

- cancer. A meta-analysis of published case-control studies and discussion of selected aetiological factors. *Int J Cancer*. 1993;53(4):538-549. doi:10.1002/ijc.2910530403
3. **Hodgson NCF, Button JH, Franceschi D, Moffat FL, Livingstone AS.** Male breast cancer: is the incidence increasing? *Ann Surg Oncol*. 2004;11(8):751-755. doi:10.1245/ASO.2004.01.001
 4. **Konduri S, Singh M, Bobustuc G, Rovin R, Kassam A.** Epidemiology of male breast cancer. *The Breast*. 2020;54:8-14. doi:10.1016/j.breast.2020.08.010
 5. **Trần Văn Thuấn.** Đánh giá kết quả điều trị hỗ trợ bằng hóa chất phác đồ AC kết hợp với liệu pháp nội tiết trên bệnh nhân UTV giai đoạn II-III có thụ thể estrogen dương tính. Luận An Tiến Sĩ Học. Published online 2005.
 6. **Cutuli B, Le-Nir CCS, Serin D, et al.** Male breast cancer. Evolution of treatment and prognostic factors. Analysis of 489 cases. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2010;73(3):246-254. doi:10.1016/j.critrevonc.2009.04.002
 7. **Lê Hồng Quang.** Ứng dụng kỹ thuật hiện hình và sinh thiết hạch cửa trong đánh giá tình trạng di căn hạch nách của bệnh nhân ung thư vú. Luận An Tiến Sĩ Học. Published online 2012.

NGHIÊN CỨU XÂY DỰNG QUY TRÌNH ĐỊNH LƯỢNG QUERCETIN TRONG THỰC PHẨM BẢO VỆ SỨC KHỎE VÀ THUỐC BẰNG SẮC KÝ LỎNG HIỆU NĂNG CAO

Vũ Thị Thủy*

TÓM TẮT

Flavonoid là một nhóm hợp chất lớn thường gặp trong thực vật. Quercetin là một Flavonoid, được nghiên cứu là có khả năng giảm nguy cơ mắc các bệnh về tim mạch, ngăn chặn sự phát triển của bệnh ung thư, chóng dị ứng và giảm đau cho bệnh gout... Hiện nay, Quercetin được sử dụng khá rộng rãi chủ yếu dưới dạng thực phẩm chức năng và có mặt trên thị trường được phẩm với những dạng bào chế khác nhau: Viên nén, viên nang, dạng bột... Hiện nay, trong các được điển chưa thấy có chuyên luận riêng chính thức để định tính và định lượng quercetin. Vì vậy, để nâng cao hiệu quả công tác giám sát chất lượng thuốc phục vụ sức khỏe cộng đồng, nhóm nghiên cứu đã tiến hành đề tài **Mục tiêu:** Nghiên cứu xây dựng quy trình định lượng Quercetin trong TPBVSK và thuốc có nguồn gốc từ dược và áp dụng quy trình đã xây dựng để định lượng Quercetin trong một số sản phẩm hiện đang lưu hành trên địa bàn tỉnh Hà Tĩnh. **Đối tượng và phương pháp nghiên cứu:** Một số thực phẩm bảo vệ sức khỏe và thuốc có nguồn gốc từ dược liệu thu thập trên địa bàn tỉnh Hà Tĩnh. Tiến hành xác định Quercetin bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao. **Kết quả:** Đã xây dựng được quy trình định lượng quercetin bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao. Quy trình phân tích được kiểm soát chất lượng và đạt độ lặp lại cao với RSD < 2,0% (n = 9); đạt độ đúng tốt với độ thu hồi từ 103,9% - 119,6%. Đã áp dụng thành công quy trình xây dựng để phân tích quercetin trong 4 mẫu gồm thuốc Đông dược và TPBVSK đang lưu hành trên thị trường tỉnh Hà Tĩnh. **Kết luận:** Xây dựng quy

trình định lượng hàm lượng quercetin có trong thực phẩm bảo vệ sức khỏe, thuốc có nguồn gốc dược liệu.

