

XÁC ĐỊNH ĐỒNG THỜI HÀM LƯỢNG RUTIN, HESPERIDIN, QUERCETIN TRONG THỰC PHẨM BẢO VỆ SỨC KHỎE DẠNG RẮN BẰNG PHƯƠNG PHÁP SẮC KÝ LỎNG HIỆU NĂNG CAO

Nguyễn Thị Thanh Phương, Nguyễn Thị Hồng Hạnh*, Đàm Thị Thu

Trung tâm Kiểm nghiệm Thuốc, Mỹ phẩm, Thực phẩm Hà Nội

(Ngày đến tòa soạn: 20/01/2020; Ngày sửa bài sau phản biện: 28/02/2020; Ngày chấp nhận đăng: 14/03/2020)

Tóm tắt

Nghiên cứu thực hiện xác định đồng thời hàm lượng rutin, hesperidin, quercetin trong một số mẫu thực phẩm bảo vệ sức khỏe dạng rắn bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao. Điều kiện sắc ký sử dụng cột Agilent Zorbax Eclipse XDB C18 (250 x 4,6 mm; 5 µm); detector DAD ở bước sóng 280 nm với hesperidin, 254 nm với rutin và quercetin; pha động: acetonitril - dung dịch acid phosphoric 0,1% (gradient). Phương pháp có giá trị giới hạn định lượng nhỏ (0,02/100 g chế phẩm với rutin, 0,05/100 g chế phẩm với hesperidin và 0,01/100 g chế phẩm với quercetin); độ đúng trong khoảng 97,0 - 101,33%; độ lặp lại với giá trị RSD % nhỏ (1,11 - 1,92%). Ứng dụng phương pháp xác định hàm lượng các chất phân tích trong 20 mẫu thực phẩm bảo vệ sức khỏe, kết quả cho thấy phương pháp có độ chọn lọc và độ tin cậy, đáp ứng yêu cầu.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Rutin và quercetin là thành phần flavonoid chính có trong dược liệu hoa hòe, hesperidin là flavonoid chính có trong dược liệu trần bì, được sử dụng rộng rãi trong các sản phẩm thuốc đông dược và thực phẩm bảo vệ sức khỏe (TPBVSK) [1]. Các sản phẩm TPBVSK này có công dụng hỗ trợ điều trị các bệnh mãn tính của xã hội hiện đại như tăng cholesterol máu, huyết áp cao, bệnh trĩ và suy tĩnh mạch mạn tính [1-6]. Đặc biệt, hiện nay tỉ lệ người có nguy cơ mắc và mắc các bệnh này ngày càng gia tăng [5]. Nhiều loại TPBVSK chứa hoa hòe, trần bì kết hợp với các thành phần dược liệu khác được bán rộng rãi trên thị trường chủ yếu ở dạng viên nén, viên nang dễ sử dụng, do đó việc kiểm soát chất lượng các sản phẩm đó là cần thiết. Tuy nhiên, hiện nay Việt Nam chưa có nghiên cứu nào định lượng đồng thời hàm lượng rutin, quercetin, hesperidin trong các sản phẩm TPBVSK chứa hoa hòe, trần bì mà chỉ có các chuyên luận riêng cho từng dược liệu trong Dược điển [2-3]. Vì vậy, để góp phần vào công tác kiểm soát chất lượng sản phẩm chứa hoa hòe, trần bì, chúng tôi tiến hành nghiên cứu xác định đồng thời hàm lượng rutin, hesperidin và quercetin trong một số TPBVSK dạng rắn chứa hoa hòe và trần bì bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao với detector DAD.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Thiết bị, dụng cụ và hóa chất

2.1.1. Thiết bị và dụng cụ

Các thiết bị được hiệu chuẩn theo yêu cầu ISO/IEC 17025 và GLP.

- Thiết bị: Hệ thống sắc ký lỏng Shimadzu - LC - 2030C 3D Plus (Nhật) với detector DAD; hệ thống sắc ký lỏng Shimadzu SPD M20A/RF 20A với detector PDA.
- Cân phân tích Sartorius CP224S, độ chính xác $d = 0,1$ mg.
- Máy rung siêu âm.
- Các dụng cụ thủy tinh cần thiết.

