

Nghiên cứu định lượng quercetin nguyên liệu bằng phương pháp HPLC

Thái Duy Thìn, Vũ Đức Lợi, Đặng Thị Ngọc Thư

Trường đại học Dược Hà Nội

Đặt vấn đề

Hiện nay, quercetin đang được sử dụng khá rộng rãi, chủ yếu dưới dạng thực phẩm chức năng và có mặt trên thị trường dược phẩm với những dạng bào chế khác nhau như: viên nén, viên nang, dạng dung dịch... với tác dụng chính là chống oxy hoá. Việc xác định hàm lượng của quercetin trong nguyên liệu và các thực phẩm chức năng này là rất cần thiết. Tuy nhiên, ở nước ta chưa có phương pháp định lượng quercetin chính thức trong các tiêu chuẩn ngành và quốc gia. Trên thế giới có một số phương pháp định lượng quercetin nhưng cũng còn những hạn chế và chưa phù hợp với điều kiện cơ sở ở Việt Nam^[2,3]. Vì vậy, chúng tôi xin giới thiệu: Phương pháp xác định hàm lượng quercetin nguyên liệu bằng HPLC.

Thực nghiệm và kết quả

Hoá chất, thiết bị

Hoá chất, thuốc thử

- Các hóa chất thuộc loại HPLC hoặc PA.
- Acid phosphoric đặc (H_3PO_4) PA.
- Muối kali dihydrophosphat (KH_2PO_4) PA.
- Methanol, acetonitril dùng cho HPLC
- Quercetin: chất đối chiếu (hàm lượng 98%) do Viện Đo lường chất lượng cung cấp.

Thiết bị, dụng cụ

- Máy sắc ký lỏng hiệu năng cao: DIONEX-detector UV Diode array- PDA100.
- Máy quang phổ UV- VIS lamda EZ 210.
- Máy siêu âm Sonorex.
- Máy đo pH Meter 3305 - Jenway.
- Máy lọc chân không Sartorius.
- Các dụng cụ thủy tinh đạt chất lượng dùng cho phân tích.

Đối tượng nghiên cứu

- Các mẫu quercetin của Liên hiệp khoa học sản xuất công nghệ mới.

Phương pháp

Điều kiện HPLC

- Cột sắc ký Nucleosil C18 (250 x 4 mm, 5 μ m).
- Detector UV: 371nm.
- Pha động: Methanol - acetonitril - đệm phosphat 0,01M pH 3 = 30: 60: 10
- Thể tích tiêm: 10 μ l.
- Tốc độ dòng: 0,6 ml/ phút.
- Nhiệt độ phân tích: Nhiệt độ phòng thí nghiệm.

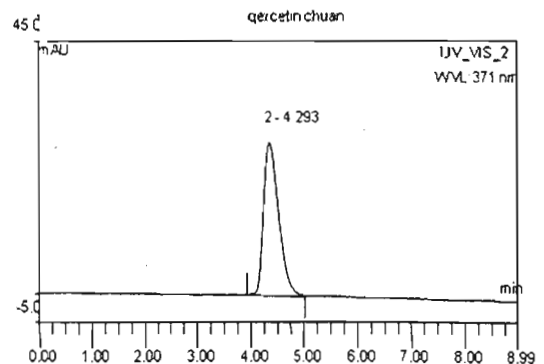
Xử lý mẫu

- **Mẫu thử:** Cân chính xác khoảng 10 mg quercetin nguyên liệu cho vào bình định mức 10,0 ml. Hòa tan và pha loãng bằng hệ dung môi của pha động. Lấy chính xác 100 μ l dung dịch trên cho vào bình định mức 10,0 ml. Thêm dung môi vừa đủ đến vạch, lắc đều được dung dịch có nồng độ 10 μ g/ml. Lọc qua màng lọc 0,45 μ m.

