



XÂY DỰNG QUY TRÌNH ĐỊNH LƯỢNG RUTIN TRONG VIÊN NÉN BAO PHIM BẢO VỆ SỨC KHỎE BẰNG PHƯƠNG PHÁP SẮC KÍ LỎNG HIỆU NĂNG CAO

Quantitative determination of rutin in film-coated tablet by high performance liquid chromatography

Nguyễn Việt Cường^{1*}, Võ Thị Bạch Huệ²

¹Khoa Dược, Trường Đại học Lạc Hồng

²Khoa Dược, Đại học Y Dược Thành phố Hồ Chí Minh

TÓM TẮT. Rutin là một hoạt chất quý có tác dụng chống oxy hóa, kháng viêm và đặc biệt là tác dụng làm bền thành mạch máu. Một số chế phẩm chứa rutin được sử dụng như thực phẩm chức năng bảo vệ sức khỏe. Nghiên cứu này đã xây dựng được một quy trình định lượng rutin trong viên nén bao phim bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao. Điều kiện sắc ký sử dụng cột InertSustain® C18 (250 x 4,6 mm; 5 μ m), pha động acetonitril - đệm phosphat pH 2,5, tốc độ dòng 1,0 ml/phút, bước sóng phát hiện 335 nm. Kết quả thẩm định cho thấy quy trình định lượng đạt các chỉ tiêu thẩm định theo hướng dẫn của ICH.

TỪ KHÓA: rutin, sắc ký lỏng hiệu năng cao, viên nén bao phim

ABSTRACT. Rutin is a precious active ingredient with antioxidant, anti-inflammatory effects. Especially, rutin can help strengthen and increase flexibility of blood vessels, such as arteries and capillaries. Some rutin-containing preparations are used as food supplements for healthcare. This study has developed a procedure to quantify rutin in film-coated tablet by high-performance liquid chromatography. Chromatographic conditions using InertSustain® C18 column (250 x 4.6 mm; 5 μ m), mixture of acetonitrile and phosphate buffer pH 2.5 as eluent in gradient mode, flow rate of 1.0 ml/min and detection wavelength of 335 nm. The evaluation results show that the quantitative processes satisfied criteria of ICH guidelines.

KEYWORDS: rutin, high performance liquid chromatography, film-coated tablet

1. GIỚI THIỆU

Ngày nay, đi cùng với sự phát triển của xã hội, công nghệ hiện đại, sự gia tăng đáng kể những người mắc các bệnh lý mãn tính như tăng huyết áp, đái tháo đường, nhồi máu cơ tim, đột quỵ, xơ vữa động mạch, đặc biệt ở những người cao tuổi. Con người cũng ngày càng quan tâm đến sức khỏe bản thân hơn nhất là việc phòng ngừa bệnh hơn là chữa bệnh. Nắm bắt được nhu cầu đó, các công ty dược phẩm đã tận dụng nguồn thảo dược vô cùng phong phú của thiên nhiên để nghiên cứu và bào chế những sản phẩm bảo vệ sức khỏe với thành phần chủ yếu từ các thảo dược. Một vài nghiên cứu đã tiến hành bào chế viên nén bao phim từ sự kết hợp từ cao khô một số dược liệu quý cùng rutin với công dụng hỗ trợ chức năng tuần hoàn não, làm bền thành mạch máu, giúp máu lưu thông dễ dàng đồng thời giúp tăng cường sức khỏe và bồi bổ cơ thể^[1]. Tuy nhiên, khó khăn của các nghiên cứu này là chưa có quy trình định lượng các hoạt chất chính nhằm đánh giá công thức bào chế và kiểm nghiệm chất lượng thành phẩm.

Trong nghiên cứu này nhóm tác giả xây dựng quy trình định lượng rutin bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao. Quy trình được thẩm định theo hướng dẫn của ICH^[2].

2. ĐỐI TƯỢNG, PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1 Đối tượng nghiên cứu

Viên nén bao phim chứa cao khô sâm mỹ, rau má, đan sâm, rau đắng biển, tam thất, bạch quả, thiên ma, blueberry cùng với rutin, coenzym Q10, nattokinase và các tá dược. Chất chuẩn rutin từ Sigma-Aldrich, hàm lượng 98,20%.

