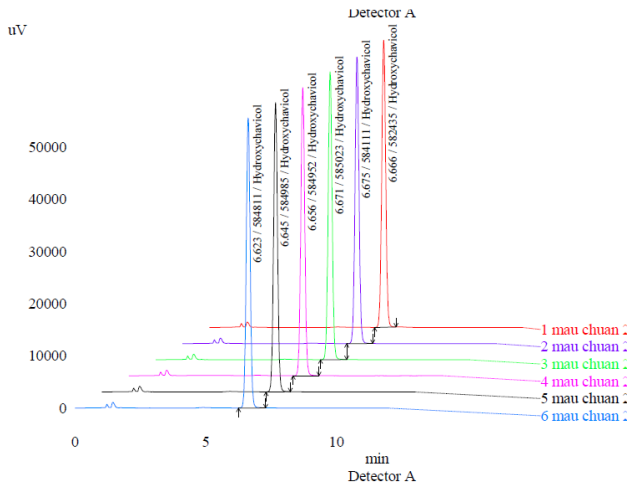
Hình 3 Sắc kí đồ chuẩn phân lập với thể tích tiêm mẫu là 2 µL

Từ những khảo sát, các điều kiện sắc kí lỏng hiệu năng cao được lựa chọn như sau: chế độ rửa giải isocratic, hệ dung môi acetonitril – acid orthophosphoric 0,05 % (30 : 70), tốc độ dòng 0,5 mL/min, thể tích tiêm mẫu 2 µL, bước sóng phát hiện 210 nm.

3.3 Thẩm định quy trình định lượng

- Khảo sát tính tương thích hệ thống

Kết quả khảo sát tính tương thích hệ thống được trình bày ở Bảng 7.



Hình 4 Kết quả khảo sát tính tương thích hệ thống

Nhận xét: các thông số thời gian lưu (t_R), diện tích peak (S), hệ số bất đối (T), độ phân giải (H), số đĩa lý thuyết (N) có $RSD \leq 5\%$ nên quy trình có tính tương thích hệ thống.

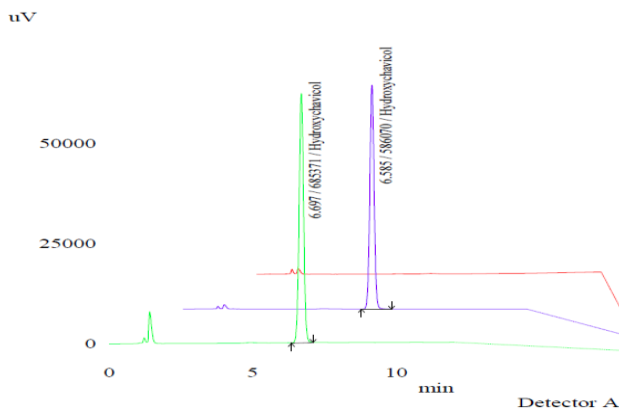
- *Khảo sát tính chọn lọc*

Kết quả khảo sát tính chọn lọc được trình bày ở Bảng 8 và Hình 5.

Bảng 8 Kết quả khảo sát tính chọn lọc

Tên mẫu	Lần 1		Lần 2		Lần 3		Lần 4		Lần 5		Lần 6	
	S	t_R	S	t_R	S	t_R	S	t_R	S	t_R	S	t_R
Dung môi	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Mẫu chuẩn	586 070	6,585										
Mẫu thử	685 371	6,697										
Mẫu thêm chuẩn 1	1 252 180	6,606	1 271 197	6,693	1 254 650	6,692	1 223 056	6,676	1 236 904	6,625	1 235 500	6,606

S: diện tích peak, t_R : thời gian lưu.



Hình 5 Kết quả khảo sát tính chọn lọc (1) dung môi; (2) mẫu chuẩn; (3) mẫu thử

Mẫu chuẩn có 1 peak tại $t_R = 6,585$ phút, khi thêm một lượng mẫu chuẩn phân lập vào mẫu thử, kết quả chiều cao và diện tích peak của hydroxychavicol tăng lên so với trước khi thêm chất chuẩn. Như vậy, quy trình có tính chọn lọc.