Từ khóa: Quercetin, HPLC

SUMMARY

RESEARCH FOR ESTABLISHMENT OF PROCESS FOR QUERCETIN QUANTIFICATION IN HEALTH PROTECTION FOOD AND DRUG BY HIGH PRESSURE LIQUID CHROMATOGRAPHY

Flavonoids are a large group of compounds commonly found in plants. Quercetin is a Flavonoid, which has been studied for its ability to reduce the risk of cardiovascular diseases, prevent the development of cancer, reduce allergies and relieve pain for gout... Currently, Quercetin is used quite a lot, widely available mainly in the form of functional foods and available on the pharmaceutical market with different dosage forms: Tablets, capsules, powder... Currently, in the pharmacopoeias, there is no official monograph for the qualitative and quantitative quercetin. Therefore, in order to improve the effectiveness of drug quality monitoring for public health, the research team conducted the topic **Objective:** To study and build a process to quantify Quercetin in TPBVSK and drugs derived from and apply the established process to quantify Quercetin in some products currently circulating in Ha Tinh province. **Subjects and research methods:** Some health-protective foods and drugs derived from medicinal herbs collected in the locality of Ha Tinh province. Quercetin was determined by high performance liquid chromatography. **Results:** The quantification process of quercetin has been developed by high-performance liquid chromatography. The analytical procedure was quality controlled and highly repeatable with RSD < 2.0% (n = 9); achieved good accuracy with recovery from 103.9% - 119.6%. Successfully applied the construction process to analyze quercetin in 4 samples including traditional medicines and TPBVSK circulating

*Trường Đại học Y Khoa Vinh

Chịu trách nhiệm chính: Vũ Thị Thủy

Email: Vuthuy@vnu.edu.vn

Ngày nhận bài: 26.7.2022

Ngày phản biện khoa học: 19.9.2022

Ngày duyệt bài: 27.9.2022

on the market in Ha Tinh province. **Conclusion:** Developing a process to quantify quercetin content in health foods and drugs of medicinal origin.

Keywords: Quercetin, HPLC

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Flavonoid là một nhóm hợp chất lớn thường gặp trong thực vật. Flavonoid được khám phá bởi một trong những nhà sinh hóa nổi tiếng thế kỷ 20: Albert Szent-Gyorgyi (1893-1896). Ông đã nhận thấy được đặc tính của Flavonoid và khả năng chống bệnh Scurvy của Flavonoid. Ngày nay, những tác dụng sinh học của Flavonoid đã được tìm hiểu và đưa vào sử dụng để phòng và chữa bệnh cho con người một cách rộng rãi. Trong số đó không thể không nhắc đến Quercetin.

Quercetin là một Flavonoid, được nghiên cứu là có khả năng giảm nguy cơ mắc các bệnh về tim mạch, ngăn chặn sự phát triển của bệnh ung thư, chống dị ứng và giảm đau cho bệnh gout... Hiện nay, Quercetin được sử dụng khá rộng rãi chủ yếu dưới dạng thực phẩm chức năng và có mặt trên thị trường dưới dạng viên nén, viên nang, dạng bột... Và hiện tại có một số cơ sở đang nghiên cứu sản xuất nguyên liệu Quercetin như liên hiệp khoa học sản xuất công nghệ mới; sản xuất thuốc, thực phẩm bảo vệ sức khỏe chứa Quercetin như công ty cổ phần Traphaco, Công ty cổ phần dược phẩm Đại Uy,...

Hiện nay, trong các dược điển chưa thấy có chuyên luận riêng chính thức để định tính và định lượng quercetin. Vì vậy, để nâng cao hiệu quả công tác giám sát chất lượng thuốc phục vụ

sức khỏe cộng đồng, nhóm nghiên cứu đã tiến hành đề tài với *Mục tiêu:*

Nghiên cứu xây dựng quy trình định lượng Quercetin trong TPBVSK và thuốc có nguồn gốc từ dược liệu bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao.