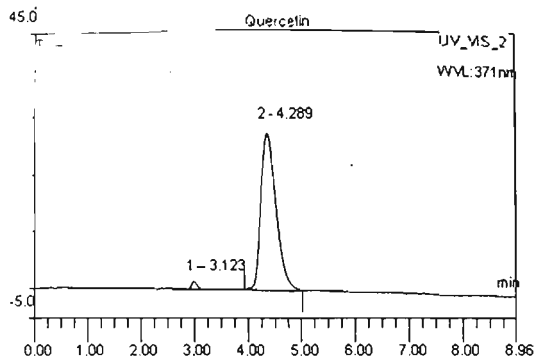
- **Mẫu chuẩn:** Cân, pha dung dịch quercetin chuẩn có nồng độ 10 μ g/ml bằng hệ dung môi của pha động như mẫu thử. Lọc qua màng lọc 0,45 μ m.

Kết quả và bàn luận

Sắc ký đồ của mẫu thử và mẫu chuẩn



Hình 1: Sắc ký đồ của mẫu chuẩn



Hình 2: Sắc ký đồ của mẫu thử

Tiến hành định lượng 5 mẫu thử và 5 mẫu chuẩn quercetin theo chương trình đã lựa chọn. Kết quả định lượng được trình bày ở bảng 1.

Bảng 1: Kết quả định lượng quercetin nguyên liệu mẫu

STT	Mẫu thử		Mẫu chuẩn		Hàm lượng quercetin
	Lượng cân (mg)	Diện tích pic (mAU.min)	Lượng cân (mg)	Diện tích pic (mAU.min)	%
1	10,2	13,389	10,1	13,216	98,31
2	10,1	13,235	10,2	13,312	98,40
3	10,2	13,729	10,1	13,523	98,52
4	10,3	13,243	10,3	13,195	98,36
5	10,3	13,500	10,4	13,556	98,54

* Số liệu thống kê của bảng 1:

$$\bar{X} = 98,43; S = 0,1453$$

$$\text{Sai số chuẩn: } S_x = 0,065$$

$$\text{Độ lệch chuẩn tương đối: } RSD = 0,148\%;$$

$$\Delta X = t_{\alpha(n-1)} S_x = 0,18$$

$$\text{Khoảng tin cậy } \mu = 98,43 \pm 0,18$$

Nhận xét: Kết quả trình bày ở bảng 1 cho thấy mẫu nguyên liệu quercetin 1 đem định lượng có hàm lượng là: 98,43%.

Bảng 3: Kết quả khảo sát tính chính xác

STT	1	2	3	4	5	6
Diện tích pic(mAU.min)	13,045	13,055	13,045	13,065	13,055	13,065
Số liệu thống kê: $\bar{x} = 13,055$; $S = 0,0089$; $RSD = 0,0684$						

Kết quả cho thấy, trong các điều kiện sắc ký đồ chọn, độ lệch chuẩn tương đối của các kết quả là $0,0684 \ll 2\%$. Như vậy phương pháp là chính xác.

Đánh giá phương pháp định lượng

Chúng tôi tiến hành đánh giá phương pháp định lượng quercetin nguyên liệu bằng HPLC mới xây dựng với các chỉ tiêu sau: tính thích hợp của hệ thống sắc ký, tính chính xác, tính tuyến tính, tính đúng, tính đặc hiệu [1].

Thử tính thích hợp của hệ thống sắc ký

Cân, pha dung dịch quercetin chuẩn có nồng độ 10 $\mu\text{g/ml}$ bằng hệ dung môi của pha động như mẫu thử. Lọc qua màng lọc 0,45 μm , dùng dịch lọc tiêm sắc ký 5 lần.

Kết quả khảo sát tính thích hợp của hệ thống sắc ký được trình bày ở bảng 2.

