



Research Article

Simultaneous determination of picroside I and picroside II in dietary supplements by high performance liquid chromatography with PDA detector

Do Yen Nhi¹, Nguyen Thi Anh Huong¹, Pham Minh Phuong², Trinh Yen Nhi²,

Le Thi Thuy^{2*}, Vu Thi Trang^{2†}

¹Faculty of Chemistry, University of Science, Vietnam National University, Hanoi, Vietnam

²National Institute for Food Control, Hanoi, Vietnam

(Received: 23 May 2024; Revised: 24 Jun 2024; Accepted: 25 Jun 2024)

Abstract

Picroside I and picroside II are two compounds found in the *Picrorhiza Kurroa* plant, which have anti-cirrhosis, antioxidant, anti-inflammatory, fever, and asthma effects, etc. They are included in the ingredients of many dietary supplement products that help protect the liver and bile, prevent oxidation, etc. Therefore, determining the content of these two active ingredients in dietary supplements is necessary to evaluate product quality. In this study, high-performance liquid chromatography (HPLC-PDA) was used to simultaneously determine picroside I and picroside II in dietary supplements. The analytes in the samples were extracted with methanol for 60 min using a horizontal shaking technique. The extract was then filtered and determined by the HPLC–PDA method with the following conditions: C18 Column (250 mm x 4.6 mm; 5 µm) and a corresponding pre-column (3.9 mm x 5 mm; 5 µm), the mobile phase consists of a solvent mixture of acetonitrile and water according to the gradient program, detection wavelength 265 nm. The method has good specificity, the calibration curve of picroside I and picroside II has a linear coefficient $R^2 > 0.9999$ and the repeatability and recovery meet the AOAC requirements. The method limits of detection (MDL) for these two substances were 4.3 mg/kg and 3.2 mg/kg, respectively. The method was applied to simultaneously determine picroside I and picroside II in 30 different dietary supplement products. The results detected analytes in 3 samples positive with picroside I and picroside II concentrations ranging from 98.8 to 148 mg/kg.

Keywords: picroside I, picroside II, high-performance liquid chromatography, HPLC, dietary supplements.

* Corresponding author: Le Thi Thuy (E-mail: lethuynifc@gmail.com)

† Co-corresponding author: Vu Thi Trang (E-mail: trang2103@gmail.com)

Doi: <https://doi.org/10.47866/2615-9252/vjfc.4352>

Copyright © 2024 The author(s). This article is licensed under [CC BY-NC 4.0](https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/)

Xác định đồng thời picroside I và picroside II trong thực phẩm bảo vệ sức khỏe bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao sử dụng detector PDA

Đỗ Yến Nhi¹, Nguyễn Thị Ánh Hoàng¹, Phạm Minh Phương², Trịnh Yến Nhi²,
Lê Thị Thúy², Vũ Thị Trang²

¹Khoa Hóa học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội, Việt Nam

²Viện Kiểm nghiệm an toàn vệ sinh thực phẩm quốc gia, Hà Nội, Việt Nam

Tóm tắt

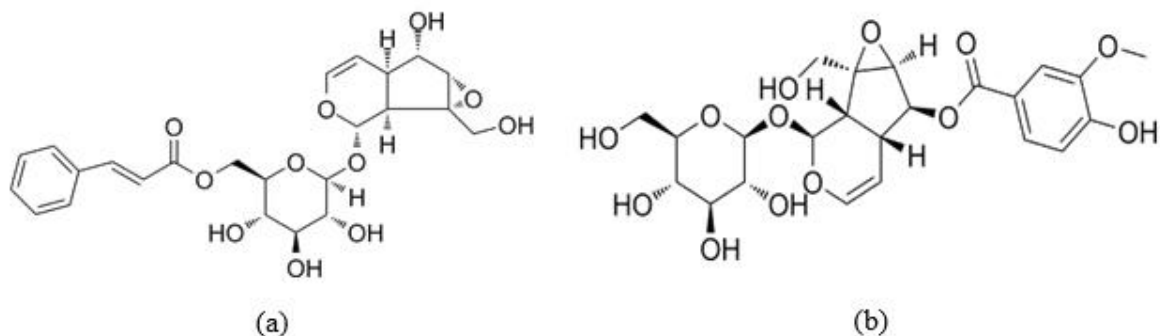
Picroside I và picroside II là hai hợp chất được tìm thấy trong cây *Picrorhiza kurroa*, có tác dụng chống xơ gan, chống oxy hóa, chống viêm, sốt và hen suyễn, vàng da ... Chúng có trong thành phần của nhiều sản phẩm thực phẩm bảo vệ sức khỏe (TPBVSK) giúp bảo vệ gan, mật, chống oxy hóa... Do đó, việc xác định hàm lượng hai hoạt chất này trong các TPBVSK này là cần thiết nhằm đánh giá chất lượng sản phẩm. Trong nghiên cứu này, phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC-PDA) được sử dụng để xác định đồng thời picroside I và picroside II trong TPBVSK. Các chất phân tích trong mẫu được chiết với methanol trong 60 phút sử dụng kỹ thuật lắc cơ học (lắc ngang). Dịch chiết sau đó được lọc và xác định bằng phương pháp HPLC-PDA với các điều kiện: Cột C18 (250 mm x 4,6 mm; 5 μ m) và tiền cột tương ứng (5 mm x 3,9 mm; 5 μ m), pha động gồm hỗn hợp dung môi acetonitril và H₂O theo chương trình gradient, bước sóng phát hiện 265 nm. Phương pháp có độ đặc hiệu tốt, đường chuẩn của picroside I và picroside II có hệ số xác định $R^2 > 0,9999$ và độ lặp lại, độ thu hồi đạt yêu cầu của AOAC. Giới hạn phát hiện của phương pháp (MDL) của hai chất này lần lượt là 4,3 mg/kg và 3,2 mg/kg. Phương pháp đã được áp dụng để xác định đồng thời picroside I và picroside II trong 30 sản phẩm TPBVSK khác nhau. Kết quả đã phát hiện chất phân tích trong 3 mẫu với hàm lượng picroside I và picroside II trong khoảng 98,8-148 mg/kg.