2.1.2. Hóa chất, chất chuẩn

- Chất chuẩn: Rutin hàm lượng: 88,2% $C_{27}H_{30}O_{16}$ (nguyên trạng), SKS: QT152050417;

*Điện thoại: 0987980874 Email: chemvietchien@gmail.com

Nguồn gốc: Viện Kiểm nghiệm thuốc Thành phố Hồ Chí Minh.

Hesperidin hàm lượng: 95,0 % $C_{28}H_{34}O_{15}$ (nguyên trạng), SKS: 010808; Nguồn gốc: Viện Kiểm nghiệm Thuốc TW.

Quercetin, hàm lượng: 90,87 % $C_{15}H_{10}O_7$ (nguyên trạng), SKS: 0216322.02; Nguồn gốc: Viện Kiểm nghiệm Thuốc TW.

- Dung môi, hóa chất: acetonitril, acid phosphoric, methanol, đạt tiêu chuẩn tinh khiết dùng cho HPLC.

2.2. Mẫu nghiên cứu

- *Mẫu thử trong thẩm định phương pháp*: Mẫu TPBVSK chứa 70 mg cao hoa hòe, 40 mg cao trần bì, kết hợp cùng nhiều dược liệu khác như đương quy, sài hồ, đảng sâm, bạch truật, hoàng kỳ, thăng ma, sinh khương, đại táo và tá dược lactose, bột talc trong công thức bào chế một viên nang cứng.

- *Mẫu trắng*: Mẫu được trộn theo công thức mẫu thử trên nhưng không chứa thành phần hoa hòe và trần bì.

- *Mẫu thử trong ứng dụng phương pháp*: 20 mẫu TPBVSK chứa hoa hòe, trần bì dạng viên nang cứng, viên nén, dạng bột được thu thập ngẫu nhiên trên thị trường.

2.3. Phương pháp nghiên cứu

2.3.1. Điều kiện sắc ký

- Cột sắc ký: Agilent Zorbax Eclipse XDB C18 (250 x 4,6 mm; 5 μ m).

- Pha động: Hỗn hợp gồm acetonitrile và acid phosphoric 0,1% được phối hợp theo chương trình dung môi dưới đây.

Bảng 1. Chương trình dung môi

<i>Thời gian (phút)</i>	<i>Acid phosphoric 0,1 % (% v : v)</i>	<i>Acetonitril (% v : v)</i>
0 - 15	90 → 80	10 → 20
15 - 50	80 → 30	20 → 70
50 - 60	30 → 0	70 → 100
60 - 65	90	10

- Tốc độ dòng: 1,0 mL/phút.

- Detector: DAD bước sóng 280 nm đối với hesperidin, ở 254 nm đối với rutin và quercetin.

- Thể tích tiêm: 10 μ L.

2.3.2. Chuẩn bị các dung dịch chuẩn và thử

Hàm lượng rutin trong hoa hòe chiếm từ 15 - 30%, quercetin chiếm khoảng 0,6%; hesperidin chiếm khoảng 3,5% trong trần bì [1-4]. Vì vậy, để đảm bảo các mẫu phân tích đều nằm trong khoảng xác định của phương pháp, chúng tôi tiến hành xây dựng đường chuẩn của các chất phân tích với khoảng nồng độ như sau:

- *Dung dịch chuẩn*: Pha dung dịch chuẩn hỗn hợp chứa rutin, hesperidin và quercetin trong methanol có khoảng nồng độ làm việc mỗi chất được trình bày tại bảng 2.

