

XÂY DỰNG PHƯƠNG PHÁP ĐỊNH LƯỢNG ĐỒNG THỜI QUERCETIN VÀ KAEMPFEROL TRONG VIÊN NANG CỨNG CAO LÁ HỒNG BẰNG SẮC KÝ LỎNG HIỆU NĂNG CAO KẾT HỢP DETECTOR DAD

Hoàng Thị Tuyết¹, Lê Thanh Nghị¹, Ngô Lan Hương¹, Hoàng Lê Sơn²,
Nguyễn Văn Tài¹

¹Viện Dược liệu Trung ương

²Trường Đại học Thành đông

*Email: hoangson.med@gmail.com

TÓM TẮT

Phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) được xây dựng để định lượng đồng thời 02 hoạt chất gồm quercetin và kaempferol trong viên nang cứng cao lá hồng. Mẫu thử được thủy phân trong ethanol 70° với xúc tác HCl đặc và tiến hành phân tích với cột pha đảo C18 (250 x 46 mm, 5μm), rửa giải theo chương trình gradient với pha động là methanol và dung dịch acid phosphoric 0,43%, tốc độ dòng 1mL/phút, thể tích tiêm 10μL. Phương pháp được thẩm định theo hướng dẫn của ICH, đạt yêu cầu về độ thích hợp, độ đặc hiệu, độ đúng, độ chính xác và độ tuyến tính; đồng thời xác định được hàm lượng tổng flavonoid theo hàm lượng quercetin và kaempferol sau khi thủy phân trong mẫu viên nang cứng cao lá hồng nghiên cứu có giá trị trên 33,07 mg/g.

Từ khóa: viên nang cứng cao lá hồng, HPLC.

ABSTRACT

The high-performance liquid chromatograph method (HPLC) was established for quantification of 02 active compound, including quercetin and kaempferol in capsule from extractum folium Diospyros kaki. The test sample was hydrolyzed in 70 ° ethanol with a concentrated HCl catalyst and analyzed with a C18 column (250 x 46 mm, 5μm), using methanol and acid phosphoric 0,43 % as mobile phase, flow rate 1 mL/min, injection volume 10 μL. Method validation confirm that the assay exhibited good system compatibility, specificity, linear ranger, accuracy and precision. The result shows that total content of quercetin and kaempferol in the samples are about 33 mg/g, respectively.

Key words: capsule from extractum folium Diospyros kaki; HPLC

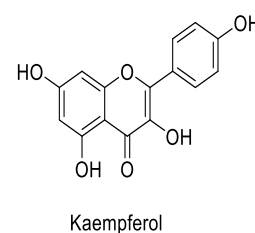
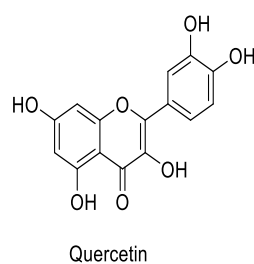
1. Đặt vấn đề

Cây Hồng với tên khoa học *Diospyros kaki* thuộc Họ Thị (Ebenaceae) là cây thân gỗ. Cây được trồng nhiều ở Trung Quốc, Nhật Bản, các nước ASEAN ở phía Bắc và ở vùng Địa Trung Hải [1]. Cây hồng rất dễ trồng và được trồng nhiều ở Việt Nam như Lạng Sơn, Lào Cai, Yên Bái, Đà Lạt. Ở Việt Nam, hồng được trồng để lấy quả, tai quả hồng (thị đế) sử dụng trong y học dân gian điều trị chứng nấc (ách nghịch) và gỗ sử dụng trong xây dựng. Trong khi đó, lá hồng – nguồn dược liệu dồi dào tại Việt Nam vẫn chưa được sử dụng để làm trà hay thuốc điều trị hạ huyết áp, lợi tiểu như ở Nhật Bản, Trung Quốc, Hàn Quốc [2].