Áp dụng quy trình đã xây dựng để định lượng Quercetin trong một số sản phẩm hiện đang lưu hành trên địa bàn tỉnh Hà Tĩnh

II. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu: Các loại thuốc và thực phẩm bảo vệ sức khỏe (TPBVSK) có chứa quercetin dưới dạng viên nén, viên nang hoặc dạng bột lưu hành trên địa bàn tỉnh Hà Tĩnh

2.2. Phương pháp nghiên cứu: Thực nghiệm

III. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. Kết quả khảo sát các điều kiện tối ưu của phương pháp

3.1.1. Độ đặc hiệu. Kết quả cho thấy, trên sắc ký đồ của dung dịch chuẩn làm việc Quercetin xuất hiện rõ ràng một pic của Quercetin (thời gian lưu khoảng 6 phút); sắc ký đồ của mẫu trắng không xuất hiện bất kỳ pic nào có thời gian lưu tương ứng với thời gian lưu của Quercetin; sắc ký đồ của mẫu thêm chuẩn có xuất hiện rõ ràng 1 pic có thời gian lưu tương ứng với thời gian lưu của Quercetin.

Như vậy, phương pháp nghiên cứu có tính đặc hiệu đối với Quercetin.

3.1.2. Độ ổn định của hệ thống: Để đánh giá độ ổn định của hệ thống HPLC với detector DAD, tiến hành 6 thí nghiệm, với mỗi thí nghiệm tiêm lặp lại 3 lần dung dịch chuẩn làm việc Quercetin.

Bảng 3.1: Độ ổn định

Lần tiêm	1	2	3	4	5	6	TB	RSD (%)
Thời gian lưu (phút)	5,873	5,879	5,897	5,895	5,885	5,885	8,886	0,16
Diện tích pic (mAU.s)	6132900	6177329	6146070	6128042	6138255	6158298	6146816	0,30

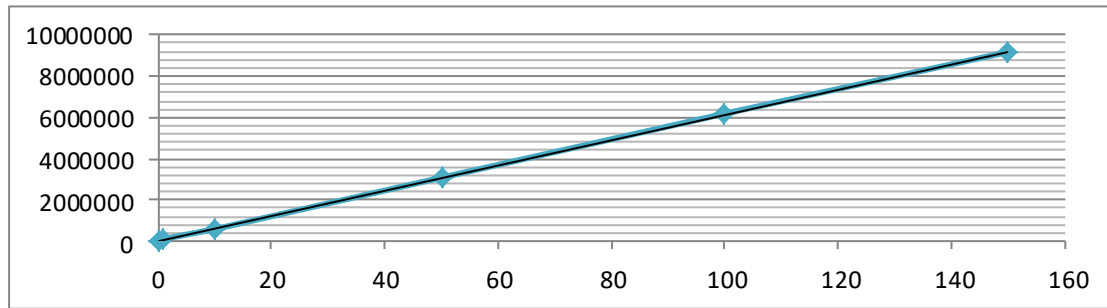
Nhận xét: Các pic Quercetin có độ lệch chuẩn thời gian lưu và độ lệch chuẩn diện tích pic rất tốt (< 2,0%). Như vậy cho thấy hệ thống sắc ký mà chúng tôi tiến hành là phù hợp và đảm bảo sự ổn định cho quá trình định lượng này.

3.1.3. Khoảng tuyến tính: Để đánh giá khoảng nồng độ tuyến tính của phương pháp, chúng tôi pha từ chuẩn gốc các dãy các dung dịch chuẩn Quercetin riêng có nồng độ từ 0,1 – 150 µg/ml. Tiến hành sắc ký ở các điều kiện đã nêu trên, kết quả thu được thể hiện ở bảng 3.2.

Bảng 3.2: Tuyến tính

Nồng độ (µg/ml)	0,1	1	10	50	100	150
Diện tích (mAU.s)	13227	64478	632293	3071604	6132900	9184770
Phương trình hồi quy	$y = 61200x + 8971,9$					
Hệ số tương quan	$R^2 = 1,0000$					

Nhận xét: Kết quả thu được cho thấy, có sự tương quan tuyến tính chặt chẽ giữa diện tích pic Quercetin với nồng độ của chúng với hệ số tương quan $R^2 = 1,0000$



3.1.4. Giới hạn phát hiện(LOD) và giới hạn định lượng (LOQ): Tiến hành xác định giới hạn phát hiện (LOD) bằng cách định lượng hoạt chất có trong mẫu thử, sau đó pha loãng dung dịch thử này nhiều lần để được các dung dịch thử có nồng độ giảm dần, tiến hành sắc ký để xác định nồng độ tối thiểu mà tại đó còn phát hiện được đáp ứng của chất phân tích.