Bảng 2. Khoảng nồng độ làm việc của rutin, hesperidin và quercetin

Dung dịch	Nồng độ (µg/ml)		
	Rutin	Hesperidin	Quercetin
1	1,0	5,0	1,0
2	20,0	10,0	10,0
3	50,0	20,0	20,0
4	100,0	50,0	50,0
5	200,0	100,0	100,0
6	500,0	200,0	200,0

- *Dung dịch thử:* Đồng nhất mẫu thử, nghiền mẫu thử thành bột mịn. Cân chính xác khoảng 0,2 g bột mẫu thử, cho vào bình định mức 50 mL. Thêm khoảng 30 mL methanol, rung siêu âm trong 15 phút, để nguội, thêm methanol vừa đủ đến vạch, lắc đều. Lọc qua màng lọc 0,45 µm.

2.3.3. Phương pháp tính kết quả

Xác định nồng độ rutin hoặc hesperidin hoặc quercetin có trong các mẫu thử dựa vào diện tích pic của rutin, hesperidin, quercetin thu được từ sắc đồ của mẫu thử và đường chuẩn biểu thị mối tương quan giữa nồng độ các chất phân tích có trong các mẫu chuẩn với diện tích pic tương ứng của các chất phân tích của mẫu chuẩn.

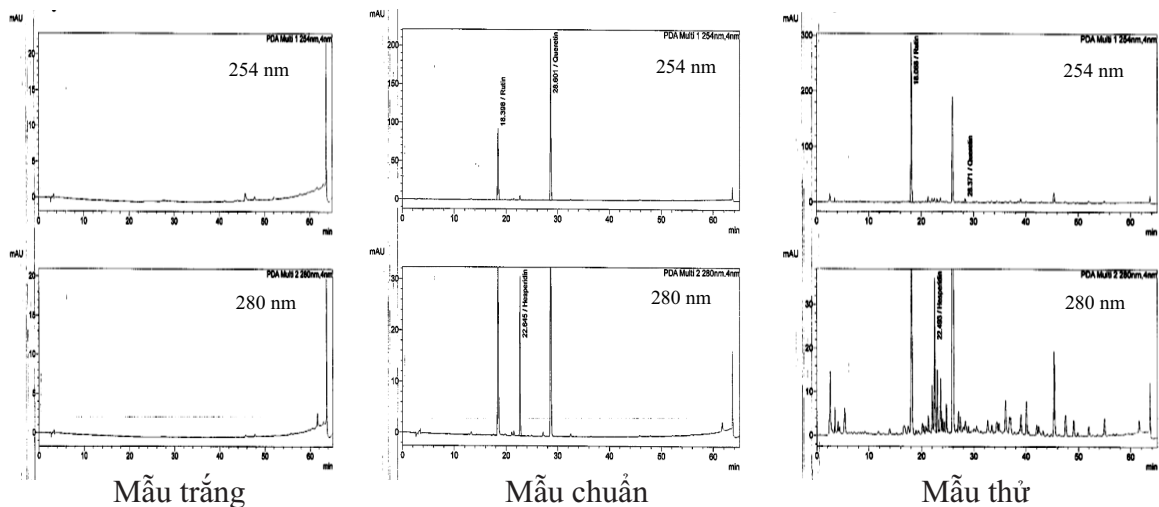
III. KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN

3.1. Xác nhận giá trị sử dụng của phương pháp

Qua tham khảo các tài liệu [2-5] và những kinh nghiệm trong quá trình phân tích các sản phẩm thuốc đông dược chứa hoa hòe và trần bì được gửi đến Trung tâm Kiểm nghiệm Thuốc, Mỹ phẩm, Thực phẩm Hà Nội, chúng tôi lựa chọn điều kiện sắc ký và quy trình xử lý mẫu được lựa chọn theo mục 2.2 và 2.3. Tuy nhiên để xác định được sự phù hợp của phương pháp đối với nền mẫu là TPBVSK và điều kiện phòng thí nghiệm, chúng tôi tiến hành nghiên cứu xác nhận giá trị sử dụng của phương pháp theo các yêu cầu của AOAC về thẩm định phương pháp. Kết quả đạt được như sau:

3.1.1. Độ đặc hiệu

Tiến hành phân tích các mẫu trắng; mẫu chuẩn và mẫu thử chứa các chất phân tích theo phương pháp đã xây dựng. Kết quả được thể hiện trong hình 1.