Nhiều nghiên cứu chứng minh rằng lá hồng có khả năng hạ cholesterol, hạ đường huyết, chống xơ vữa mạch [3], tăng cường lưu lượng máu lên não, chống đột quỵ não [4][5]. Lá hồng cũng chứa một số hoạt chất có tác dụng hướng tới bền thành mạch, giảm mỡ máu như quercetin, kaempferol, quercetin-3-O- β -L-arabinopyranoside [6]. Điều này cho thấy lá hồng có tiềm năng phát triển thành các sản phẩm chăm sóc sức khỏe để phòng và điều trị tai biến mạch máu não. Để tiêu chuẩn hoá chế phẩm từ lá hồng, một số nghiên cứu đã công bố sử dụng flavonoid quercetin và kaempferol là chất đánh dấu với phương pháp sử dụng là sắc ký lỏng hiệu năng cao bắt cặp detector DAD HPLC-DAD. Năm 2004, Luo Jie và cộng sự đã phân tích định lượng quercetin và kaempferol

trong viên Nao Xin Qing bằng HPLC. Cột sắc ký được sử dụng là cột Hypersil Og (250x4,6 mm, 10 μ m), pha động là methanol-acid phosphoric 0,4% (50-50), tốc độ dòng 1 ml/phút, detector UV 360 nm [7]. Thêm vào đó, nghiên cứu của Weijian Bei và cộng sự có trình bày phương pháp định lượng flavonoid trong chế phẩm Nao Xin Qing theo các tương tự tiêu chuẩn cao định chuẩn bạch quả (*Ginkgo biloba*) trong Dược điển Mỹ và Châu Âu [8] [9].

Từ những thông tin trên, một chương trình phân tích duy nhất định lượng đồng thời quercetin và kaempferol trong chế phẩm cuối cùng ví như viên nang cứng chứa cao chiết lá hồng bằng HPLC-DAD là cần thiết. Điều kiện phân tích thu được có thể giúp các nghiên cứu phát triển sản phẩm chứa cao lá hồng sau này. Do đó trong khuôn khổ bài báo này, phương pháp định lượng đồng thời quercetin và kaempferol bằng HPLC-DAD trong chế phẩm viên nang cứng được xây dựng và thẩm định.



2. Nguyên vật liệu, thiết bị và phương pháp nghiên cứu

2.1. Nguyên vật liệu, thiết bị nghiên cứu

Đối tượng nghiên cứu: Viên nang cứng chứa 165 mg cao chiết còn 50° từ lá cây hồng *Diospyros kaki* L.f., họ Thị (Ebenaceae). Công thức cho một viên nang cứng như trong bảng 1.

Bảng 1. Công thức bào chế cho một viên nang cứng

STT	Tên nguyên liệu	Đơn vị	Số lượng
01	Cao khô lá hồng	mg	165
02	Tá dược (vd)	mg	450

Chất chuẩn: Quercetin và kaempferol có nguồn gốc từ Chengdu biopurify phytochemical Ltd, đạt tiêu chuẩn chất chuẩn với độ tinh khiết >99 %.

Hóa chất, dung môi: Ethanol 96%, acid chlohydric (Trung Quốc, PA), methanol, acid phosphoric (Merk, HPLC grade), nước cất 2 lần (đạt TCCS).

Thiết bị: Hệ thống HPLC-DAD (Shimadzu, Nhật Bản), tủ sấy Nabertherm (Đức), bể siêu âm MRC (Israrel), bể cách thủy, cân phân tích Mettler Toledo (Thụy Sĩ), cân kỹ thuật Mettler Toledo (Thụy Sĩ), cân sấy ẩm MB25 (OHAUS Mỹ).

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Chuẩn bị các dung dịch sắc ký

Chuẩn bị dung dịch thử:

- Dung dịch thử chưa thủy phân: Cân chính xác một lượng bột thuốc tương ứng với khoảng 50 g vào bình định mức 25 ml, thêm 20 ml MeOH, siêu âm 30

phút. Sau đó bổ sung methanol đến vạch. Lọc dịch chiết qua màng lọc kích cỡ 0,45 µm thu được dung dịch thử dùng để triển khai sắc ký.