Từ khóa: picroside I, picroside II, sắc ký lỏng hiệu năng cao, HPLC, thực phẩm bảo vệ sức khỏe

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Cùng với sự phát triển của xã hội, nhiều sản phẩm có nguồn gốc tự nhiên đã được đưa ra thị trường để đáp ứng nhu cầu ngày càng cao về chăm sóc sức khỏe của con người, trong đó có khá nhiều sản phẩm TPBVSK. Các TPBVSK thường được sử dụng để phòng ngừa và cải thiện các vấn đề về sức khỏe, đặc biệt là bảo vệ gan, mật, chống oxy hóa... Picroside I và picroside II là hai hợp chất được tìm thấy trong cây *Picrorhiza kurroa*, đây là một cây thuốc có mặt ở vùng núi cao Himalaya từ Kashmir đến Sikkim ở độ cao trung bình 2700 m – 4500 m so với mực nước biển [1], có tác dụng thúc đẩy sản xuất mật, chống xơ gan, chống oxy hóa, chống viêm, sốt và hen suyễn, điều trị ung thư biểu mô tế bào gan, ung thư tuyến tiền liệt và ung thư vú. Picroside I và picroside II (Hình 1) thuộc nhóm dẫn xuất iridoid glycoside, là những monoterpen được sinh tổng hợp từ isoprene và thường xuất hiện dưới

dạng glycoside [2]. Picroside I thường có ở chồi, trong khi picroside II được tìm thấy cao nhất ở thân, rễ, hoa và lá [2]. Các hợp chất này thường có trong thành phần của một số sản phẩm TPBVSK liên quan đến gan và chống oxy hóa.



Hình 1. Công thức cấu tạo của picroside I (a) và picroside II (b)

Việc xác định nguồn gốc và hàm lượng các hoạt chất chính trong TPBVSK là một yêu cầu vô cùng quan trọng và cần thiết nhằm đảm bảo chất lượng sản phẩm. Hiện nay, một số nghiên cứu xác định picroside I và picroside II đã được công bố với các phương pháp như: sắc ký bản mỏng (TLC) [3], sắc ký lỏng với các detector khác nhau như: HPLC-UV/Vis, HPLC-PDA [4, 5, 7], sắc ký lỏng khối phổ (LC-MS/MS) [9]. Do cấu tạo của các chất này có chứa nhiều liên kết đôi, có khả năng hấp thụ vùng tử ngoại - khả kiến nên phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao kết hợp detector chuỗi diod quang (HPLC-PDA) là kỹ thuật ưu tiên sử dụng do tính phổ biến, có độ nhạy, độ chọn lọc và độ chính xác cao. Vì vậy, phương pháp HPLC-PDA được lựa chọn trong nghiên cứu này để xác định đồng thời picroside I và picroside II trong TPBVSK.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu

Các đối tượng của nghiên cứu bao gồm:

- Hai chất phân tích là picroside I và picroside II.
- Các mẫu TPBVSK được mua ngẫu nhiên trên thị trường Hà Nội gồm: Dạng lỏng: 06 mẫu; Dạng nang cứng: 10 mẫu; Dạng nang mềm: 08 mẫu; Dạng cốm: 06 mẫu.