Hình 1. Sắc ký đồ phân tích mẫu trắng, mẫu chuẩn và mẫu thử

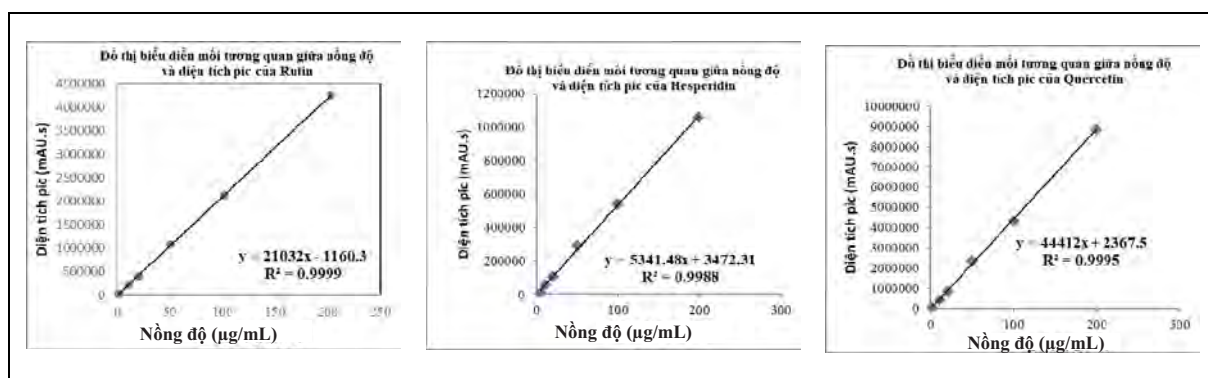
Trên sắc ký đồ của mẫu chuẩn xuất hiện pic tại các thời điểm 18,4 phút của rutin, 22,6 của hesperidin và 28,6 của quercetin. Sắc ký đồ của mẫu thử không xuất hiện pic tại thời điểm trên. Sắc ký đồ mẫu thử cho pic có thời gian lưu tương ứng với các pic trên sắc ký đồ của dung dịch chuẩn. Phổ UV các chất phân tích trên sắc ký đồ dung dịch thử tương tự các chất trên sắc ký đồ của dung dịch chuẩn với hệ số match của hesperidin đạt 99,8%, quercetin đạt 99,6% và của rutin đạt 99,9%. Do vậy, phương pháp phân tích có độ đặc hiệu và chọn lọc với hesperidin, quercetin và rutin để phân tích các chất này trong chế phẩm.

3.1.2. Khoảng xác định

Phân tích các mẫu chuẩn hỗn hợp theo quy trình đã xây dựng. Xác định sự tương quan giữa nồng độ các chất phân tích có trong mẫu và diện tích pic tương ứng thu được trên sắc ký đồ bằng phương pháp hồi qui tuyến tính. Kết quả xác định mối tương quan này được trình bày ở Bảng 3 và Hình 2.

Bảng 3. Kết quả thẩm định khoảng xác định của phương pháp

Dung dịch	Rutin		Hesperidin		Quercetin	
	Nồng độ (µg/ml)	Diện tích pic	Nồng độ (µg/ml)	Diện tích pic	Nồng độ (µg/ml)	Diện tích pic
1	1,01	20444	4,96	12281	0,99	42051
2	20,25	402965	9,92	56599	9,94	422176
3	50,63	1091008	19,84	106558	19,88	858338
4	101,25	2124002	49,59	291395	49,71	2339178
5	202,51	4255407	99,18	538036	99,41	4322445
6	506,27	10638588	198,36	1055573	198,82	8851640



Hình 2. Đồ thị biểu diễn mối tương quan giữa nồng độ và diện tích pic của các chất phân tích

Kết quả cho thấy trong khoảng nồng độ từ 1,01 - 506,3 µg/mL của rutin, 4,96 - 198,4 µg/mL với hesperidin và 0,99 - 198,8 µg/mL với quercetin, có sự tương quan tuyến tính giữa nồng độ và diện tích pic với hệ số R^2 từ 0,9988 - 0,9999. Nồng độ các chất phân tích xác định từ đường chuẩn so với nồng độ lý thuyết đều nằm trong giới hạn cho phép (85 - 115%) [8].

