

## XÂY DỰNG QUY TRÌNH ĐỊNH LƯỢNG ĐỒNG THỜI DIOSMIN VÀ QUERCETIN TRONG MICROEMULGEL DQE BẰNG PHƯƠNG PHÁP HPLC-UV

Vũ Lê Hà<sup>1</sup>, Nguyễn Đức Hạnh<sup>1</sup>

### TÓM TẮT

Diosmin và quercetin là hai hoạt chất có tác dụng kháng viêm và làm bền thành mạch, đã được bào chế dưới dạng microemulgel (DQE) hỗ trợ điều trị suy giãn tĩnh mạch. Nghiên cứu được thực hiện nhằm xây dựng quy trình định lượng diosmin và quercetin trong DQE sử dụng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC). Các phương pháp xử lý mẫu và điều kiện sắc ký được sàng lọc và lựa chọn. Quy trình định lượng được thẩm định theo hướng dẫn của ICH. Hỗn hợp gồm methanol (80%) và dimethyl sulfoxid (20%) được chọn làm dung môi để chuẩn bị mẫu thử. Điều kiện HPLC được chọn gồm cột Synchronis C18 (250 × 4,6 mm; 5 μm), bước sóng phát hiện 268 nm, nhiệt độ cột 30°C, tốc độ dòng 0,8 ml/phút và thể tích tiêm là 20 μl. Pha động là hỗn hợp của acetonitril và 0,2% acid formic với tỷ lệ acetonitril tương ứng là 29%, 35% và 55% ở 0-2 phút, 3-4 phút và 5-12 phút. Giới hạn định lượng và nồng độ diosmin (hoặc nồng độ quercetin) có mối tương quan tuyến tính tốt. % RSD độ chính xác trung gian của diosmin và quercetin lần lượt là 1,75% và 0,71%. Độ đúng đạt yêu cầu với tỷ lệ phục hồi của diosmin và quercetin lần lượt là 98,73-100,98% và 99,57 - 100,33%. Nghiên cứu đã xây dựng thành công quy trình định lượng diosmin và quercetin trong DQE. Quy trình định lượng có thể được ứng dụng để đánh giá chất lượng của DQE. **Từ khóa:** HPLC, diosmin, quercetin, microemulgel.

### SUMMARY

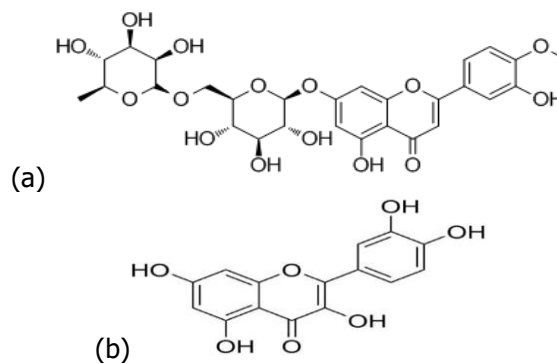
#### DEVELOPMENT OF AN HPLC-UV METHOD FOR SIMULTANEOUS DETERMINATION OF DIOSMIN AND QUERCETIN IN MICROEMULGEL

Diosmin and quercetin have been demonstrated to possess the anti-inflammatory and vascular wall strengthening effects and have been developed as a microemulgel (DQE) to support the treatment of varicose veins. This study aimed at developing a procedure for the quantification of diosmin and quercetin in DQE using high performance liquid chromatography (HPLC). Different sample preparation methods and HPLC conditions were screened and selected. The quantification procedure was validated according to the ICH guidelines. A mixture of methanol (80%) and dimethyl sulfoxide (20%) was chosen as the solvent for sample preparation. The selected HPLC condition included a Synchronis C18 column (250 × 4.6

mm; 5 μm), a detection wavelength of 268 nm, a column temperature of 30 °C, flow rate of 0.8 ml/min and an injection volume of 20 μl. The mobile phase was a mixture of acetonitrile and 0.2% formic acid with acetonitrile ratios of 29%, 35% and 55% at 0-2 min, 3-4 min and 5-12 min, respectively. The peak areas and diosmin concentrations (or quercetin concentrations) were found in good linear correlations. The % RSD values of inter-day precision of diosmin and quercetin were 1.75% and 0.71%, respectively. The recovery percentages of diosmin and quercetin were 98.73-100.98% and 99.57 - 100.33%, respectively. The procedure for the quantification of diosmin and quercetin in DQE has been successfully developed and could be applied to evaluate the quality of DQE. **Keywords:** HPLC, diosmin, quercetin, microemulgel.

### I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Diosmin và quercetin (Hình 1) là hai hoạt chất có tác dụng chống oxy hoá, kháng viêm, làm bền thành mạch [1]. Diosmin và quercetin đã được nghiên cứu bào chế dưới dạng vi nhũ tương (DQM) và sau đó, tiếp tục phát triển thành microemulgel (DQE), hướng tới mục tiêu bào chế sản phẩm hỗ trợ điều trị suy giãn tĩnh mạch [2].