2.2. Hóa chất, chất chuẩn

Các hóa chất sử dụng trong nghiên cứu đều thuộc loại tinh khiết phân tích dùng cho sắc ký lỏng gồm:

- Các chất chuẩn: picroside I từ Chromadex (CAS: 27409-30-9, lot: 00016819-542) độ tinh khiết 99,3%, picroside II từ Chromadex (CAS: 39012-20-9, lot: 00016820-312) độ tinh khiết 99,4%.
- Các hóa chất, dung môi: methanol (MeOH), ethanol (EtOH), acetonitril (ACN) từ Merck, nước (H₂O) dùng cho sắc ký lỏng.
- Dung dịch chuẩn gốc có nồng độ 400 µg/mL được pha trong MeOH. Từ dung dịch chuẩn gốc tiến hành pha loãng trong MeOH thành dung dịch chuẩn làm việc có nồng độ từ 0,5-100 µg/mL. Hỗn hợp chuẩn được chuẩn bị từ các dung dịch chuẩn của từng chất.

2.3. Thiết bị, dụng cụ

Hệ thống sắc ký lỏng hiệu năng cao HPLC (Waters) trang bị detector PDA; cột sắc ký C18 (250 mm x 4,6 mm; 5 μ m) và tiền cột tương ứng (5 mm x 3,9 mm; 5 μ m) cùng các thiết bị, dụng cụ thông thường khác trong phòng thí nghiệm.

2.4. Phương pháp nghiên cứu

2.4.1. Phương pháp lấy mẫu và xử lý mẫu

30 mẫu TPBVSK có công dụng hỗ trợ chức năng gan với các dạng bào chế khác nhau gồm (dạng lỏng, dạng nang cứng, dạng nang mềm và dạng cốm) được mua ngẫu nhiên trên thị trường Hà Nội. Mẫu được đồng nhất kỹ trước khi phân tích. Đối với mẫu dạng lỏng được lắc trộn đều, với mẫu rắn được nghiền mịn trước khi cân. Qua tham khảo tài liệu [8], quy trình xử lý mẫu được đề xuất như sau:

Cân chính xác 0,5 – 2,0 g mẫu đã đồng nhất vào ống falcon 50 mL, thêm 15 mL dung môi chiết, lắc đều, thực hiện quá trình chiết với các kỹ thuật khác nhau trong một thời gian nhất định để thu được hiệu suất chiết tốt nhất. Gạn dịch chiết vào bình định mức 25 mL. Phần cặn được chiết lặp bằng dung môi chiết. Gộp dịch chiết, định mức bằng dung môi chiết. Dung dịch được lọc qua màng lọc trước khi tiêm vào hệ thống HPLC-PDA. Qua tham khảo tài liệu [8, 10], một số yếu tố được khảo sát nhằm tăng hiệu quả chiết gồm: thành phần dung môi chiết mẫu (MeOH, MeOH : H₂O tỉ lệ 1:1, EtOH, EtOH : H₂O tỉ lệ 1:1); kỹ thuật chiết (siêu âm, lắc cơ học (lắc ngang)) và nhiệt độ chiết (25 $\pm$ 5°C), 45°C và 60°C; thời gian chiết (15 phút, 30 phút, 45 phút, 60 phút, 75 phút), số lần chiết mẫu (1 lần, 2 lần, 3 lần).

Các mẫu thu thập để nghiên cứu gồm các TPBVSK dạng lỏng, dạng nang cứng, dạng nang mềm và dạng cốm.

Sử dụng mẫu TPBVSK dạng nang mềm không chứa chất phân tích picroside I và picroside II làm mẫu trắng. Đây là dạng bào chế có thành phần phức tạp và khó xử lý do có các thành phần chất béo nên được lựa chọn để đại diện cho các dạng bào chế khác khi thực hiện các khảo sát. Mẫu trắng được phân tích theo quy trình tương tự mẫu thử.

Các mẫu trắng thêm hỗn hợp dung dịch chuẩn picroside I và II được sử dụng để khảo sát dung môi và kỹ thuật chiết. Các mẫu này được xử lý và phân tích theo quy trình tương tự mẫu thử nhằm đánh giá độ thu hồi để lựa chọn điều kiện chiết mẫu tốt nhất.

2.4.2. Phương pháp phân tích

Phương pháp HPLC - PDA được sử dụng để phân tích đồng thời picroside I và picroside II. Qua tham khảo tài liệu [8], các điều kiện phân tích đồng thời picroside I và picroside II được lựa chọn như sau: detector PDA, cột sắc ký C18 (250 mm x 4,6 mm; 5 μ m) và tiền cột tương ứng (5 mm x 3,9 mm; 5 μ m), nhiệt độ buồng cột: 30°C, tốc độ dòng: 0,8 mL/phút, thể tích tiêm: 10 μ L.