Kết quả: LOD = 2,40 µg/ml; LOQ = 7,92µg/ml.

3.1.5. Độ lặp lại. Độ lặp lại của phương pháp được đánh giá qua giá trị RSD khi định lượng Quercetin trong mẫu thử. Tiến hành 6 thí nghiệm lặp lại, kết quả hàm lượng Quercetin tính theo nồng độ chuẩn 100 µg/ml thu được ở bảng.

Bảng 3.3: Kết quả đánh giá độ lặp lại dạng viên nén

Thí nghiệm	1	2	3	4	5	6	TB	RSD(%)
Lượng cân(g)	1,2192	1,2195	1,2486	1,2419	1,2156	1.2174		
Thời gian lưu (phút)	5,829	5,852	5,887	5,916	5,918	5,920		
Diện tích pic (mAU.s)	3035658	3036398	3161033	3158268	2962284	2973738	3054563	
Hàm lượng (mg/viên)	0,959	0,959	0,975	0,979	0,938	0,941	0,958	1,76

Bảng 3.4: Kết quả đánh giá độ lặp lại dạng viên nang mềm

Thí nghiệm	1	2	3	4	5	6	TB	RSD (%)
Lượng cân(g)	0,4095	0,4106	0,4394	0,4368	0,4092	0,4088		
Thời gian lưu (phút)	5,914	5,893	5,888	5,891	5,897	5,895		
Diện tích pic (mAU.s)	2909274	2917075	3159110	3159814	2904644	2901074	3054563	
Hàm lượng (mg/viên)	4,610	4,610	4,666	4,694	4,606	4,605	4,632	0,83

Nhận xét: Từ kết quả thu được cho thấy, phương pháp đạt được độ lặp lại cao với giá trị RSD < 2,0%.

3.1.6. Độ đúng: Độ đúng của phương pháp được đánh giá qua độ thu hồi khi phân tích mẫu thêm chuẩn. Ở mỗi mức nồng độ, phân tích 3 lần riêng biệt.

Bảng 3.5: Đối với viên nén

	Nồng độ khi chưa thêm chuẩn (µg/ml)	Lượng thêm vào (µg/ml)	Diện tích pic (mAU.s)*	Lượng tìm thấy (µg/ml)	Tỷ lệ thu hồi(%)	RSD (%)	
A.1	49,7	60	6914016	112,8	106,3	0,46	
A.2		60	6894281	112,5	105,6		
A.3		60	6885109	112,4	105,3		
B.1		80	8468630	138,2	117,2	1,16	
B.2		80	8493636	138,6	118,0		
B.3		80	8412825	137,3	115,3		
C.1		50	50	6403284	104,5	109,6	0,47
C.2			50	6381194	104,1	108,9	
C.3			50	6411708	104,6	109,9	

Bảng 3.6: Độ lặp lại với viên nang mềm

	Nồng độ khi chưa thêm chuẩn ($\mu\text{g/ml}$)	Lượng thêm vào ($\mu\text{g/ml}$)	Diện tích pic (mAU.s)*	Lượng tìm thấy ($\mu\text{g/ml}$)	Tỷ lệ thu hồi (%)	RSD (%)
A.1	49,7	60	6791811	110,8	104,4	0,51
A.2		60	6808187	111,1	104,9	
A.3		60	6776716	110,6	103,9	
B.1		90	8468240	138,2	119,6	0,54
B.2		90	8431070	137,6	118,3	
B.3		90	8456749	138,0	119,2	
C.1		50	6308462	102,9	108,7	0,20
C.2		50	6302901	102,8	108,5	
C.3		50	6315723	103,1	108,9	

* Giá trị trung bình của 3 lần thí nghiệm lặp lại.

Nhận xét: Kết quả thu được cho thấy: quy trình định lượng Quercetin có độ đúng tốt (độ thu hồi nằm trong khoảng 103,9% - 119,6%). Theo AOAC (Hiệp hội các nhà hóa phân tích chính thức) độ thu hồi từ 80% - 120% là chấp nhận được. Kết quả thu được ở bảng 3.4; 3.5, các giá trị RSD nằm trong khoảng từ 0,20% - 1,16%, cho thấy quy trình định lượng Quercetin có độ lặp lại tốt.