- *Xây dựng đường tuyến tính*

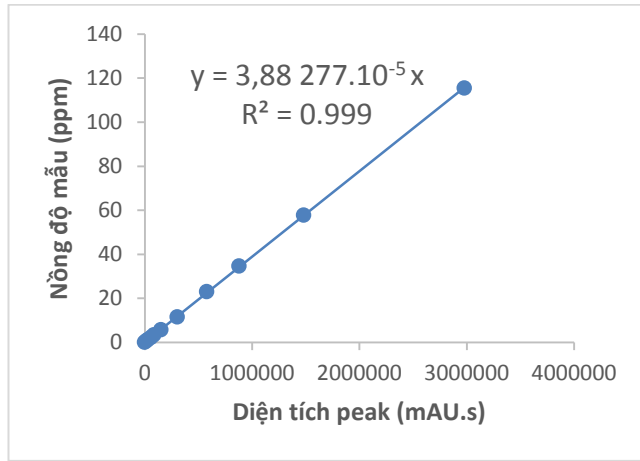
Kết quả xử lý thống kê cho thấy có sự tương quan tuyến tính giữa diện tích peak (S) và nồng độ hydroxychavicol trong khoảng nồng độ (0,5-115,5) ppm ($R^2 = 0,999$).

Bảng 9 Diện tích peak ứng với từng nồng độ mẫu

C, ppm	S	Độ lệch (%)
0	0	
0,58	14 700	0,38
1,16	30 074	2,68
2,31	58 101	0,82
3,465	87 488	0,44
5,775	151 997	3,79
11,55	304 207	3,86
23,1	578 227	1,29
34,65	878 313	0,04
57,75	1 481 026	1,13

115,5	2 979 296	1,72
-------	-----------	------

C: nồng độ mẫu; S: diện tích peak;



Hình 6 Đường tuyến tính biểu diễn sự tương quan nồng độ mẫu và diện tích peak

Nhận xét: dựa vào phần mềm Excel, lập được đường tuyến tính biểu diễn sự tương quan giữa nồng độ và diện tích đỉnh:

Phương trình hồi qui tương quan:

$$y = 3,88\ 277 \times 10^{-5} x + 0,09\ 065$$

Với t-test cho các hệ số $3,88\ 277 \times 10^{-5}$ có ý nghĩa thống kê ($p = 3,6 \times 10^{-20} < 0,05$) và $0,09\ 065$ không có ý nghĩa thống kê ($p = 0,431 > 0,05$). Phương trình có tính tương thích qua phép kiểm F với $p = 3,57 \times 10^{-20} < 0,05$

Hệ số tương quan: $R^2 = 0,999$

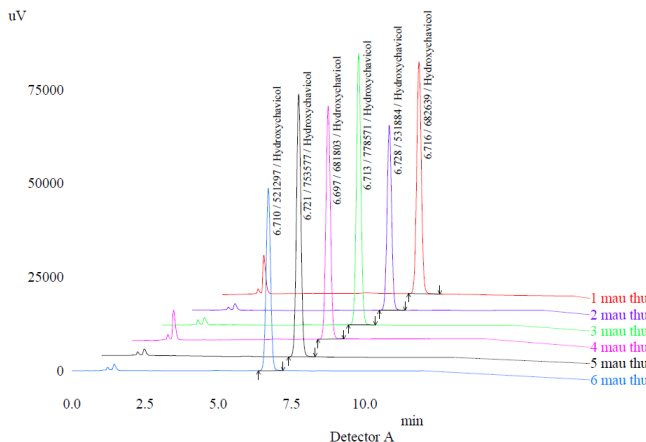
Qua các kết quả phân tích và thống kê ta thấy, tỉ lệ diện tích peak sắc kí và nồng độ phụ thuộc tuyến tính với nhau một cách chặt chẽ với hệ số tương quan cao đạt yêu cầu. Khoảng nồng độ tuyến tính (0,58-115,5) ppm. Do đó, ta có thể sử dụng các phương pháp đường chuẩn hay thêm chuẩn để định lượng hydroxychavicol trong mẫu thử ở khoảng tuyến tính đã khảo sát.

Bảng 10 Kết quả khảo sát độ lặp lại

Mã mẫu	Khối lượng mẫu m (g)	t _R (min)	% RSD của t _R	S	% RSD của S/m
1	0,0 160	6,716	0,156	682 639	1,13
2	0,0 125	6,728			
3	0,0 178	6,713			
4	0,0 161	6,697			
5	0,0 176	6,721			
6	0,0 122	6,710			

- Khảo sát độ lặp lại

Kết quả khảo sát độ lặp lại được thể hiện ở Bảng 10.



