

động và khả năng gắn kết đồng thời nhiều phân tử hợp chất. Do đó, mô hình pharmacophore cần kết hợp cùng với mô hình QSAR và mô hình mô tả phân tử docking trên kênh hERG (kênh đóng và mở) sẽ giúp ích cho quá trình phát triển thuốc mới nhằm loại trừ các chất có khả năng ức chế kênh kali hERG và tránh khả năng tương tác chéo với cytochrom P450. Nghiên cứu giúp ích cho quá trình thiết kế và tối ưu các hợp chất bằng cách loại bỏ các tính chất phân tử có thể làm tăng sự gắn kết gây ức chế kênh hERG, tăng tính bền chuyển hóa, giảm khả năng ức chế cytochrom P450 mà hậu quả là tương tác thuốc-thuốc khi phối hợp trong điều trị. Từ đó mang lại lợi ích về chi phí và về thời gian cho quá trình phát triển thuốc mới.

Summary

A 3D-pharmacophore model of high affinity hERG blockers was developed from a dataset of 42 compounds with hERG $IC_{50} \leq 1\mu M$ ($pIC_{50} \geq 6$). The 4-point pharmacophore consisting of a hydrogen-bond acceptor (Acc), an aromatic ring (Aro|PIR) and two hydrophobic features (Hyd) was resulted in an accuracy scoring of 93% (39/42 compound) for actives and overlapped

the scoring of 24.04. The obtained results could be useful for designing new novels with or without hERG blockade.

Tài liệu tham khảo

1. Vaz R. J., Klabunde T. (2008), "Antitargets: Prediction and Prevention of Drug Side Effects", *Methods and Principles in Medicinal Chemistry*, 38, 103-108.
2. Thai K. M., Ecker G. F. (2007), "Predictive Models for hERG Channel Blockers: Ligand-Based and Structure-Based Approaches", *Current Medicinal Chemistry*, 14, 3003-3026.
3. Choe H. et al. (2006), "A novel hypothesis on the binding mode of hERG channel blockers", *Biochem Biophys. Res. Commun.*, 344, 72-78
4. Thai K. M., Ecker G. F. (2008), "Classification Models for hERG Inhibitors by Counter-Propagation Neural Networks", *Chem. Biol. Drug Des.*, 72, 279-289.
5. Thai K. M., Windisch A., Stork D., Weinzinger A., Schlesaro A., Guy R. H., Timin E. N., Hering S., Ecker G. F. (2010), "The hERG Potassium Channel and Drug Trapping: Insight from Docking Studies with Propafenone Derivatives", *Chem. Med. Chem.*, 5, 436-442.
6. Stansfeld P. et al. (2007), "Drug Block of the hERG Potassium Channel: Insight From Modeling", *Proteins*, 68, 568-580.

Xác định hàm lượng một số flavonoid trong thực phẩm chức năng bằng phương pháp HPLC

Nguyễn Tường Vy¹, Cao Công Khánh²

¹Trường đại học Dược Hà Nội

²Viện Kiểm nghiệm An toàn Vệ sinh Thực phẩm Quốc Gia

Đặt vấn đề

Flavonoid là một nhóm hợp chất gặp nhiều trong dược liệu và hiện nay do nhiều công dụng của các flavonoid^[1] mà các dược liệu này được đưa vào để sản xuất thực phẩm chức năng. Khi niềm tin của con người vào thực phẩm chức năng ngày càng cao thì có một vấn đề đặt ra, đó là chất lượng của các sản phẩm này trên thị trường. Do đó, chúng tôi tiến hành nghiên cứu này nhằm xây dựng một phương pháp để xác

định hàm lượng các flavonoid trong thực phẩm chức năng.

Nguyên liệu, phương pháp nghiên cứu

Hóa chất, thiết bị

Hóa chất

- Các chất chuẩn: Daidzein (>98%, Sigma-Aldrich), luteolin (>98%, Sigma-Aldrich), kaempferol ($\geq 90\%$, Sigma-Aldrich), rutin hydrat

(≥ 98%, Dr Ehrenstorfer), genistein (≥ 99,5%, Dr Ehrenstorfer), quercetin (≥ 98%, Sigma-Aldrich), myricetin (≥ 96%, Sigma-Aldrich)

- Các loại hóa chất, thuốc thử phải đạt yêu cầu dùng cho HPLC.