3.1.3. Giới hạn phát hiện (LOD) và giới hạn định lượng (LOQ)

Ước lượng LOD của phương pháp bằng cách xác định tỷ lệ tín hiệu trên nhiễu đường nền. Tạo mẫu thử có nồng độ khoảng 5 - 7 lần LOD ước lượng. Phân tích mẫu thử 06 lần lặp lại, tính giá trị trung bình và độ lệch chuẩn SD. Từ đó tính $LOD = 3SD$, $LOQ = 10SD$. Tính $R = \bar{x}/LOD$, nếu $4 \leq R \leq 10$ thì nồng độ dung dịch thử là phù hợp và LOD tính được là đáng tin cậy. Kết

quả LOD, LOQ của phương pháp được thể hiện ở Bảng 4.

Bảng 4. Giới hạn phát hiện (LOD), giới hạn định lượng (LOQ) của phương pháp

	<i>LOD (g/100 g)</i>	<i>LOQ (g/100 g)</i>	<i>R</i>
<i>Rutin</i>	0,0063	0,021	5,13
<i>Hesperidin</i>	0,016	0,047	4,22
<i>Quercetin</i>	0,0016	0,0054	7,28

Từ bảng 4 cho thấy, giá trị R thu được nằm trong khoảng yêu cầu ($4 \leq R \leq 10$) do đó LOD, LOQ thu được là đáng tin cậy.

3.1.4. Độ đúng

Độ đúng của phương pháp được đánh giá bằng cách xác định độ thu hồi, thực hiện trên nền mẫu trắng. Thêm chính xác một lượng chất chuẩn vào mẫu trắng và xử lý theo quy trình phân tích để dung dịch cuối cùng có nồng độ rutin ở 3 mức là 10 µg/mL, 100 µg/mL, 200 µg/mL; hesperidin và quercetin ở 3 mức tương ứng là 10 µg/mL, 50 µg/mL, 150 µg/mL. Mỗi mức nồng độ làm 03 mẫu. Xác định hàm lượng các chất phân tích có trong mẫu bằng đường chuẩn phân tích trong cùng điều kiện. Độ đúng của phương pháp là tỷ lệ % độ thu hồi của chất phân tích. Kết quả xác định độ đúng của phương pháp được trình bày ở Bảng 5.

Bảng 5. Kết quả thẩm định độ đúng

<i>Rutin</i> Nồng độ ban đầu (10 µg/ml, 100 µg/ml, 200 µg/ml)		<i>Hesperidin</i> Nồng độ ban đầu (10 µg/ml, 50 µg/ml, 150 µg/ml)		<i>Quercetin</i> Nồng độ ban đầu (10 µg/ml, 50 µg/ml, 150 µg/ml)	
<i>C tìm lại</i> (µg/ml)	<i>Độ thu hồi (%)</i> <i>RSD (%)</i>	<i>C tìm lại</i> (µg/ml)	<i>Độ thu hồi (%)</i> <i>RSD (%)</i>	<i>C tìm lại</i> (µg/ml)	<i>Độ thu hồi (%)</i> <i>RSD (%)</i>
9,91	99,10% 0,89%	9,85	98,54% 0,48%	9,95	99,54% 0,37%
98,44	98,44% 0,58%	49,66	99,31% 1,00%	50,0	100,01% 0,58%
202,66	101,33% 0,28%	150,66	100,44% 0,55%	145,5	97,0% 1,37%

Kết quả thẩm định cho thấy ở các mức nồng độ thấp, trung bình và cao phương pháp có độ đúng từ 98,44 - 101,3% với rutin, 98,54 - 100,4% với hesperidin và 97,0 - 100% với quercetin; giá trị RSD thu được của các chất nhỏ (từ 0,28 - 1,37%). Kết quả này phù hợp với yêu cầu về thẩm định phương pháp theo AOAC (phải đạt từ 95 - 105%; $RSD \leq 3,7\%$ khi hàm lượng hoạt chất từ 0,1 - 1%, đạt 97 - 103%, $RSD \leq 2,7\%$ khi hàm lượng hoạt chất từ 1 - 10%) [7].