Hình 7 Kết quả khảo sát độ lặp lại

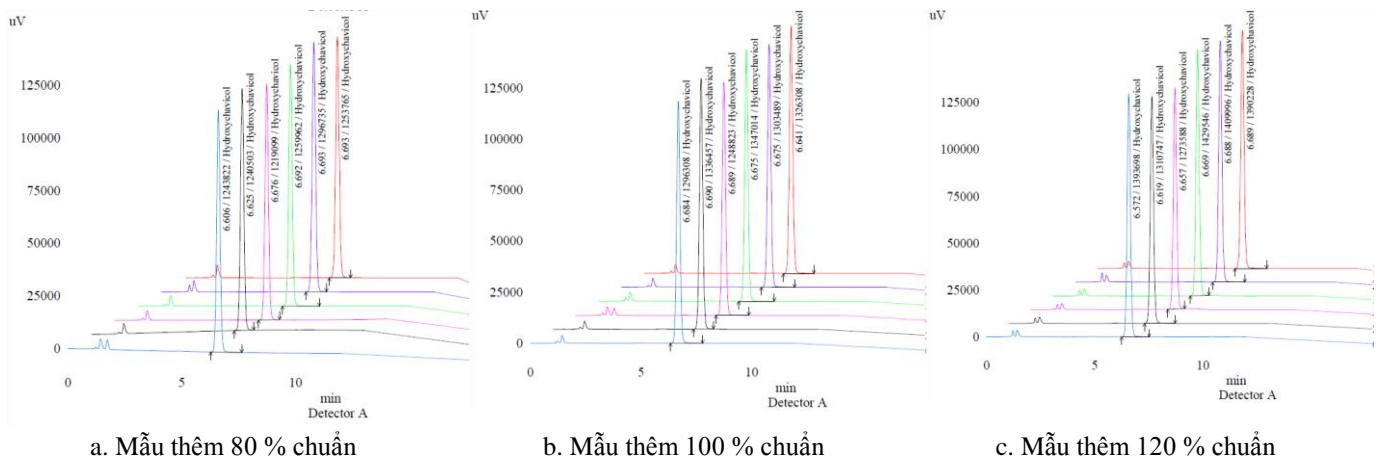
Nhận xét: tiêu chuẩn chấp nhận cho độ lặp lại với nồng độ chất phân tích 100 ppm $RSD \leq 5,3\ %$. Như vậy, quy trình có độ lặp lại được chấp nhận vì có % RSD của S/m là 1,13

- *Khảo sát độ đúng*

Kết quả khảo sát độ đúng của quy trình định lượng thể hiện ở Bảng 11.

Bảng 11 Kết quả khảo sát độ đúng của quy trình định lượng

Mẫu thêm chuẩn (%)	KL mẫu (g)	Nồng độ hydroxychavicol mg/g	Tỉ lệ hồi phục (%)	Giá trị trung bình	RSD (H)	
80	1	0,0 159	1 565	95,0	97,2	3,0
	2	0,0 162	1 588	99,2		
	3	0,0 158	1 580	98,5		
	4	0,0 153	1 585	98,8		
	5	0,0 159	1 554	92,2		
	6	0,0 155	1 592	99,3		
100	1	0,0 159	1 655	95,0	96,1	2,6
	2	0,0 152	1 701	99,2		
	3	0,0 158	1 689	98,5		
	4	0,0 146	1 702	98,8		
	5	0,0 159	1 674	92,2		
	6	0,0 156	1 649	99,3		
120	1	0,0 142	1 940	96,9	94,9	1,9
	2	0,0 148	1 889	91,5		
	3	0,0 147	1 926	95,0		
	4	0,0 131	1 935	96,1		
	5	0,0 135	1 925	94,5		
	6	0,0 144	1 927	95,3		

**Hình 8** Kết quả khảo sát độ đúng

Nhận xét: tiêu chuẩn chấp thuận cho độ đúng với nồng độ chất phân tích 10 ppm là tỉ lệ hồi phục (80-110) %. Như vậy, quy trình phân tích có độ đúng được chấp nhận.

4 Kết luận

Trong nghiên cứu này đã thẩm định quy trình định lượng hydroxychavicol trong cao chiết TrK bằng phương pháp HPLC với đầu dò UV-Vis. Quy trình

định lượng đạt tính tương thích hệ thống, độ đặc hiệu, độ lặp lại, độ đúng, khảo sát được tính tuyến tính của phương pháp. Điều này chứng tỏ đây là quy trình phù hợp để định lượng hydroxychavicol trong cao TrK.

Trên cơ sở đó, chúng tôi đã thực hiện định lượng 6 mẫu cao thu được là (1) 0,0 160 g; (2) 0,0 125 g; (3) 0,0 178 g; (4) 0,0 161 g; (5) 0,0 176 g và (6) 0,122 g. Kết quả hàm lượng hydroxychavicol

trong mỗi mẫu cao theo thứ tự lần lượt là (1) 849 mg/g; (2) 847 mg/g; (3) 870 mg/g; (4) 842 mg/g; (5) 850 mg/g và (6) 850 mg/g. Như vậy, trung bình hàm

lượng hydroxychavicol trong cao chiết nước phân đoạn dicloromethan là 85 %. Do đó việc định lượng hydroxychavicol bằng HPLC tương đối dễ dàng.