Bảng 2: Kết quả khảo sát tính thích hợp của hệ thống HPLC

STT	Pic của quercetin		
	Thời gian lưu (phút)	Diện tích pic (mAU)	Hệ số bất đối xứng (AF)
1	4,220	13,065	1,75
2	4,213	13,195	1,69
3	4,243	13,106	1,74
4	4,207	12,919	1,76
5	4,213	12,995	1,72
RSD(%)	0,334	0,807	

Kết quả khảo sát cho thấy độ lệch chuẩn tương đối (RSD%) của thời gian lưu và diện tích pic quercetin trong 5 phép thử đều nhỏ hơn 2%. Điều này chứng tỏ hệ thống HPLC mà chúng tôi sử dụng là phù hợp và đảm bảo sự ổn định cho phép phân tích định lượng quercetin.

Khảo sát, đánh giá phương pháp

Tính chính xác

Xác định ở nồng độ làm việc của quercetin là 0,01 mg/ml.

Pha 6 mẫu thử quercetin chuẩn ở nồng độ 0,01 mg/ml.

Kết quả khảo sát tính chính xác được trình bày ở bảng 3.

Tính tuyến tính

Pha 5 mẫu quercetin có nồng độ lần lượt là: 0,008; 0,009; 0,010; 0,011; 0,012 mg/ml. Mỗi nồng độ tiến hành sắc ký theo điều kiện đã chọn

● Nghiên cứu – Kỹ thuật

3 lần, lấy kết quả trung bình. Kết quả khảo sát khoảng tuyến tính được trình bày ở bảng 4.

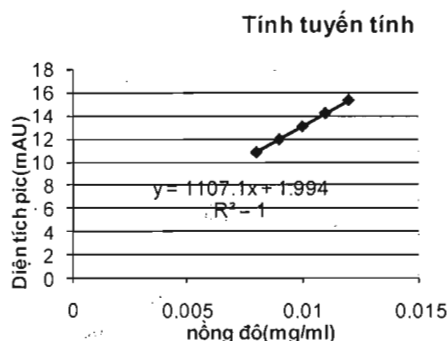
Bảng 4: Kết quả khảo sát tính tuyến tính

Bình	1	2	3	4	5
Nồng độ quercetin (mg/ml)	0,008	0,009	0,010	0,011	0,012
Diện tích pic (mAU.min)	10,681	11,861	12,960	14,072	15,206

Phương trình hồi quy: $y = 1126,1x + 1,695$; với $R = 0,9999$, $S_b = 0,0741$,

Với độ tin cậy 95% ta có khoảng tin cậy của $y_{intercept}$: $0,0741 \pm 0,2358$ hay $-0,1617 < y_{intercept} < 0,3099 \Rightarrow$ chứa gốc tọa độ.

Đồ thị biểu diễn sự phụ thuộc tuyến tính giữa nồng độ và diện tích pic của quercetin được ghi ở hình 3:



Hình 3: Đồ thị biểu diễn sự phụ thuộc tuyến tính giữa nồng độ và diện tích pic của quercetin

Như vậy phương pháp tuyến tính trong khoảng nồng độ khảo sát từ 0,008mg/ml - 0,012mg/ml hay tuyến tính trong khoảng nồng độ từ 80% đến 120% nồng độ làm việc.

Tính đúng

Vì quercetin chưa xác định rõ hàm lượng nên xác định tính đúng phải khảo sát ở 3 mức nồng độ theo dãy nồng độ khảo sát là: 80%, 100%, 120% so với nồng độ làm việc.

Tiến hành

+ Pha mẫu thử: Pha lần lượt 3 mức nồng độ 0,008 mg/ml, 0,01 mg/ml, 0,12 mg/ml

+ Pha mẫu chuẩn (đối chiếu): Pha dung dịch quercetin chuẩn nồng độ 0,010mg/ml.

Tiến hành chạy sắc ký mỗi dung dịch chạy 3 lần. Tính hàm lượng phần trăm của quercetin có trong mẫu thử dựa trên chuẩn đã biết hàm lượng, từ đó tính % tìm lại của mẫu thử.

Kết quả định giá tính đúng của phương pháp được trình bày ở bảng 5.