- Dung dịch thử thủy phân: Cân chính xác một lượng bột thuốc tương ứng khoảng 270 mg mẫu bột vào bình cầu 250 ml có sinh hàn, thêm 80 ml ethanol 70°, thêm 10 ml HCl đặc. Dung dịch được thủy phân trong 2 giờ ở nhiệt độ 90°C. Sau đó, chuyển toàn bộ dung dịch vào bình định mức 100 ml, bổ sung ethanol 70° đến vạch. Sau đó, lọc dịch chiết qua màng lọc kích cỡ 0,45 µm thu được dung dịch thử dùng để triển khai sắc ký.

Chuẩn bị dung dịch chuẩn: Cân chính xác khoảng 5 mg mỗi chất chuẩn, chuyển vào bình định mức 5 ml, thêm khoảng 3 ml methanol, siêu âm cho tan hết, định mức đến vạch mức bằng methanol, thu được dung dịch chuẩn có nồng độ chính xác khoảng 1 mg/ml. Tiến hành pha loãng bằng methanol theo các tỷ lệ khác nhau để thu được các dung

dịch chuẩn có nồng độ chính xác là: 3,23–105,50 µg/ml (quercetin) và 3,05–97,50 µg/ml (kaempferol).

2.2.2. Điều kiện sắc ký

Pha tĩnh được chọn để tiến hành nghiên cứu phân tích đồng thời quercetin và kaempferol là cột pha đảo Thermo C18 (250 x 4,6 mm, 5 µm) trên hệ thống HPLC-DAD (shimadzu). Dung môi pha động dựa trên trộn lẫn giữa methanol (A) và dung dịch H₃PO₄ 0,43% trong nước (B). Các thông số được cố định bao gồm bước sóng phát hiện là 360 nm, thể tích tiêm mẫu là 10 µL, tốc độ rửa giải 1,0 ml/phút. Pha động được rửa giải theo chương trình như sau:

Thời gian (phút)	A (%)	B (%)
0,01 - 15	55	45

2.2.3. Thẩm định phương pháp phân tích

Phương pháp phân tích được thẩm định theo yêu cầu chung của ICH về thẩm định phương pháp phân tích: tính thích hợp hệ thống, độ đặc hiệu, độ tuyến tính, độ đúng, độ chính xác, giới hạn phát hiện (LOD), giới hạn định lượng (LOQ) [10].

2.2.4. Xử lý số liệu

Số liệu được xử lý bằng phần mềm Microsoft Excel Office 2016.

Hàm lượng (%) quercetin và kaempferol trước thủy phân được tính theo công thức như sau:

$$X(\%) = \frac{C (\mu\text{g/ml}) \times 10^{-6} \times 25 (\text{ml}) \times 100}{m (\text{g}) \times (100 - H)}$$

Hàm lượng (%) quercetin và kaempferol trước thủy phân = hàm lượng quercetin + hàm lượng kaempferol

Tổng quercetin trước thủy phân trong 1 viên = hàm lượng quercetin và kaempferol x khối lượng trung bình 1 viên.

Hàm lượng (%) quercetin và kaempferol sau thủy phân được tính theo công thức sau:

$$X(\%) = \frac{C (\mu\text{g/ml}) \times 10^{-6} \times 100 (\text{ml}) \times 100}{mx(100 - H)}$$