2.2 Phương pháp nghiên cứu

Tiến hành xây dựng quy trình định lượng rutin toàn phần trong viên nén bao phim bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao^[3]. Quy trình thực hiện trên hệ thống Agilent 1260 với cột sắc ký InertSustain C18 (250 x 4,6 mm, 5 μ m), sử dụng đầu dò phát hiện dây diod quang (DAD) tại bước sóng 355 nm. Nhiệt độ buồng cột 30°C, tốc độ dòng 1,0 ml/phút, thể tích tiêm mẫu 20 μ l bằng bộ phận tiêm mẫu tự động. Hệ dung môi pha động bao gồm acetonitril và dung dịch đệm phosphat pH 2,5 chạy chương trình gradient.

Bảng 1. Chương trình gradient

Thời gian (phút)	% ACN	% đệm phosphat pH = 2,5
0	20	80
7	20	80
9	100	0
17	100	0
18	20	80
24	20	80

Cân chính xác khoảng 10 mg rutin chuẩn, pha trong bình định mức 100 ml với methanol. Lấy chính xác 10 ml dung dịch chuẩn trên, pha loãng với hỗn hợp dung môi methanol-nước (1:4) trong bình định mức 50 ml. Dung dịch rutin chuẩn thu được có nồng độ khoảng 20 μ g/ml.

Hai mươi viên nén bao phim chứa rutin được cạo sạch lớp vỏ bao, cân và tính khối lượng trung bình. Nghiền mịn. Cân

Received: May, 11th, 2019

Accepted: July, 21th, 2019

*Corresponding Author

Email: nguyenvietcuong.shin@gmail.com

một lượng bột thuốc tương ứng với 5 mg rutin (cân chính xác khoảng ¼ khối lượng trung bình một viên) cho vào bình định mức 50 ml, thêm 30 ml methanol, siêu âm 10 phút, thêm methanol vừa đủ 50 ml. Lọc qua giấy lọc xếp nếp, hút chính xác 10 ml dịch lọc, pha loãng với hỗn hợp dung môi methanol-nước (1:4) trong bình định mức 50 ml, lắc đều. Dung dịch mẫu thử có nồng độ rutin khoảng 20 µg/ml.

Mẫu placebo được chuẩn bị từ viên không chứa rutin nhưng có đầy đủ các thành phần khác và được bào chế theo quy trình tương tự như viên mẫu thử. Cân một lượng bột placebo tương ứng với ¼ khối lượng trung bình một viên. Lượng bột placebo này được tiến hành xử lý tương tự như mẫu thử viên nén bao phim.

Hàm lượng rutin toàn phần trong một viên nén bao phim được tính theo công thức (1).

$$X \text{ (mg)} = \frac{St}{Sc} \times \frac{mc}{Nc} \times Nt \times \frac{KLTB \text{ viên}}{mt} \quad (1)$$

Trong đó: Sc: diện tích pic rutin trong sắc kí đồ mẫu chuẩn

St: diện tích pic rutin trong sắc kí đồ mẫu thử

mc: khối lượng cân rutin chuẩn (mg)

mt: khối lượng cân mẫu thử (mg)

Nc: độ pha loãng mẫu chuẩn

Nt: độ pha loãng mẫu thử

KLTB viên: khối lượng trung bình viên (mg)

Quy trình định lượng rutin được thẩm định với các chỉ tiêu: tính tương thích của hệ thống, tính đặc hiệu, tính tuyến tính, độ lặp lại, độ chính xác trung gian, độ đúng theo hướng dẫn của ICH.

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1 Tính tương thích của hệ thống

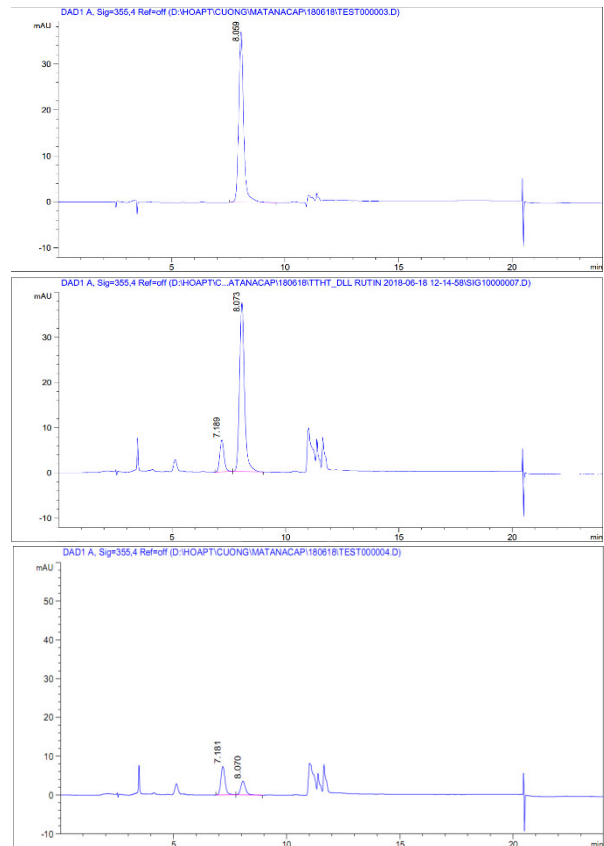
Tiến hành sắc kí 6 lần một mẫu chuẩn có nồng độ khoảng 20 µg/ml. Kết quả thời gian lưu và diện tích pic thu được sau 6 lần sắc kí cho RSD < 2%. Các thông số sắc kí khác đều đạt yêu cầu thẩm định. Như vậy quy trình định lượng rutin đạt yêu cầu tính tương thích hệ thống.