- Dung dịch chiết: Lấy 800 ml methanol và thêm nước cất vào bình định mức vừa đủ 1 L, lắc đều, thu được dung dịch chiết mẫu 80% methanol.

Thiết bị, dụng cụ

- Máy HPLC Shimadzu, detector PDA.

- Cân kỹ thuật XT1200; cân phân tích Mettler Toledo, máy đo pH Meter 744, máy rung siêu âm (Elma, Germany), máy ly tâm.

- Hệ thống chiết pha rắn SPE (Supelco), cột chiết pha rắn C18-E (500 mg, 3 ml) của Phenomenex.

Đối tượng, phương pháp nghiên cứu

Đối tượng nghiên cứu

Đối tượng nghiên cứu là 12 mẫu thực phẩm chức năng thuốc các dạng bào chế khác nhau được lấy ngẫu nhiên và được đánh số ngẫu nhiên từ SP 1 đến SP 12: 1 mẫu dạng lỏng (Flavin 07 - SP 8); 3 mẫu dạng viên nang mềm (Ginkgo biloba - SP 7, SP 11, SP 12); 1 mẫu dạng bột (Herbal tea concentrate - SP 6); 3 mẫu dạng viên nén (Ginkgo intensiv - SP 1, Ginkgo 100 Sovita-SP 4, Estromineral - SP 10); 4 mẫu dạng viên nang cứng (MT - Madalux - SP 2, Atzopic - SP 3, Antiox+ - SP 5, Medisoya - SP 9)

Phương pháp nghiên cứu

Hàm lượng các flavonoid trong mẫu thực phẩm chức năng được xác định dựa trên cơ sở kỹ thuật sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC). Việc định lượng dựa vào chiều cao pic của các flavonoid trong dung dịch thử thu được trên sắc ký đồ và chiều cao pic, nồng độ của các flavonoid trong dung dịch chuẩn với điều kiện nồng độ dung dịch thử và nồng độ dung dịch chuẩn nằm trong khoảng nồng độ tuyến tính.

Kết quả và bàn luận

Xây dựng phương pháp phân tích

Dựa vào các tài liệu tham khảo^[2-6], chúng tôi lựa chọn quy trình chiết mẫu và phân tích mẫu như sau:

Xử lý mẫu sơ bộ

Đối với mẫu viên nén, viên nang cứng, dạng bột: Cân chính xác 1-2 g mẫu trên cân phân tích

vào cốc có mỏ 100 ml. Thêm 30 ml dung dịch chiết, rung siêu âm 10-15 phút. Gạn phần dịch vào bình định mức 50 ml, xử lý cạn lần 2 với 15 ml dung dịch chiết. Định mức bằng dung dịch chiết đến vạch. Pha loãng 2 ml dịch bằng khoảng 50 ml nước tinh khiết, loại tạp và làm sạch mẫu qua cột chiết pha rắn SPE C18-E.

Đối với mẫu viên nang mềm: Cân khoảng 1-2 g mẫu đã trộn đều trên cân phân tích cho vào ống ly tâm 50 ml. Thêm 30 ml dung dịch chiết, rung siêu âm 15 phút, thêm 20 ml n-hexan, lắc đều ly tâm với tốc độ 6000 vòng/phút trong 5 phút. Phần dung môi phía trên được lấy ra lắc tiếp với 15 ml dung dịch chiết. Gộp dịch chiết, định mức đủ 50 ml, sau đó tiến hành như với viên nén và viên nang cứng.

Đối với mẫu dạng lỏng: Hút chính xác 5-10 ml cho vào bình định mức 50 ml. Định mức bằng dung dịch chiết. Rung siêu âm 10 phút. Lọc vào bình định mức 50 ml. Định mức đến vạch bằng dung dịch chiết. Sau đó tiến hành như với viên nén và viên nang cứng.

Làm sạch mẫu

Dịch xử lý sơ bộ được làm sạch bằng cách sử dụng cột chiết pha rắn C18. Hoạt hóa cột với 6 ml n-hexan, 6 ml methanol, 6 ml nước. Nạp dịch lên cột. Rửa giải loại tạp chất lần lượt bằng 6 ml nước, 3 ml dung dịch methanol 10%. Chất phân tích được rửa giải ra bằng 2 ml methanol/lần x 2 lần rồi tiêm sắc ký.