Mẫu đối chiếu: $S_c = 13,189$ mAU.min

Bảng 5: Kết quả định giá tính đúng của phương pháp

Nồng độ	Diện tích pic TB (mAU.min)	Khối lượng cho vào TB (mg)	Khối lượng tìm lại TB (mg)	% tìm lại TB $= \frac{m_{tìm\ lại}}{m_{cho\ vào}} \times 100\%$
0,008mg/ml	10,479	80	79,45	99,31
0,01 mg/ml	13,142	100	99,64	99,64
0,012mg/ml	15,729	120	119,26	99,38
Chuẩn	13,189	100	13,189	100,0

Tỷ lệ phần trăm tìm lại $\bar{X} = 99,44\%$; $RSD = 0,174$

Phương trình hồi quy tuyến tính: $y = 0,9953x - 0,075$

Độ lệch chuẩn của: $S_a = 0,0082$

Độ lệch chuẩn của $y_{intercept}$: $S_b = 0,083$

Với độ tin cậy 95% ta có:

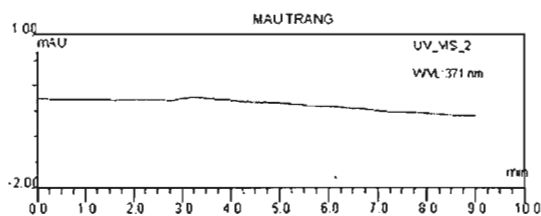
Khoảng tin cậy của độ dốc: $a \pm 12,71S_a$ hay $0,8911 < a < 1,0995 \Rightarrow$ chứa 1 nên không có sai số hệ thống tỷ lệ.

Khoảng tin cậy của $y_{intercept}$: $b \pm 12,71S_b$ hay $-1,125 < b < 0,876 \Rightarrow$ chứa gốc tọa độ nên không có sai số hằng định.

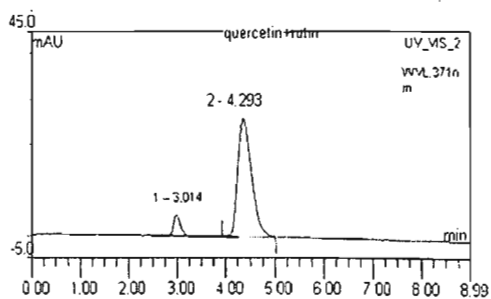
Vậy qua các kết quả trên ta thấy phương pháp có độ đúng tốt trong khoảng khảo sát với khả năng tìm lại là 99,44% và $RSD = 0,174$.

Tính đặc hiệu

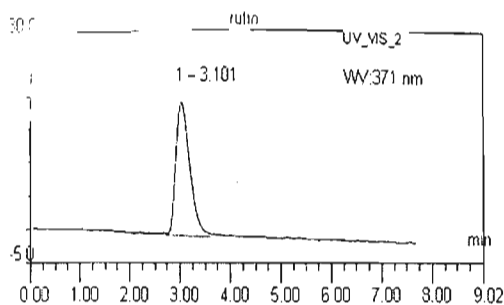
Tiến hành sắc ký dung dịch chuẩn quercetin, rutin chuẩn, mẫu hỗn hợp quercetin và rutin, mẫu trắng và ghi sắc ký đồ. Kết quả ghi ở hình 4; 5; 6; 7.



Hình 4: Sắc ký đồ của mẫu trắng



Hình 5: Sắc ký đồ của mẫu hỗn hợp quercetin và rutin chuẩn



Hình 6: Sắc ký đồ của mẫu chuẩn rutin

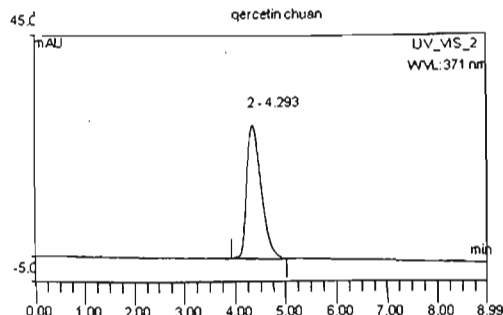
Từ các sắc ký đồ cho thấy phương pháp đặc hiệu đối với quercetin.