3.1.5. Độ lặp và độ tái lặp

Thực hiện phân tích độ lặp lại, độ tái lặp được thực hiện trên mẫu thực: Mẫu TPBVSK chứa hoa hòe, trần bì dạng viên nang cứng, kết hợp cùng nhiều dược liệu khác như đương quy,

sài hồ, đảng sâm, bạch truật, hoàng kỳ,... trong công thức bào chế.

Tiến hành làm thí nghiệm 06 lần lặp lại trên cùng một mẫu thử và lặp lại thí nghiệm độ lặp lại bởi kiểm nghiệm viên khác, ngày khác, hóa chất, thiết bị khác theo quy trình đã xây dựng. Kết quả khảo sát độ lặp lại và độ tái lặp được nêu ở bảng 6.

Bảng 6. Kết quả thẩm định độ lặp lại, độ tái lặp

Kết quả	Rutin		Hesperidin		Quercetin	
	Hàm lượng (g/100g)	RSD (%)	Hàm lượng (g/100g)	RSD (%)	Hàm lượng (g/100g)	RSD (%)
Yêu cầu theo AOAC	10 - 100	≤ 1,3	1 - 10	≤ 1,8	0,01 - 0,1	≤ 3,7
Độ lặp lại (n = 6)	10,31	Đạt 1,11	2,55	Đạt 1,06	0,04	Đạt 1,92
Yêu cầu theo AOAC	10 - 100	≤ 2,0	1 - 10	≤ 2,8	0,01 - 0,1	≤ 5,6
Độ chính xác trung gian (n = 12)	10,18	Đạt 1,48	2,47	Đạt 2,04	0,04	Đạt 2,92

Kết quả thẩm định cho thấy phương pháp có độ lặp tốt: RSD đạt từ 1,06 - 1,92% (n = 6) và RSD đạt từ 1,48 - 2,92% (n = 12), đáp ứng yêu cầu của AOAC [7].

3.2. Kết quả phân tích mẫu thực tế

Sử dụng phương pháp đã xây dựng để xác định hàm lượng của rutin, hesperidin, quercetin trong 20 mẫu TPBVSK chứa dược liệu hoặc cao dược liệu hoa hòe và trần bì dạng viên nén, viên nang cứng, bột có trên thị trường, thành phần kết hợp nhiều dược liệu khác như bạch truật, đương quy, sinh địa, đảng sâm,... Kết quả được trình bày ở bảng 7.

Bảng 7. Kết quả phân tích mẫu thực tế

Mẫu	Hàm lượng (g/100g)			Mẫu	Hàm lượng (g/100g)		
	Rutin	Hesperidin	Quercetin		Rutin	Hesperidin	Quercetin
1	10,31	2,55	0,042	11	4,85	2,20	0,027
2	1,42	0,26	0,008	12	10,20	2,10	0,044
3	4,75	1,72	0,021	13	3,02	1,05	0,006
4	3,27	0,85	0,012	14	1,02	0,35	0,005
5	4,80	2,12	0,016	15	7,02	2,10	0,035
6	5,77	2,02	0,027	16	2,45	1,22	0,005
7	3,25	1,68	0,011	17	3,36	1,65	0,005
8	3,52	1,62	0,008	18	4,25	1,25	0,017
9	6,75	2,22	0,036	19	1,72	0,58	0,005
10	6,60	2,26	0,037	20	4,28	0,84	0,023

Kết quả hàm lượng rutin trong các mẫu thu được đạt từ 1,0 - 10,31 g/100g, hesperidin từ 0,16 - 2,02 g/100g, quercetin đạt từ 0,01 - 0,04 g/100g với giá trị RSD < 3%. Các mẫu 1, 6, 12,