Để thu được hiệu quả phân tách tốt nhất, tiến hành khảo sát thành phần pha động gồm (ACN, H₂O) với chương trình rửa giải gradient.

2.4.3. Phương pháp thẩm định

Phương pháp phân tích được thẩm định các thông số bao gồm: độ đặc hiệu (đánh giá mẫu trắng, mẫu chuẩn, mẫu trắng thêm chuẩn), xây dựng đường chuẩn, xác định giới hạn phát hiện (MDL), giới hạn định lượng (MQL), độ chụm được đánh giá thông qua độ lệch

chuẩn tương đối (RSD%) khi phân tích lặp lại 6 lần ($n = 6$) trên các nền mẫu ở cùng điều kiện phân tích, độ thu hồi được đánh giá bằng cách thêm chuẩn tại ba mức nồng độ trong khoảng nồng độ làm việc của đường chuẩn. Kết quả được đánh giá theo quy định của AOAC [11] ở các mức nồng độ tương ứng.

2.4.4. Phương pháp xử lý số liệu

Các dữ liệu thu được được xử lý bằng phần mềm Microsoft Excel 2019.

Hàm lượng chất phân tích trong mẫu được tính theo công thức:

$$X = C_m \times V \times K / m$$

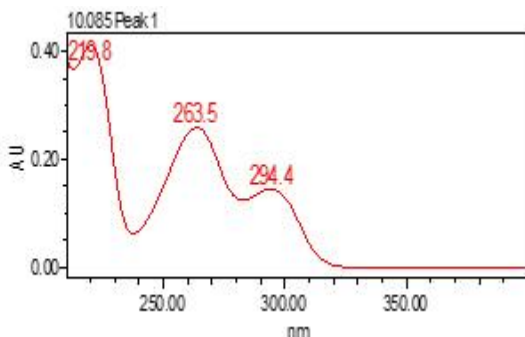
Trong đó: X: hàm lượng picroside I và II trong mẫu (mg/kg); V: thể tích dịch chiết cuối cùng bơm trên thiết bị phân tích (mL); C_m : nồng độ dung dịch chiết mẫu tính theo đường chuẩn ($\mu\text{g/mL}$); m: Khối lượng của mẫu phân tích (g); K: Hệ số pha loãng.

3. KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN

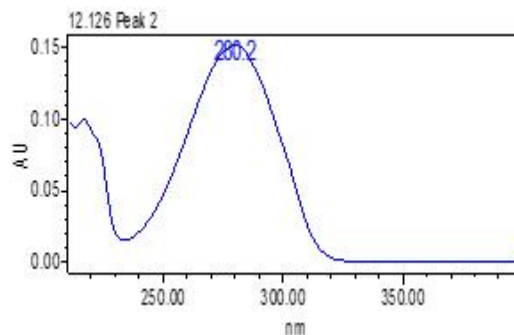
3.1. Khảo sát điều kiện phân tích đồng thời picroside I và picroside II bằng phương pháp HPLC-PDA

3.1.1. Lựa chọn bước sóng phát hiện

Để lựa chọn bước sóng cho phân tích đồng thời picroside I và picroside II sử dụng detector PDA, quét phổ tử ngoại khả kiến (UV-Vis) của hai chất nghiên cứu trong khoảng 190 – 800 nm, từ đó lựa chọn được cực đại hấp thụ của mỗi chất. Kết quả thể hiện trong Hình 2, 3.



Hình 2. Phổ hấp thụ của picroside I



Hình 3. Phổ hấp thụ của picroside II

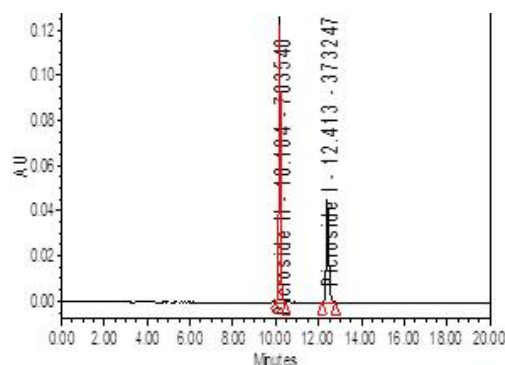
Từ kết quả ở Hình 2 và 3 cho thấy, picroside I và picroside II có phổ hấp thụ cực đại tương ứng tại bước sóng 265 nm và 281 nm. Để giảm ảnh hưởng của dung môi và tạp chất nhưng vẫn đảm bảo được độ nhạy của phương pháp và thuận lợi cho quá trình xử lý kết quả, bước sóng 265 nm được lựa chọn để xác định đồng thời hai chất này.