Điều kiện sắc ký

Pha tĩnh: Cột C18 Symmetry Waters (250 mm x 4,6 mm; 5 µm) và liên cột, nhiệt độ cột: 40°C, tốc độ dòng: 1,1 ml/phút, thể tích tiêm mẫu: 50 µl, detector PDA quét phổ từ 200-450 nm, lấy sắc đồ ở 2 bước sóng 260 nm (với daidzein và genistein) và 360 nm (với rutin, quercetin, myricetin, luteolin, kaempferol).

Pha động: Chạy theo chương trình gradient nồng độ.

Cách tiến hành

Dung dịch chuẩn gốc: Cân chính xác 0,010 g từng lượng chất chuẩn vào cốc có mỏ 50 ml, hòa tan và chuyển vào bình định mức 50 ml, định mức bằng methanol ở nhiệt độ phòng, lắc kỹ. Bảo quản trong điều kiện lạnh 4°C.

Dung dịch chuẩn hỗn hợp làm việc: Hút 1 ml các dung dịch chuẩn gốc khác cho vào một

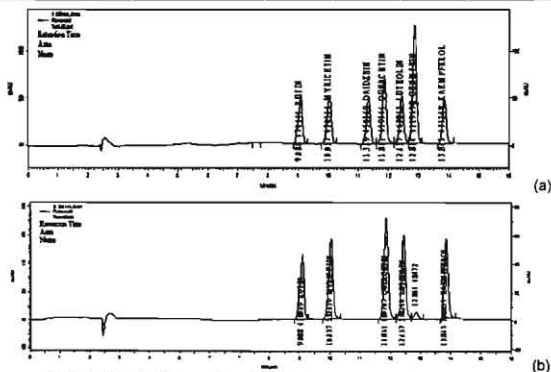
binh định mức 10 ml, định mức bằng methanol, lắc kỹ.

Dung dịch thử: xử lý mẫu theo quy trình tương ứng để thu được dung dịch thử.

Tiêm lần lượt dung dịch chuẩn, dung dịch thử vào hệ thống sắc ký. Dựa vào thời gian lưu và diện tích pic thu được trên sắc ký đồ của các flavonoid trong dung dịch chuẩn và dung dịch thử để xác định các flavonoid trong mẫu.

Bảng 1: Chương trình gradient nồng độ của pha động

Thời gian (phút)	0	1	3	13	14	16
Thành phần pha động (%)	A	90	90	50	30	90
	B	10	10	50	70	10



Hình 1: Sắc độ của dung dịch chuẩn hỗn hợp làm việc của các flavonoid ở bước sóng 260 nm (a) và 360 nm (b)

Lựa chọn dung môi chiết mẫu

Tiến hành khảo sát các nồng độ methanol 90%, 80%, 70%, 60% dùng để chiết mẫu là viên nén Ginkgo Intensiv, nhận thấy khi sử dụng methanol 80% thu được hiệu suất chiết cao nhất. Do đó, dung môi này được chọn làm dung dịch chiết mẫu.

Độ đặc hiệu

Tiến hành phân tích theo các điều kiện sắc ký đã lựa chọn ở trên với mẫu dung dịch chuẩn hỗn hợp làm việc, mẫu trắng (viên nang cứng Antiox+) và mẫu trắng có thêm dung dịch chuẩn hỗn hợp làm việc và so sánh phổ của các mẫu trên. Kết quả cho thấy, trên sắc độ của mẫu

Thẩm định phương pháp

Lựa chọn điều kiện pha động

Sau khi khảo sát các pha động theo các tài liệu tham khảo^[2-6], chúng tôi thấy với pha động gồm 2 thành phần A: methanol và B: đệm acid formic/natri format pH = 2,9-3,0 có 1% THF thì sắc độ thu được có 7 pic tương ứng với 7 flavonoid đã tách hoàn toàn, hình dạng pic cân xứng, sắc độ chạy ổn định.

trắng không xuất hiện các pic của các flavonoid, còn sắc độ của mẫu dung dịch chuẩn hỗn hợp làm việc và mẫu trắng có thêm dung dịch chuẩn hỗn hợp làm việc thì thời gian lưu của các flavonoid là giống nhau, đồng thời các pic cũng có phổ giống nhau.

Khoảng nồng độ tuyến tính

Pha loãng dung dịch chuẩn hỗn hợp làm việc, bơm vào hệ thống HPLC và xây dựng đường chuẩn. Kết quả cho thấy các đường chuẩn biểu diễn sự phụ thuộc tuyến tính của diện tích pic với nồng độ các flavonoid tương ứng là đạt yêu cầu và được chấp nhận.