Kết luận

Đã xây dựng được chương trình định lượng quercetin bằng phương pháp HPLC đơn giản, dễ thực hiện, với các điều kiện sắc ký như ở trên. Đã tiến hành đánh giá phương pháp định lượng và cho thấy phương pháp thoả mãn tính thích hợp của hệ thống sắc ký, tính chính xác, tính tuyến tính, tính đúng, tính đặc hiệu.

Summary

An HPLC method for determination of quercetin was proposed. The chromatographic conditions were: Column - Nucleosil C18 (250 x 4 mm, 5 μ m); Detector - UV (λ =371nm); Mobile



Hình 7: Sắc ký đồ của quercetin

phase - Methanol-acetonitrile-phosphate buffer 0.1M (pH 3) (V/V 30: 60: 10); Injection volume - 10 μ l; flow rate - 0.6 ml/min. Experimentally, the method was proved time-saving, precise and accurate.

Tài liệu tham khảo

1. Nguyễn Minh Đức, 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, trang 49 -170, (2006)
2. Ping Xiao, Faquiong Zhao, Baizhao Zeng, Voltammetric determination of quercetin at a multi-walled carbon nanotubes paste electrode, *Mircrochemical Journal* (85), p.244-249, (2007)
3. The United states pharmacopeia, p.2278-2282, (2004)

Nghiên cứu... (Tiếp trang 49)

Tài liệu tham khảo

1. Kashiwada Y., Nonaka G., Nishioka I., Chang J. J., Lee K. H., Antitumor agents, 129. Tannins and related compounds as selected cytotoxic agents, *J. Nat. Prod.*, 55, 1033-1043, (1992)
2. Okuda T., Correlation of tannin structures with plant taxonomy and antitumor and antioxidant activities, in *Towards Natural Medicine Research in the 21th Century*, eds. Ageta H., Aimi N., Ebizuka Y., Fujita T, Honda G., Elsevier Science B. V., Tokyo, 15-26, (1998)
3. Phan Minh Giang, Hà Việt Sơn, Phan Tổng Sơn, Study on the chemistry and antimicrobial activity of *Psychotria reevesii* Wall. (Rubiaceae), *Tạp chí Hoá học*, 45, 628-633, (2007)
4. Nguyễn Đức Minh, Thuốc chữa bệnh nhiễm khuẩn từ cây cỏ trong nước, *Nhà xuất bản Y học*, Tp. Hồ Chí Minh, 105-109, (1995)

5. Савронь Е. С., Воронянский В. И., Киселев Г. И., Чечеткин А. В., Докторович Н. Л., *Практикум по Биохимии Животных*, Высшая школа, Москва, 161, (1967)
6. Phan Minh Giang, Hà Việt Bảo, Phan Tổng Sơn, Nghiên cứu hoạt tính chống oxy hoá và khảo sát sơ bộ tác dụng kháng khuẩn, kháng nấm của các phần chiết giàu flavonoid từ lá Xuân hoa (*Pseuderanthemum palatiferum* (Nees) Radlk., *Tạp chí Dược học*, 45, 9-12, (2005)
7. Fernández J., Pérez-Álvarez J. A., Fernández-López J. A., Thiobarbituric acid test for monitoring lipid oxidation in meat, *Food Chemistry*, 59, 345-353, (1997)
8. Phan Minh Giang, Nguyễn Thị Minh Hằng, Phan Tổng Sơn, Ảnh hưởng của các phần chiết giàu flavonoid của hoa kim ngân (*Lonicera japonica* Thunb.) lên độ hoạt động của peroxidase trong máu người, *Tạp chí Dược học*, 46, 18-22, (2006)