3.1.2. Khảo sát thành phần pha động và chương trình rửa giải gradient

Trong phương pháp sắc ký, bên cạnh pha tĩnh thì pha động cũng là một yếu tố ảnh hưởng lớn đến hiệu quả tách. Qua tham khảo tài liệu [10], các dung môi pha động được lựa chọn khảo sát gồm ACN, H_2O theo chương trình rửa giải gradient nêu trong Bảng 1. Kết quả sắc đồ thể hiện trong Hình 4.

Bảng 1. Chương trình gradient pha động

Thời gian (phút)	H ₂ O (%)	ACN (%)
0	85	15
1	85	15
6	70	30
10	70	30
15	85	15
18	85	15

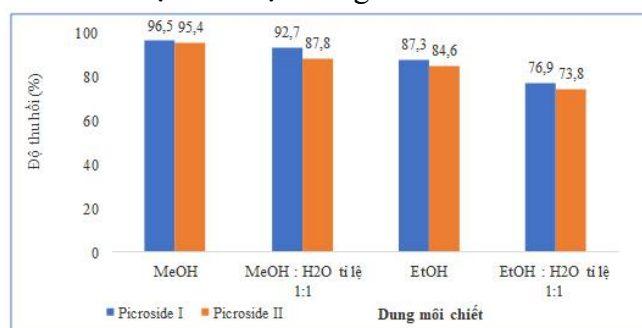
**Hình 4.** Sắc ký đồ chuẩn picroside I và picroside II theo chương trình gradient

Từ kết quả thu được cho thấy, khi sử dụng hỗn hợp dung môi gồm ACN và H₂O theo chương trình gradient nêu trong Bảng 1 thì các chất phân tích có độ phân giải rất tốt ($R_s = 4,1$), pic nhọn, cân đối (hệ số đối xứng As của picroside I = 1,0035 và picroside II = 1,0028), phù hợp để xác định đồng thời hai chất picroside I và picroside II trong mẫu TPBVSK bằng phương pháp HPLC-PDA. Do đó, dung môi pha động ACN và H₂O với chương trình gradient này được lựa chọn cho các khảo sát tiếp theo.

3.2. Khảo sát điều kiện xử lý mẫu nhằm phân tích đồng thời picroside I và picroside II trong TPBVSK bằng phương pháp HPLC-PDA

3.2.1. Khảo sát dung môi chiết

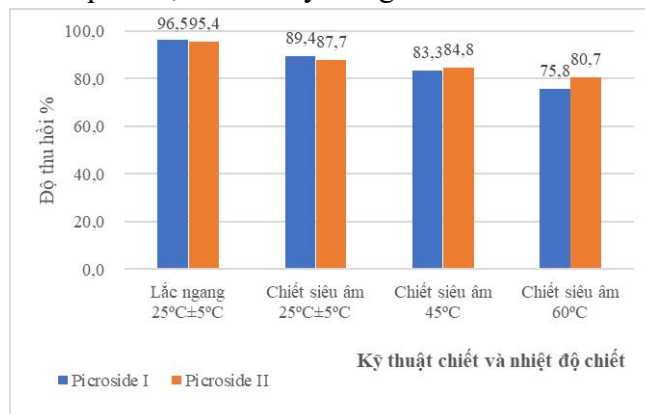
Qua tham khảo tài liệu [7], các dung môi chiết được lựa chọn để khảo sát gồm: MeOH, EtOH, MeOH:H₂O và EtOH:H₂O tỉ lệ 1:1. Việc khảo sát được thực hiện trên nền mẫu viên nang mềm. Kết quả khảo sát được thể hiện trong Hình 5.

**Hình 5.** Kết quả khảo sát dung môi chiết

Kết quả ở Hình 5 cho thấy, hàm lượng của picroside I và picroside II thu được khi sử dụng MeOH cho kết quả cao nhất (tương ứng là 96,5% và 95,4%). Do đó, dung môi MeOH được lựa chọn để thực hiện các khảo sát tiếp theo.

3.2.2. Khảo sát kỹ thuật chiết và nhiệt độ chiết

Kỹ thuật chiết và nhiệt độ chiết là các yếu tố ảnh hưởng nhiều đến khả năng phân tán, độ tan và khả năng tách, chiết các chất phân tích ra khỏi nền mẫu. Các điều kiện chiết sử dụng kỹ thuật lắc ngang ở nhiệt độ phòng ($25 \pm 5^\circ\text{C}$), chiết siêu âm ở nhiệt độ phòng ($25 \pm 5^\circ\text{C}$), 45°C và 60°C đã được lựa chọn để khảo sát. Các thí nghiệm được thực hiện với thời gian chiết là 60 phút. Kết quả được trình bày trong Hình 6.