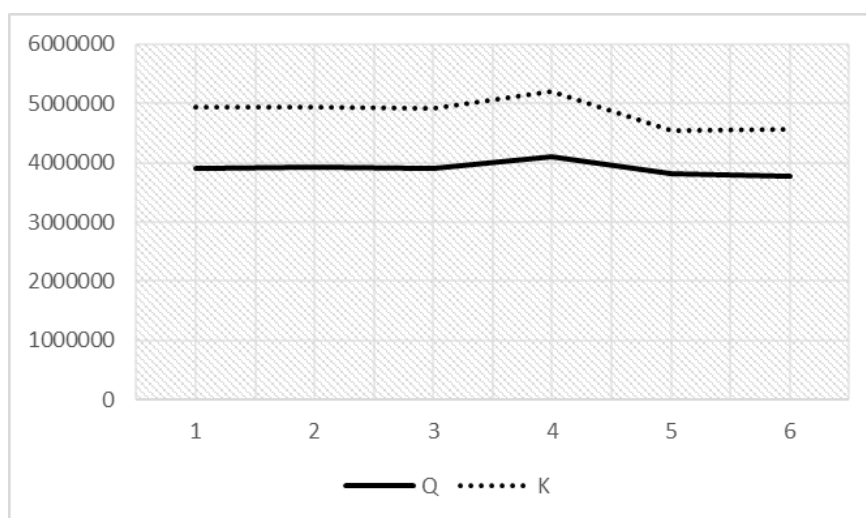
Trong đó: C là nồng độ quercetin và kaempferol có trong dung dịch thử (µg/mL); m là khối lượng bột đem cân (g); H là độ ẩm của mẫu thử (%).

Tổng % flavonoid sau thủy phân trong 1 viên = hàm lượng quercetin và kaempferol x khối lượng trung bình 1 viên

3. Kết quả

3.1. Độ ổn định của dung dịch hỗn hợp chuẩn quercetin và kaempferol trong dung môi MeOH tại 4°C

Dung dịch hỗn hợp chuẩn quercetin và kaempferol được bảo quản tại 4°C. Hàng ngày được đem ra định lượng theo điều kiện ở trên. Kết quả diện tích pic được trình bày trong hình dưới đây.



Hình 2. Biểu đồ thể hiện ổn định Quercetin (Q) và Kaempferol (K) trong 6 ngày theo dõi tại 4°C.

Kết quả thu được như bảng 2.

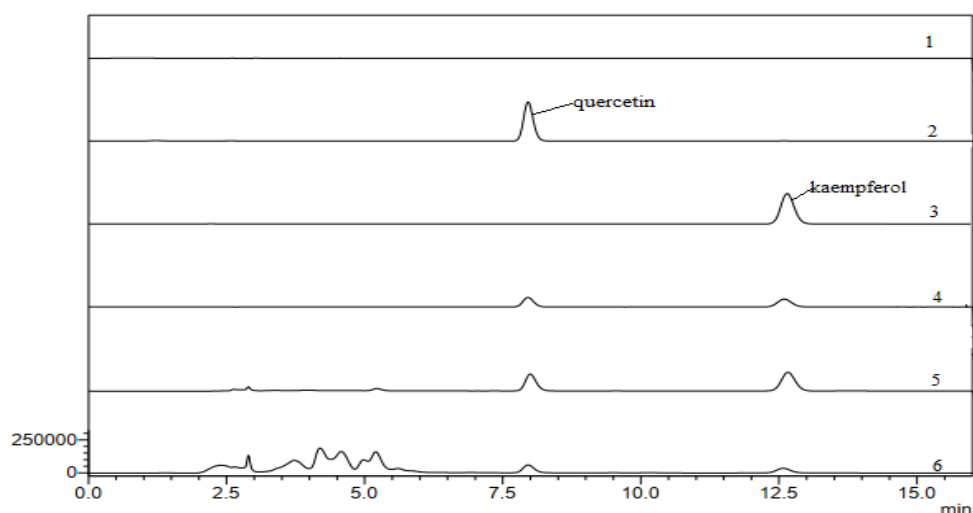
Bảng 2. Các thông số đánh giá đối với chất chuẩn

STT	Thông số đánh giá	Giá trị	
		Quercetin	Kaempferol
1	Thời gian lưu, t_R (Phút)	7,897	12,489
2	Độ phân giải, R_s	18,462	10,817
3	Hệ số kéo đuôi peak	1,079	1,055
4	Diện tích pic	523959	562518
5	Số đĩa lý thuyết (N)	7362	10796