Bảng 2. Kết quả tính tương thích hệ thống

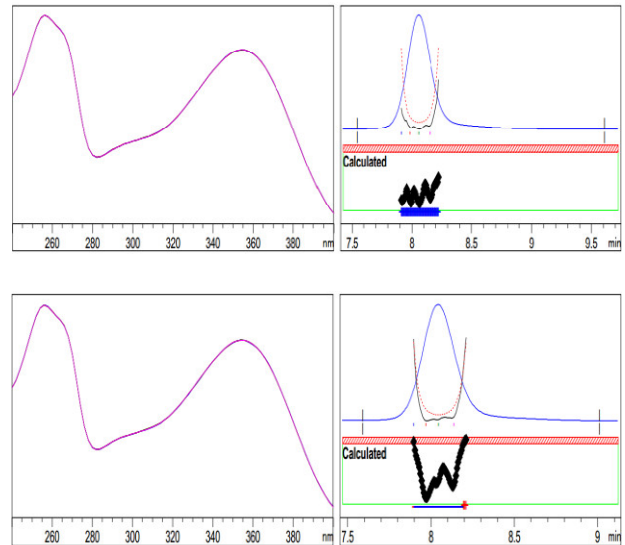
STT	T _R (phút)	Diện tích pic (mAU*s)
1	8,057	563,8
2	8,070	560,8
3	8,060	564,4
4	8,073	563,6
5	8,075	563,0
6	8,075	563,2
Trung bình	8,068	563,1
RSD (%)	0,098	0,220

3.2 Tính đặc hiệu

Tiến hành sắc kí mẫu chuẩn, mẫu thử, mẫu placebo, mẫu thử thêm chuẩn, mẫu dung môi. Kết quả cho thấy mẫu chuẩn đều cho pic có thời gian lưu tương tự nhau. Phổ UV-Vis của hai pic này giống nhau. Độ tinh khiết của các pic này đều đạt yêu cầu. Mẫu thử thêm chuẩn cho diện tích pic lớn hơn so với pic của mẫu thử. Mẫu placebo cũng cho pic tương tự như mẫu chuẩn tương ứng với thành phần cao bạch quả cũng chứa rutin. Sắc kí 6 mẫu placebo được chuẩn bị độc lập nhận thấy diện tích pic tương ứng với rutin trong mẫu placebo có tính lặp lại. Mẫu dung môi không cho pic tại thời gian lưu tương ứng với pic của rutin trong mẫu chuẩn. Như vậy quy trình định lượng rutin có tính đặc hiệu.



Hình 1. Sắc kí đồ mẫu rutin chuẩn, mẫu thử và mẫu placebo



Hình 2. Phổ UV-Vis và độ tinh khiết pic của mẫu rutin chuẩn và mẫu thử

3.3 Tính tuyến tính

Bảng 3. Kết quả tính tuyến tính

Nồng độ rutin trong mẫu (µg/ml)	Diện tích pic (mAU*s)
10	333,7
15	500,8
20	670,2
25	835,1
30	1005,0

Tiến hành sắc kí mẫu rutin chuẩn ở các nồng độ lần lượt là 50%, 75%, 100%, 125% và 150% so với nồng độ định

lượng. Trắc nghiệm thống kê Fisher cho thấy nồng độ rutin và diện tích pic thu được tương quan chặt chẽ với nhau. Khoảng tuyến tính của quy trình định lượng từ 10 - 30 µg/ml.

3.4 Độ lặp lại

Tiến hành sắc kí 6 mẫu thử được chuẩn bị độc lập. Kết quả cho thấy nồng độ rutin trong mỗi mẫu thử cho RSD nhỏ hơn 2%. Do đó, quy trình định lượng rutin trong viên nén bao phim đạt yêu cầu về độ lặp lại.