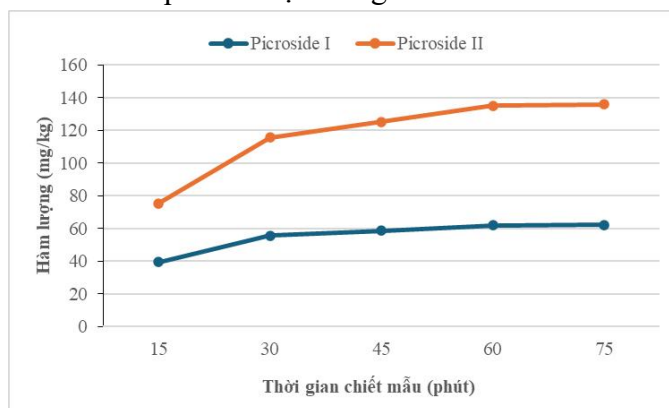


Hình 6. Kết quả khảo sát kỹ thuật chiết và nhiệt độ chiết mẫu

Kết quả ở Hình 6 cho thấy, hàm lượng picroside I và picroside II thu được khi sử dụng kỹ thuật lắc ngang ở nhiệt độ phòng ($25 \pm 5^\circ\text{C}$) cho kết quả cao nhất (độ thu hồi $\geq 95,4\%$). Do đó, kỹ thuật lắc ngang ở nhiệt độ phòng được sử dụng cho những khảo sát tiếp theo.

3.2.3. Khảo sát thời gian chiết

Thời gian chiết ảnh hưởng nhiều đến hiệu quả chiết các chất phân tích ra khỏi nền mẫu. Các mức thời gian chiết khác nhau: 15 phút, 30 phút, 45 phút, 60 phút, 75 phút đã được thực lựa chọn để khảo sát. Kết quả thể hiện trong Hình 7.

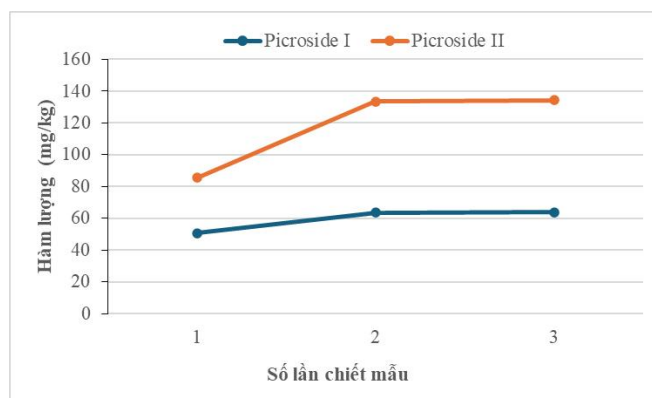


Hình 7. Kết quả khảo sát thời gian chiết

Kết quả trong Hình 7 cho thấy, hàm lượng picroside I và II tăng dần khi tăng thời gian chiết mẫu từ 15 đến 60 phút và thay đổi không đáng kể khi tăng thời gian chiết lên 75 phút. Vì vậy, thời gian chiết 60 phút được lựa chọn cho các khảo sát tiếp theo.

3.2.4. Khảo sát số lần chiết lặp

Chiết lặp là một cách để đảm bảo lấy được tối đa chất phân tích ra khỏi nền mẫu. Các giá trị chiết lặp 1 lần, 2 lần, 3 lần đã được lựa chọn để khảo sát. Kết quả được trình bày trong Hình 8.



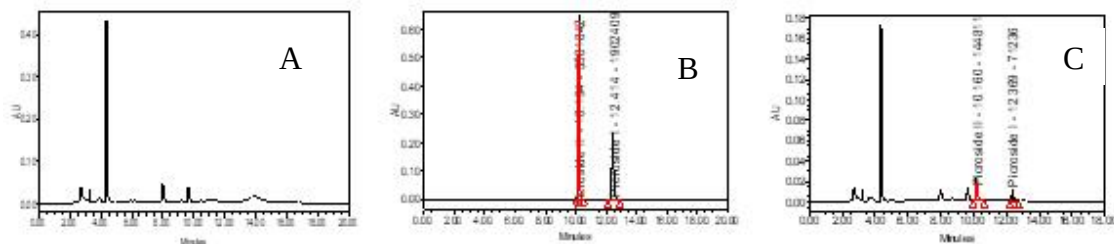
Hình 8. Kết quả khảo sát số lần chiết mẫu

Kết quả ở Hình 8 cho thấy, đối với cả picroside I và picroside II, hàm lượng chất phân tích tăng lên khi chiết lặp 2 lần và thay đổi không đáng kể khi chiết lặp 3 lần. Do đó, để tiết kiệm thời gian cũng như đảm bảo hiệu quả chiết, chiết lặp 2 lần được lựa chọn trong nghiên cứu này.