Bảng 3: Khoảng tuyến tính và phương trình đường chuẩn của các flavonoid

Chất	Khoảng tuyến tính (ppm)	Phương trình đường chuẩn	Hệ số tương quan
Rutin	0,65-20,8	$y = 99812x + 13002$	$R = 1$
Myricetin	0,21-13,6	$y = 201244x + 5020,2$	$R = 1$
Daidzein	0,43-13,8	$y = 163979x + 11402$	$R = 1$
Quercetin	0,23-14,5	$y = 237656x + 9231,7$	$R = 0,9999$
Luteolin	0,31-10,0	$y = 285390x + 20226$	$R = 0,9999$
Genistein	0,36-11,6	$y = 473679x + 40407$	$R = 1$
Kaempferol	0,14-9,0	$y = 291548x + 2827,4$	$R = 1$

Độ lặp lại- Độ chính xác

Để khảo sát độ lặp lại và độ chính xác, lấy 6 mẫu trắng (viên nang cứng Antiox+) và 6 mẫu trắng (viên nang mềm Ginko biloba) không phát hiện các flavonoid trong nghiên cứu, thêm vào mỗi mẫu 0,4 ml dung dịch

chuẩn hỗn hợp. Xử lý mẫu và tiêm mẫu vào hệ thống HPLC ở các điều kiện đã chọn. Độ lặp lại của phương pháp được đánh giá thông qua hệ số biến thiên RSD (%). Độ chính xác của phương pháp được đánh giá thông qua độ thu hồi R(%).

Bảng 4: Kết quả đánh giá độ lặp lại và độ chính xác trên nang cứng

Chất	Rutin	Myricetin	Daidzein	Quercetin	Luteolin	Genistein	Kaempferol
RSD(%)	1,6	1,71	1,41	1,42	1,63	1,78	1,56
R(%)	95,9	85,8	99,3	92,5	100,3	97,6	89,2

Bảng 5: Kết quả đánh giá độ lặp lại và độ chính xác trên nang mềm

Chất	Rutin	Myricetin	Daidzein	Quercetin	Luteolin	Genistein	Kaempferol
RSD(%)	3,57	5,15	3,19	3,09	3,38	3,53	4,37
R(%)	91,8	86,5	87,3	89,7	91,2	92,9	88,8

Giới hạn phát hiện, giới hạn định lượng

Ta tiến hành pha loãng dung dịch chuẩn hỗn hợp làm việc nhiều lần bằng dịch thu được khi chiết mẫu trắng, sau đó tiêm vào hệ thống HPLC. Từ các sắc đồ thu được, ta xác định tín hiệu của các chất phân tích gấp 3 lần nhiễu nền. Như vậy, ta có giới hạn phát hiện và giới hạn định lượng của các flavonoid.

Bảng 6: Kết quả đánh giá giới hạn phát hiện, giới hạn định lượng

Chất	LOD (ppm)	LOQ = 3 x LOD (ppm)
Rutin	0,041	0,122
Myricetin	0,027	0,080
Daidzein	0,027	0,081
Quercetin	0,028	0,085
Luteolin	0,020	0,059
Genistein	0,023	0,068
Kaempferol	0,018	0,053

Áp dụng phương pháp để kiểm tra một số mẫu trên thị trường

Bảng 7: Kết quả phân tích hàm lượng (mg/viên) của các flavonoid trên 12 mẫu sản phẩm

Chất	SP 1	SP 2	SP 3	SP 4	SP 5	SP 6	SP 7	SP 8	SP 9	SP 10	SP 11	SP 12
Rutin	0,73	-	1,21	0,40	-	-	-	-	-	-	0,88	2,28
Myricetin	0,53	-	0,07	-	-	-	-	-	-	-	0,15	-
Daidzein	-	28,9	-	-	-	-	-	-	-	2,32	-	-
Quercetin	2,95	-	0,13	5,85	-	-	-	-	-	-	1,27	-
Luteolin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Genistein	-	2,26	0,02	0,19	-	-	-	-	0,03	0,26	-	-
Kaempferol	0,13	-	0,09	-	-	-	-	-	-	-	2,41	-