3.2. Kết quả phân tích Quercetin trên một số mẫu

Bảng 3.7. Kết quả phân tích Quercetin trên một số mẫu

Tên mẫu	Nơi sản xuất	Khối lượng (g)	Hàm lượng Quercetin có trong mẫu (mg/viên)	Hàm lượng Flavonoid toàn phần có trong mẫu (mg/viên)
TPBVSK Viên nén bao phim Hoạt huyết bổ máu Đại Bắc	CTCP Dược - VTYT Hải Dương	3.0798	0,44 mg/viên	1,6mg/viên
Viên nén bao đường hoạt huyết dưỡng não	CTCP Traphaco	5.4751	0,40 mg/viên	1,4mg/viên
Viên nang mềm Cebraton	CTCP Traphaco	0.4159	8,6 mg/viên	22,4mg/viên

IV. BÀN LUẬN

4.1. Về đánh giá quy trình phân tích. Qua khảo sát các điều kiện tối ưu của phương pháp như: Độ đặc hiệu, khoảng tuyến tính, độ lặp lại, độ tái lập, hiệu suất thu hồi chúng tôi đánh giá phương pháp nghiên cứu hoàn toàn phù hợp để áp dụng vào phân tích các mẫu nghiên cứu

4.2. Về xác định hàm lượng Quercetin. Với quy trình đã xây dựng được, chúng tôi áp dụng để phân tích Quercetin trong các mẫu gồm cả thuốc Đông dược và TPBVSK đang có mặt trên địa bàn tỉnh Hà Tĩnh. Qua đó, chúng tôi xác định được hàm lượng Flavonoid toàn phần có trong mẫu, đây là một chỉ tiêu thiết yếu với các mẫu có thành phần là các loại cao có hoạt chất tác dụng là các flavonoid. Quy trình này có thể giúp xác định hàm lượng Flavonoid tổng trong các loại cao là nguyên liệu dùng làm thuốc hay TPBVSK, xem loại cao có đạt chuẩn hay không.

V. KẾT LUẬN

Đã xây dựng được quy trình định lượng quercetin bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao. Quy trình phân tích được kiểm soát chất lượng và đạt độ lặp lại cao với RSD < 2,0% (n = 9); đạt độ đúng tốt với độ thu hồi từ

103,9% - 119,6%.

Đã áp dụng thành công quy trình xây dựng để phân tích quercetin trong 4 mẫu gồm thuốc Đông dược và TPBVSK đang lưu hành trên thị trường tỉnh Hà Tĩnh.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Bộ môn hoá phân tích (2007)**, Hoá phân tích II, Trường Đại học Dược Hà Nội.
- Bộ Y tế (2005)**, Dược thư quốc gia, NXB Y học Hà Nội.
- Nguyễn Minh Đức (2006)**, Sắc ký lỏng hiệu năng cao và một số ứng dụng vào nghiên cứu, kiểm nghiệm dược phẩm, dược liệu và hợp chất tự nhiên, NXB Y học TP Hồ Chí Minh.
- Viện kiểm nghiệm Trung ương (2010)**, Đảm bảo chất lượng thuốc và một số phương pháp kiểm nghiệm thuốc, NXB Y học.
- Viện kiểm nghiệm vệ sinh an toàn quốc gia (2010)**, Thẩm định phương pháp phân tích hoá học và vi sinh vật, NXB Khoa học và kỹ thuật Hà Nội.
- Viện kiểm nghiệm Thành phố Hồ Chí Minh (2018)**, Thử nghiệm thành thạo: Xác định hàm lượng flavonoid toàn phần trong cao khô bạch quả.
- Viện kiểm nghiệm thuốc trung ương (2015)**, Thử nghiệm thành thạo: Định lượng Quercetin thủy phân trong viên nén bao phim cao bạch quả bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao.
- Tiêu chuẩn cơ sở Viên nang mềm Cebraton (2013)**, Công ty cổ phần Traphaco.