3.3. Thẩm định phương pháp

Độ đặc hiệu: Đối với phân tích hàm lượng flavonoid theo quercetin và kaempferol tiến hành phân tích dung dịch pha mẫu EtOH 70°, dung dịch

chuẩn đơn quercetin 80µg/ml và kaempferol 80µg/ml, dung dịch mẫu bột thuốc trước và sau thủy phân, với các điều kiện sắc ký và xử lý mẫu như đã nêu ở trên, thu được kết quả đánh giá bằng các sắc ký đồ tương ứng như hình 3:



Hình 3. Sắc ký đồ đánh giá tính chọn lọc của phương pháp tại bước sóng 360 nm

trên mẫu trắng (1), mẫu chuẩn quercetin (2), kaempferol (3), hỗn hợp quercetin và kaempferol (4), mẫu phân tích thủy phân (5) và mẫu phân tích trước khi thủy phân (6).

Tính thích hợp hệ thống: Tiến hành phân tích 06 mẫu chất chuẩn với nồng

độ xác định. Kết quả RSD (%) của thời gian lưu (phút) và diện tích pic (mAU.s) được thể hiện ở bảng 3. Giá trị RSD nhỏ hơn giới hạn cho phép 2% cho thấy điều kiện sắc ký phân tích định lượng scutellarin phù hợp và đảm bảo ổn định với hệ thống HPLC-DAD.

Bảng 3. Kết quả xác định tính thích hợp hệ thống của phương pháp định lượng đồng thời quercetin và kaempferol bằng HPLC-DAD

STT	Quercetin		Kaempferol	
	t_R	Spic	t_R	Spic
	(phút)	(mAU.s)	(phút)	(mAU.s)
1	7,887	1950758	12,486	2115984
2	7,868	1952797	12,428	2128477
3	7,852	1947082	12,396	2125917
4	7,841	1942789	12,381	2124869
5	7,847	1947705	12,390	2120375
6	7,851	1947915	12,405	2120310
$\bar{X}$	7,858	1948174	12,414	2122655
RSD (%)	0,22	0,18	0,31	0,22

Giới hạn phát hiện (LOD) và giới hạn định lượng (LOQ): Mẫu chuẩn với nồng độ quercetin và kaempferol được pha loãng dần đến khi trên sắc kí đồ tại thời điểm quan sát thấy tỷ lệ S/N trong

khoảng 2-11. Từ đó xác định giá trị của LOD và LOQ. Mỗi mẫu lặp lại 3 lần và lấy kết quả trung bình. Kết quả được trình bày ở bảng 4.

Bảng 4. Giới hạn phát hiện và giới hạn định lượng của quercetin và kaempferol

Biomarker	Quercetin	Kaempferol
LOD (µg/ml)	0,0404	0,038
LOQ (µg/ml)	0,120	0,110

Xác định khoảng tuyến tính và xây dựng đường chuẩn: Từ dung dịch chuẩn gốc quercetin 1 mg/ml và kaempferol 1 mg/ml, tiến hành pha loãng bằng methanol theo các tỷ lệ khác nhau để thu được các dung dịch chuẩn có nồng độ chính xác là: 3,23– 105,50µg/ml (quercetin) và 3,05– 97,50µg/ml

(kaempferol). Tiến hành sắc ký với điều kiện đã khảo sát. Ghi lại tín hiệu pic và tiến hành xây dựng mối tương quan giữa nồng độ và diện tích pic. Kết quả khảo sát sự tương quan giữa diện tích pic và nồng độ quercetin và kaempferol được trình bày trong bảng 5.