(-): Không phát hiện

Kết luận

Phương pháp xác định flavonoid trong thực phẩm chức năng đã được xây dựng gồm quy trình chiết mẫu và quy trình phân tích các flavonoid bằng HPLC pha đảo với detector PDA. Phương pháp đã được thẩm định về độ đặc hiệu, khoảng tuyến tính, độ lặp lại, độ chính xác và giới hạn phát hiện. Kết quả thẩm định phương pháp cho thấy quy trình đã xây dựng phù hợp để áp dụng nhằm xác định sự có mặt của các flavonoid trong thực phẩm chức năng. Áp dụng phương pháp để kiểm tra các mẫu trên thị trường, nhận thấy có 4 mẫu (mẫu phân tích Antiox+ - SP 5, Herbal tea concentrate - SP 8, Ginkgo biloba - SP 7 và Flavin 07 - SP 8) trong 12 mẫu không phát hiện thấy bất kỳ flavonoid nào trong nghiên cứu.

Summary

A method of reversed phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC) coupled with a Photodiode array detector (PAD) was developed for determination of seven flavonoids in functional foods. Flavonoids were extracted with methanol 80% on ultrasonic bath two times (15 min, each) then purified by solid phase extraction with Supelco SPE C18-E. Seven compounds were separated on C18 column (250 mm x 4 mm, 5 μ m particle) by gradient elution with methanol and formic acid/sodium format (pH = 2.9-3.0) (including 1% TFA), run time 16 min. Maximum ultraviolet (UV) absorbance peak at 260nm was for both daidzein and genistein; the other one at 360nm was for the 5 rest flavonoids. The recoveries of

these compounds ranged at 85.81-100.33%; and within relatively wide concentration ranges, their linearities were desirably good ($r \geq 0.9999$) with satisfactory repeatabilities (RSD < 2%). Practically, the method was simple and efficient.

Keywords: Flavonoids, RP- HPLC, functional foods, PDA, determination.

Tài liệu tham khảo

1. Ngô Văn Thu (2007), *Dược liệu học*, tập 1, NXB Y học, Hà Nội, tr.259-289.
2. Chunying Luo, Xiaoli Zou, Yuanqian Li, Chengjun Sun, Yan Jiang, Zhiyun Wu (2011), "Determination of flavonoids in propolis-rich functional foods by reversed phase high performance liquid chromatography with diode array detection", *Food Chemistry*, 127, pp. 314-320.
3. Fang Fang, Jing-Ming Li, Qiu-Hong Pan, Wei-Dong Huang (2005), "Determination of red wine flavonoids by HPLC and effect of aging", *Food Chemistry*, 101, pp. 428-433.
4. Hao Chen, Yuegang Zuo, Yiwei Deng (2001), "Separation and determination of flavonoids and other phenolic compounds in cranberry juice by high-performance liquid chromatography", *Journal of Chromatography A*, 913, pp. 387-395.
5. M. Carení, L. Elvin, A. Mangia (2000), "Spectrophotometric and coulometric detection in the high-performance liquid chromatography of flavonoids and optimization of sample treatment for the determination of quercetin in orange juice", *Journal of Chromatography A*, 881, pp. 449-460.
6. Min Yea, Yan Lib, Yuning Yanc, Huwei Lub, Xiuhong Jic (2002), "Determination of flavonoids in Semen Cuscutae by RP-HPLC", *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 28, pp. 621-628.

Kết quả... (Tiếp theo trang 53)

2. Võ Văn Chí (1999), *Từ điển cây thuốc Việt Nam*, NXB. Y học, TP. Hồ Chí Minh, tr. 754, 1337, 1338.
3. Võ Văn Chí (2003), *Từ điển thực vật thông dụng*, tập 1, NXB. Khoa học và kỹ thuật, Hà Nội, tr. 515, 516, 518, 519.
4. Phạm Hoàng Hộ (1970), *Cây cỏ miền Nam Việt Nam*, quyển 1, Bộ Văn hóa Giáo dục và Thanh niên-Trung tâm Học liệu, TP. Hồ Chí Minh, tr. 828, 829, 831.

5. Phạm Hoàng Hộ (2003), *Cây cỏ Việt Nam*, tập 1, NXB. Trẻ, TP. Hồ Chí Minh, tr. 840-844.
6. Đỗ Tất Lợi (1995), *Những cây thuốc và vị thuốc Việt Nam*, NXB. Khoa học và kỹ thuật, Hà Nội, tr. 870, 871, 672, 673.
7. Wu Z. Y., P. H. Raven, D. Y. Hong et al. (2010), *Flora of China*, Vol. 10 (Fabaceae), Science Press., Beijing, and Missouri Botanical Garden Press., St. Louis, pp. 41-47.