3.3. Thẩm định phương pháp

3.3.1. Độ đặc hiệu

Độ đặc hiệu được đánh giá thông qua phân tích các mẫu trắng, dung dịch chuẩn (mẫu chuẩn) và mẫu trắng thêm chuẩn. Kết quả được thể hiện trong Hình 9.



Hình 9. Kết quả khảo sát độ đặc hiệu (A: mẫu trắng; B: mẫu chuẩn và C: mẫu trắng thêm chuẩn)

Kết quả phân tích trong Hình 9 cho thấy, mẫu trắng không cho tín hiệu của chất phân tích, mẫu chuẩn và mẫu trắng thêm chuẩn cho tín hiệu với thời gian lưu tương đồng. Như vậy, phương pháp có độ đặc hiệu đạt theo yêu cầu [11].

3.3.2. Xây dựng đường chuẩn, xác định giới hạn phát hiện (MDL) và giới hạn định lượng của phương pháp (MQL)

Đường chuẩn xác định picroside I và picroside II được xây dựng trong khoảng nồng độ từ 0,50 mg/L đến 100 mg/L. MDL và MQL của phương pháp được xác định bằng cách phân tích mẫu trắng thêm chuẩn ở mức nồng độ thấp (khoảng 5-7 lần MDL ước lượng) với giá trị $4 \leq R \leq 10$ [11]. Kết quả đường chuẩn và MDL, MQL của phương pháp được thể hiện trong Bảng 2.

Bảng 2. Kết quả phương trình đường chuẩn, MDL, MQL của phương pháp

Chất phân tích	Phương trình đường chuẩn	Hệ số tương quan R ²	MDL (mg/kg)	MQL (mg/kg)	R
Picroside I	$y = 37556x - 227,24$	0,9999	4,3	14,2	4,8
Picroside II	$y = 71534x - 2923,8$	1,0000	3,2	10,8	9,4

Kết quả ở Bảng 2 cho thấy, các đường chuẩn xác định picroside I và picroside II có hệ số tương quan lần lượt là $R^2 = 0,9999$ và $R^2 = 1,0000$, chứng tỏ giữa tín hiệu thu được và nồng độ chất phân tích có mối quan hệ tuyến tính chặt chẽ. Giá trị MDL của hai chất này lần lượt là 4,3 mg/kg và 3,2 mg/kg, MQL lần lượt là 14,2 mg/kg và 10,8 mg/kg với giá trị R đạt yêu cầu theo AOAC [11].

3.3.3. Độ chụm và độ đúng của phương pháp

Độ chụm của phương pháp được đánh giá qua độ lặp lại (độ lệch chuẩn tương đối RSD %, n = 6) và độ đúng được đánh giá qua độ thu hồi R%. Quá trình thẩm định được thực hiện trên 04 nền mẫu TPBVSK khác nhau: dạng lỏng, dạng nang mềm, dạng nang cứng và dạng cốm. Kết quả được thể hiện trong Bảng 3.

Bảng 3. Kết quả đánh giá độ chụm và độ đúng của phương pháp

Nền mẫu	Hàm lượng chất phân tích (mg/kg)		Độ chụm (RSD%)		Độ đúng (R%)	
	Picroside I	Picroside II	Picroside I	Picroside II	Picroside I	Picroside II
TPBVSK dạng lỏng	23,6-47,4	25,1-50,9	3,9	1,3	89,6-95,3	91,3-102
TPBVSK dạng nang mềm	148-342	48,6-309	5,5	7,3	90,4-94,5	82,3-95,9
TPBVSK dạng nang cứng	143-300	170-343	1,9	4,4	92,5-95,0	92,3-104
TPBVSK dạng cốm	23,0-50,6	24,5-50,6	2,5	3,4	85,5-100	85,2-98,4
Quy định	Nồng độ 10 ppm		$\leq 7,3$		80-110	
AOAC [11]	Nồng độ 100 ppm		$\leq 5,3$		90-107	

Kết quả trong Bảng 3 cho thấy, phương pháp có độ chụm và độ đúng đạt yêu cầu theo AOAC [11]. Phương pháp phù hợp để phân tích hai chất picroside trên các nền mẫu TPBVSK.

3.4. Phân tích đồng thời hàm lượng picroside I và picroside II trong mẫu TPBVSK

Phương pháp sau khi thẩm định đáp ứng yêu cầu của AOAC đã được áp dụng để phân tích đồng thời hàm lượng picroside I và picroside II trong 30 mẫu TPBVSK với các dạng bào chế khác nhau gồm: dạng lỏng (6 mẫu), dạng nang cứng (10 mẫu), dạng nang mềm (8 mẫu) và dạng cốm (6 mẫu). Mỗi mẫu phân tích lặp lại 3 lần và lấy giá trị trung bình.