Tài liệu tham khảo

1. Đỗ Tất Lợi, (2000), *Những cây thuốc và vị thuốc Việt Nam*, Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật, tr. 151 – 161.
2. Đỗ Huy Bích, Đặng Quang Chung, Bùi Xuân Chương, Nguyễn Thượng Đông, Đỗ Trung Đàm, Phạm Văn Hiến, Vũ Ngọc Lộ, Phạm Duy Mai, Phạm Kim Mãn, Đoàn Thị Nhu, Nguyễn Tập, Trần Toàn (2004), “Cây thuốc và Động vật làm thuốc ở Việt nam”, Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật, tập I.
3. Nguyễn Đình Nga, Nguyễn Văn Thanh, (2010), “Thành phần và tác động kháng Candida spp của tinh dầu và cao chiết từ lá Trầu không Việt Nam”, *Tạp chí Dược học*, (410), tr.27.
4. Phan Thị Thanh Thủy, Nguyễn Mai Hương, Nguyễn Nhật Anh, Nguyễn Đình Nga, (2014), “Khảo sát điều kiện chiết xuất cao trầu không (piper betle L.Piperacea)”, *Tạp chí Y học Tp. Hồ Chí Minh*, 18(2), tr. 251-255.
5. Ali et al, (2010), “*In vitro antifungal activity of hydroxychavicol isolated from Piper betle*”, *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 9(7).
6. Chakraborty, (2011), “*Antimicrobial, anti-oxydative and anti-hemolytic activity of Piper betle leaf extracts*”, *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 3(3), p.192 – 199.
7. Sugumaran, (2011), “*Chemical composition and antimicrobial activity of velaiikody variety of Piper betle Linn leaf oil against dental pathogens*”, *International Journal of PharmTech Research*, 3(4), p.2135 – 2139.
8. Intzar Ali1 and al, (2010), *In vitro antifungal activity of hydroxychavicol isolated from Piper betle L.*, *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 9:7
8. N. Zamakshshari et al, (2021), *Effect of extraction procedure on the yield and biological activities of hydroxychavicol from Piper betle L. Leaves*. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants* (24), 100320
10. KY. Pin, (2010), “*Antioxidant and Anti-inflammatory activities of extracts of betel leaves from solvents with different polarities*”. *Journal of Tropeakal Forest Sciences*, 22(4), pp. 448 – 455.
11. T. Nalia, T and Rahim, Z.H.A, (2006), “*Effect of Piper betle L. leaf extract on the virulence activity of Streptococcus mutans – an in vitro study*”. *Pak. J. Biol. Sci.*, (9), pp. 1470 – 1475.
12. Guideline ICH “Q2A text on validation of Analytical procedures”, Fed Regist., 60.
13. Tripathi S, Verma NK, Singh DP, Chaudhary SK., (2011), *Piper betle: Phytochemistry Traditional Use & Pharmacological Activity – A Review*. *IJPRD*; 4(4):216-223.
14. Pradhan D, Biswasroy P, Suri KA. (2014), *Various factors influencing the percentage content of hydroxychavicol in different extracts of Piper betle L. by altering the extraction parameters*. *IJATR*; 4(2).

The HPLC method development for determination of hydroxychavicol in betel (*Piper Betle* L. piperaceae) extract

Phan Thi Thanh Thuy, Nguyen Dinh Nga
Faculty of Pharmacy, Nguyen Tat Thanh University
ptthuy@ntt.edu.vn

Abstract The betel extract contains hydroxychavicol which was evaluated for antidermatophyte and antibacterial activity. An HPLC procedure was developed for determination of hydroxychavicol in the extracts of betel: column C18 5 μm (2,1 mm x 250 mm), mobile phase – acetonitril : orthophosphoric acid 0.05 % (30 : 70), flow rate of 0.5 mL/min, injection volumn of 2 μL . By validation, the proposed method proved quite adequate compatibility, satisfactory specificity and desirable linearity ($R^2 = 0,999$). The RSD value was 1.12 %, the recovery percentage was 96 %, the detection limit was 0.130 ppm and the quantitation limit was 0.394 ppm. The validated method was used for quantitative analysis hydroxychavicol content in the dichloromethane betel extract (85 %).

Keywords Hydroxychavicol, betel extract, high performance liquid chromatography (HPLC).