Bảng 5. Kết quả tương quan giữa diện tích pic và nồng độ quercetin và kaempferol

TT	Quercetin			Kaempferol		
	Nồng độ	Diện tích	Độ chệch	Nồng độ	Diện tích	Độ chệch
	µg/ml	mAU.s	%	µg/ml	mAU.s	%
1	103,50	3836593	0,22	97,50	4164724	0,34
2	51,75	1952084	0,51	48,75	2135114	1,33
3	25,88	1005072	1,46	24,38	1073230	0,14
4	12,94	523959	1,78	12,19	562518	1,67
5	6,47	264031	5,74	6,09	282718	4,73
6	3,23	158123	0,56	3,05	154109	8,79
	Y = 36723.X + 42837			Y = 42491.X + 36027		
	R ² = 0,9999			R ² = 0,9999		

Hệ số tương quan $R^2 \geq 0,995$ của các đường chuẩn cho thấy mối tương quan tuyến tính giữa nồng độ chất chuẩn và diện tích pic, đủ điều kiện thực hiện các phép ngoại suy theo trong không gian thí nghiệm.

Độ lặp lại: Tiến hành chuẩn bị 6 mẫu thử theo phương pháp đã trình bày ở mục 2. Các mẫu được phân tích theo điều kiện đã xác định thu được giá trị độ lệch chuẩn tương đối $RSD \leq 2\%$ (bảng 6), cho thấy phương pháp định lượng có độ lặp lại đạt yêu cầu.

Bảng 6. Kết quả đánh giá độ lặp lại trong ngày đối với mẫu bột viên

TT	Quercetin	Kaempferol
	%	%
1	2,85	3,79
2	2,73	3,93
3	2,76	3,73
4	2,78	3,87
5	2,82	3,84
6	2,75	3,83
TB	2,79	3,83
RSD (%)	1,6	1,8

Độ thu hồi: Một lượng chất chuẩn thêm vào trong mẫu bột viên với hàm lượng bằng 80, 100 và 120% so với chất chuẩn trong mẫu gốc. Sau đó, mẫu đem đi xử lý và phân tích theo quy trình ở trên. Tỷ lệ thu hồi được tính theo % và trình bày ở bảng 7. Kết quả cho thấy phương pháp HPLC-DAD đang xây dựng có độ đúng cao.

Bảng 7. Kết quả đánh giá độ thu hồi

TT	Chuẩn thêm vào		Chuẩn thu hồi		Độ thu hồi	
	Quercetin	Kaempferol	Quercetin	Kaempferol	Quercetin	Kaempferol
%	µg/ml	µg/ml	µg/ml	µg/ml	%	%
80	20,0	26,0	19,04	26,97	$95,4 \pm 0,21$	$103,7 \pm 0,78$
			19,08	27,54		
			19,12	29,06		
100	25,0	32,0	26,0	30,78	$104,4 \pm 0,24$	$95,9 \pm 0,20$
			26,1	30,69		
			26,2	30,59		
120	30,0	39,0	32,04	42,35	$106,9 \pm 0,10$	$108,8 \pm 0,18$
			32,07	42,43		
			32,10	42,51		

Từ các kết quả đánh giá trên, phương pháp định lượng đồng thời quercetin và kaempferol bằng HPLC-DAD trong mẫu viên nang cao lá hồng được thẩm định đạt yêu cầu theo hướng dẫn của ICH Q1 (R1) năm 2005.

3.4. Hàm lượng quercetin, kaempferol và tổng flavonoid trong các mẫu viên nang cao lá hồng

Tiến hành phân tích hàm lượng quercetin và kaempferol trong mẫu viên nang cao lá hồng bằng phương pháp HPLC đã xây dựng được. Kết quả được tính toán theo công thức ở mục 2.3 và được trình bày ở bảng 8

Bảng 8. Kết quả phân tích hàm lượng tổng flavonoid trong các mẫu viên nang cứng của 3 lô sản xuất.