Bảng 4. Kết quả độ lặp lại

STT	T _R (phút)	Diện tích pic (mAU*s)	Hàm lượng rutin toàn phần (mg)
1	8,073	572,4	20,739
2	8,078	575,2	20,855
3	8,07	579,9	20,955
4	8,066	572,6	20,746
5	8,08	571,3	20,727
6	8,049	572,6	20,746
Trung bình	8,069	574,0	20,795
RSD (%)	0,139	0,551	0,438

Bảng 5. Kết quả độ chính xác trung gian

STT	T _R (phút)	Diện tích pic (mAU*s)	Hàm lượng rutin toàn phần (mg)
1	8,067	572,3	20,749
2	8,059	578,2	20,921
3	8,074	586,2	21,197
4	8,087	575,1	20,892
5	8,081	572,2	20,746
6	8,073	573,0	20,789
Trung bình	8,0735	576,17	20,882
RSD (%)	0,123	0,940	0,817

3.5 Độ chính xác trung gian

Hai kiểm nghiệm viên, mỗi người chuẩn bị 6 mẫu thử độc lập, tiến hành sắc kí trong hai ngày khác nhau.

Trắc nghiệm thống kê cho thấy kết quả hàm lượng rutin thu được của hai kiểm nghiệm viên khác nhau không có ý nghĩa ($\alpha = 0,05$). Quy trình định lượng rutin đạt yêu cầu về độ chính xác trung gian.

3.6. Độ đúng

Chuẩn bị các mẫu placebo thêm chuẩn ở các nồng độ 80%, 100% và 120% so với nồng độ định lượng. Mỗi nồng độ thực hiện 3 mẫu độc lập. Tiến hành sắc kí 9 mẫu trên. Kết quả thu được cho thấy các tỉ lệ hồi phục của mỗi mức nồng độ đều nằm trong khoảng 98 - 102%. Giá trị RSD% của các tỉ lệ hồi phục này nhỏ hơn 2%. Vậy quy trình định lượng rutin đạt yêu cầu về độ đúng.

Bảng 6. Kết quả độ đúng

Chuẩn thêm vào (mg)	Diện tích pic (mAU*s)	Rutin định lượng được (mg)	Rutin trong placebo (mg)	Chuẩn rutin tìm thấy (mg)
16,32	499,6	18,099	1,936	16,162
	501,6	18,171		16,235
	503,3	18,233		16,296
20,40	625,6	22,663		20,727
	624,9	22,638		20,702
	623,1	22,572		20,636
24,48	722,8	26,184		24,248
	730,2	26,452		24,516
	728,9	26,405		24,469

Chuẩn thêm vào (mg)	Rutin định lượng được (mg)	Chuẩn rutin tìm thấy (mg)	Tỷ lệ hồi phục (%)	Trung bình (%)
16,32	18,099	16,162	99,034	99,46
	18,171	16,235	99,478	
	18,233	16,296	99,856	
20,40	22,663	20,727	101,603	101,41
	22,638	20,702	101,478	
	22,572	20,636	101,159	
24,48	26,184	24,248	99,053	99,72
	26,452	24,516	100,147	
	26,405	24,469	99,955	

4. KẾT LUẬN

Đề tài đã xây dựng được quy trình định lượng rutin trong viên nén bao phim bảo vệ sức khỏe trên hệ thống sắc kí lỏng hiệu năng cao với thời gian thực hiện ngắn. Quy trình được thẩm định các yêu cầu theo hướng dẫn của ICH, sẵn sàng ứng dụng thực tế trong nghiên cứu bào chế cũng như trong công tác đảm bảo chất lượng sau này.

5. TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Beatriz Gullon; Thelmo A. Lú-Chau; Maria Teresa Moreira; Juan M.Lema; Gemma Eibes, Rutin: A review on extraction, identification and purification methods, biological activities and approaches to enhance its bioavailability. *Trends in Food Science and Technology*, **2017**, 67, 220-235.
- [2] ICH harmonised tripartite guideline. Validation of Analytical Procedures, *Text and Methodology*, **2005**.
- [3] Vesna Kuntić; Nataša Pejić; Branka Ivković; Zorica Vujić; Katarina Ilić; Svetlana Mičić; Vladana Vukojević. Isocratic RP-HPLC method for rutin determination in solid oral dosage forms, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **2007**, 43 (2), 718-721.