Kết quả phân tích cho thấy, picroside I và picroside II được phát hiện đồng thời trong 02 mẫu (với hàm lượng tương ứng là 98,8 và 119 mg/kg trong mẫu nang mềm, 148 và 75,6 mg/kg trong mẫu nang cứng) và picroside II trong 1 mẫu nang cứng với hàm lượng là 126 mg/kg. Các mẫu còn lại đều không phát hiện cả hai chất picroside I và picroside II. Kết quả này cho thấy tiềm năng ứng dụng của phương pháp trong xác định đồng thời hàm lượng picroside I và picroside II trong mẫu TPBVSK, góp phần đảm bảo chất lượng sản phẩm.

4. KẾT LUẬN

Nghiên cứu đã thành công trong việc xây dựng quy trình phân tích đồng thời picroside I và picroside II trong TPBVSK bằng phương pháp HPLC-PDA. Phương pháp đã được thẩm định các thông số đường chuẩn, độ đặc hiệu, độ đúng, độ chụm, MDL, MQL đạt yêu cầu của AOAC. Quy trình phân tích đã được áp dụng để phân tích đồng thời hai chất trên trong 30 mẫu TPBVSK khác nhau. Kết quả đã phát hiện các chất này có trong một số mẫu TPBVSK dạng nang mềm và dạng nang cứng. Các kết quả phân tích cho thấy phương pháp có thể áp dụng để xác định đồng thời picroside I và picroside II trong các mẫu TPBVSK.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1]. P. R. Thani, Y. P. Sharma, P. Kandel and K. Nepal, "Standardization of Extraction Techniques of Picroside-I and Picroside-II from "Kutki" (Picrorhiza kurroa Royle ex Benth.)," *Global Journal of Science Frontier Research: C Biological Science*, vol. 8, pp. 51-56, 2018.
- [2]. S. Pandit, K. Shitiz, H. Sood, P. K. Naik and R. S. Chauhan, "Expression pattern of fifteen genes of non-mevalonate (MEP) and mevalonate (MVA) pathways in different tissues of endangered medicinal herb Picrorhiza kurroa with respect to picrosides content," *Molecular Biology Reports*, vol. 40, pp. 1053-1063.
- [3]. S. S. Tiwari, M. M. Pandey, S. Srivastava and A. K. S. Rawat, "TLC densitometric quantification of picrosides (picroside-I and picroside-II) in Picrorhiza kurroa and its substitute Picrorhiza scrophulariiflora and their antioxidant studies," *Biomedical Chromatography*, vol. 26, no. 1, pp. 61–68, 2011.
- [4]. D. Upadhyay, R. P. Dash, S. Anandjiwala and M. Nivsarkar, "Comparative pharmacokinetic profiles of picrosides I and II from kutkin, Picrorhiza kurroa extract and its formulation in rats," *Fitoterapia*, vol. 85, pp. 76–83, 2013.

- [5]. S. Cheng, J. Huang and J. He, “Development and validation of an accurate HPLC method for the quantitative determination of picroside II in tablets,” *Pharmaceutical Sciences*, vol. 62, no. 8, pp. 577-9, 2007.
- [6]. J. Zhu, B. Xue, B. Ma, et al., “A pre-clinical pharmacokinetic study in rats of three naturally occurring iridoid glycosides, Picroside-I, II and III, using a validated simultaneous HPLC–MS/MS assay,” *Journal of Chromatography B*, vol. 993-994, pp. 47-59.
- [7]. F. C. Yang, S. L. Yang and L. Z. Xu, “Determination of picroside II in dog plasma by HPLC and its application in a pharmacokinetics study,” *Biomedical Chromatography*, vol. 19, pp. 279-84, 2005.
- [8]. S. Cheng, J. Huang and J. He, “Development and validation of an accurate HPLC method for the quantitative determination of picroside II in tablets,” *Die Pharmazie-An International Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 62, pp. 577-9, 2007.
- [9]. Q. Shen, W. Dong, Y. Wang, L. Gong, Z. Dai and H. Y. Cheung, “Pipette tip solid-phase extraction and ultra-performance liquid chromatography/mass spectrometry based rapid analysis of picrosides from *Picrorhiza scrophulariiflora*,” *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, vol. 80, pp. 136–140, 2013.
- [10]. S. Zahiruddin, W. Khan, R. Nehra, M. J. Alam, M. N. Mallick, R. Parveen and S. Ahmad, “Pharmacokinetics and comparative metabolic profiling of iridoid enriched fraction of *Picrorhiza kurroa* – An Ayurvedic Herb,” *Journal of ethnopharmacology*, vol. 197, pp. 157–164, 2017.
- [11]. AOAC Official Methods of Analysis, *Appendix F: Guidelines for standard method performance requirements*, 2012.