9, 10, 15 cho hàm lượng rutin, hesperidin, quercetin cao do nguyên liệu sử dụng cao dược liệu hoa hòe, trần bì. Có 03 mẫu: 1, 12, 15 không đạt yêu cầu hàm lượng rutin, hesperidin theo công bố sản phẩm. Một số mẫu có hàm lượng rutin, hesperidin và quercetin cao như 6, 7, 8... nhưng lại không công bố hàm lượng trên nhãn sản phẩm. Kết quả phân tích cho thấy hàm lượng các chất phân tích trong các mẫu TPBVSK tương đối cao do đó xác định hàm lượng rutin, hesperidin và quercetin làm cơ sở để kiểm soát chất lượng các sản phẩm trên là cần thiết. Phương pháp đã xây dựng, có độ chọn lọc, độ tin cậy, phù hợp để ứng dụng trong công tác tiêu chuẩn hóa các mẫu chứa hoa hòe và trần bì.

4. KẾT LUẬN

Nghiên cứu đã xác định được đồng thời hàm lượng rutin, hesperidin và quercetin trong các mẫu TPBVSK dạng rắn bằng phương pháp HPLC-DAD. Quy trình xử lý mẫu đơn giản bằng cách hòa tan trong methanol. Kết quả thẩm định cho thấy, phương pháp có giá trị giới hạn định lượng nhỏ (0,021/100g chế phẩm với rutin, 0,047/100g chế phẩm với hesperidin và 0,0054/100g chế phẩm với quercetin); khoảng tuyến tính rộng (từ 1,01 - 506,3 µg/ml với rutin, 4,96 - 198,4 µg/mL với hesperidin và 0,99 - 198,8 µg/mL với quercetin); độ đúng dao động trong khoảng 97,0 - 101,33%; độ lặp lại với giá trị RSD % nhỏ (1,11 - 1,92%), đáp ứng yêu cầu đối với phương pháp phân tích theo AOAC. Phương pháp đã thẩm định có thể ứng dụng định lượng rutin, hesperidin, quercetin trong các mẫu TPBVSK dạng rắn chứa hoa hòe, trần bì và xây dựng thành thường quy kỹ thuật đáp ứng yêu cầu của ISO/IEC 17025 đối với phương pháp thử nội bộ.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Đỗ Tất Lợi, *Những cây thuốc và vị thuốc Việt Nam*, Hà Nội: Nhà xuất bản Y học, tr. 298-299, tr. 384-385, 2005.
- [2] *Dược điển Việt Nam*, lần xuất bản thứ năm, Tập 2, Hà Nội: Nhà Xuất bản Y học, tr. 1195-1196, tr. 1358-1359, 2017.
- [3] Pharmacopoeia of the People's Republic of China, Vol. Ia. Pharmacopoeia Commission of PRC, pp. 436-437, 2015.
- [4] L.Chang; X. X .Zhang; Y. P. Ren; L. Cao; X. R. Zhi and L.T. Zhang, "Simultaneous Quantification of Six Major Flavonoids From Fructus sophorae by LC-ESI-MS/MS and Statistical Analysis", *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 75, no 3, pp. 330-338, 2013.
- [5] D. Šatínský, K. J. L. Havlíková and P. Solich, "A new and fast HPLC method for determination of rutin, troxerutin, diosmin and hesperidin in food supplements using fused-core column technology", *Methods in Food Analysis.*, vol. 6, pp. 1353-1360, 2013.
- [6] Y. J. Yang, Z. L. Yang, D. C. Wang, X. C. Xiao and P. Li, "Comparative study on effects of rutin and quercetin on metabolism in osteoblast cells", *Zhong Yao Cai*, vol. 29, no. 5, pp. 467-470, 2006.
- [7] AOAC - Appendix K: Guidelines for Dietary Supplements and Botanicals - Part I: AOAC Guidelines for Single-Laboratory Validation of Chemical Methods for Dietary Supplements and Botanicals, 2013.
- [8] Trần Cao Sơn, Phạm Xuân Đà, Lê Thị Hồng Hào, Nguyễn Thành Trung, *Thẩm định phương*