STT	Mẫu	Khối lượng viên	Hàm lượng tổng flavonoid sau thủy phân
		mg	mg/viên
1	M1	441	33,07 ± 0,37
2	M2	456	33,37 ± 0,35
3	M3	476	33,98 ± 0,32

4. Kết luận

Đã xây dựng được phương pháp định lượng đồng thời quercetin và kaempferol trong viên nang cứng chứa 165mg cao lá hồng bằng phương pháp HPLC với điều kiện sắc ký là: cột C18 (250 x 46mm, 5µm), tốc độ dòng: 1mL/phút, thể tích tiêm: 10µL, rửa giải theo chương trình gradient với pha động là methanol và dung dịch acid phosphoric 0,43%. Phương pháp định lượng được xây dựng có sự tương quan tuyến tính chặt chẽ giữa diện tích pic và nồng độ của từng chất chuẩn trong

khoảng nồng độ khảo sát với R^2 đều $\geq 0,995$ và có độ lặp lại, tính chọn lọc, độ nhạy cao, cho kết quả đúng và chính xác, có thể được áp dụng để xác định hàm lượng các hoạt chất có trong các chế phẩm từ cao lá hồng.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] R. Kashif, Muhammad and Akhtar, Naveed and Mustafa, «An overview of dermatological and cosmeceutical benefits of Diospyros kaki and its phytoconstituents», *Rev. Bras. Farmacogn.*, libk. 27, or. 650--662, 2017.
- [2] D. Xie, Chunyan and Xie, Zhisheng and Xu, Xinjun and Yang, «Persimmon (*Diospyros kaki* L.) leaves: a review on traditional uses, phytochemistry and pharmacological properties», *J. Ethnopharmacol.*, libk. 163, zenb. 229--240, 2015.
- [3] X. Zhang, Kexia and Zhang, Yuanyuan and Zhang, Meiyu and Gu, Liqiang and Liu, Ziying and Jia, Jingming and Chen, «Effects of phospholipid complexes of total flavonoids from Persimmon (*Diospyros kaki* L.) leaves on experimental atherosclerosis rats», *J. Ethnopharmacol.*, libk. 191, or. 245--253, 2016.
- [4] M. Kawakami, Kayoko and Aketa, Saiko and Sakai, Hiroki and Watanabe, Yusuke and Nishida, Hiroshi and Hirayama, «Antihypertensive and vasorelaxant effects of water-soluble proanthocyanidins from persimmon leaf tea in spontaneously hypertensive rats», *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, libk. 75, or. 1435--1439, 2011.
- [5] H. Chen, Guang and Lu, Huangwei and Wang, Chunlei and Yamashita, Koichi and Manabe, Masanobu and Meng, Zhiyun and Xu, Suixu and Kodama, «Effect of five flavonoid compounds isolated from leaves of *Diospyros kaki* on stimulus-induced superoxide generation and tyrosyl phosphorylation of proteins in human neutrophils», *Clin. Chim. acta*, libk. 326, or. 169--175, 2002.
- [6] Y. Sun, Lijun and Zhang, Jianbao and Lu, Xiaoyun and Zhang, Liyu and Zhang, «Evaluation to the antioxidant activity of total flavonoids extract from persimmon (*Diospyros kaki* L.) leaves», *Food Chem. Toxicol.*, libk. 49, or. 2689--2696, 2011.
- [7] M. Luo, Jie and Bei, Wei-jian and Xu, Teng and Huang, WH and Li, «Studies on quality specification of Naoxinqing tablets», *Chinese New Drugs J.*, libk. 13, or. 625--627, 2004.
- [8] A. Bei, Weijian and Peng, Wenlie and Zang, Linquan and Xie, Zhiyong and Hu, Dehui and Xu, «Neuroprotective effects of a standardized extract of *Diospyros kaki* leaves on MCAO transient focal cerebral ischemic rats and cultured neurons injured by

glutamate or hypoxia», *Planta Med.*, libk. 73, or. 636--643, 2007.

[9] T. H. E. N. Formulary, *Usp 41 | the united states pharmacopeia*, libk. 3. 2018.

[10] International conference on harmonisation of pharmaceuticals for human use
ich harmonized tripartite guideline validation of analytical procedure: Text and
methodology Q2(R1)''