Hình 1. Cấu trúc hóa học của (a) diosmin và (b) quercetin

Năm 2022, Vũ Lê Hà và cộng sự đã nghiên cứu xây dựng quy trình định lượng đồng thời diosmin và quercetin trong vi nhũ tương bằng phương pháp HPLC – UV [3]. Tuy nhiên, quy trình HPLC này không thể áp dụng để định lượng diosmin và quercetin trong DQE vì thành phần DQE thay đổi so với DQE. Vì vậy, nghiên cứu được thực hiện với mục tiêu xây dựng và thẩm định quy trình định lượng đồng thời diosmin và quercetin trong DQE bằng phương pháp HPLC.

<sup>1</sup>Đại học Y Dược Thành phố Hồ Chí Minh  
 Chịu trách nhiệm chính: Nguyễn Đức Hạnh  
 Email: duchanh@ump.edu.vn  
 Ngày nhận bài: 2.01.2023  
 Ngày phản biện khoa học: 20.2.2023  
 Ngày duyệt bài: 7.3.2023

**II. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU**

**Đối tượng và nguyên liệu.** Quercetin chuẩn làm việc (hàm lượng 98,92%) và diosmin chuẩn làm việc (hàm lượng 98,51%) được cung cấp bởi Khoa Dược, Đại học Y Dược Thành phố Hồ Chí Minh. Dimethyl sulfoxide (DMSO) và methanol (Merck, Đức) đạt tiêu chuẩn phân tích. Acetonitril (Macron, Hà Lan) và nước cất 2 lần đạt tiêu chuẩn HPLC.

**Khảo sát điều kiện HPLC định lượng đồng thời diosmin và quercetin trong DQE**

Hệ thống sắc ký lỏng hiệu năng cao Azura (Đức), detector UV- Vis, cột sắc ký C18 Synchronis (250 x 4,6mm; 5µm) và tiền cột HQ 105 C18 (10 x 4,6mm; 5µm) (Thermo Scientific, Mỹ) được sử dụng. Tiến hành thăm dò một số điều kiện pha động (Bảng 1) với các thông số cố định như: bước sóng phát hiện 268 nm, nhiệt độ cột 30°C, tốc độ dòng 0,8 ml/phút và thể tích tiêm mẫu 20µl. Chọn điều kiện HPLC cho pic quercetin và pic diosmin tách hoàn toàn khỏi các pic khác trong mẫu thử và các thông số sắc ký đạt yêu cầu.

**Bảng 1. Các chương trình pha động khảo sát điều kiện định lượng diosmin và quercetin trong DQE**

|                      | Thời gian (phút) | Acid formic 0,2% | Acetonitril |
|----------------------|------------------|------------------|-------------|
| <b>Điều kiện I</b>   | 0                | 69               | 31          |
|                      | 2                | 69               | 31          |
|                      | 3                | 65               | 35          |
|                      | 4                | 65               | 35          |
|                      | 5                | 45               | 55          |
|                      | 12               | 45               | 55          |
| <b>Điều kiện II</b>  | 0                | 67               | 33          |
|                      | 2                | 67               | 33          |
|                      | 3                | 65               | 35          |
|                      | 4                | 65               | 35          |
|                      | 5                | 45               | 55          |
|                      | 12               | 45               | 55          |
| <b>Điều kiện III</b> | 0                | 71               | 29          |
|                      | 2                | 71               | 29          |
|                      | 3                | 65               | 35          |
|                      | 4                | 65               | 35          |
|                      | 5                | 45               | 55          |
|                      | 12               | 45               | 55          |

**Khảo sát quy trình xử lý mẫu.** Kế thừa quy trình xử lý mẫu thử định lượng đồng thời diosmin và quercetin trong vi nhũ tương chứa diosmin và quercetin (DQM) của Vũ Lê Hà và cộng sự [3], tiến hành chuẩn bị mẫu thử định lượng diosmin và quercetin trong DQE sử dụng hỗn hợp methanol:DMSO tỷ lệ 8:2 (tt/tt) làm dung môi chuẩn bị mẫu thử. Khảo sát chọn tỷ lệ pha loãng DQE cho quy trình chuẩn bị mẫu thử

với 2 tỷ lệ pha loãng sau:

- Tỷ lệ pha loãng 100 lần: Cân chính xác khoảng 0,05 g DQE vào bình định mức 5 ml, thêm khoảng 4 ml dung môi được chọn, siêu âm 10 phút, bổ sung dung môi tới vạch, lọc qua màng lọc 0,22 µm.

- Tỷ lệ pha loãng 70 lần: Cân chính xác khoảng 0,07 g DQE vào bình định mức 5 ml, thêm khoảng 4 ml dung môi được chọn, siêu âm 10 phút, bổ sung dung môi tới vạch, lọc qua màng lọc 0,22 µm.

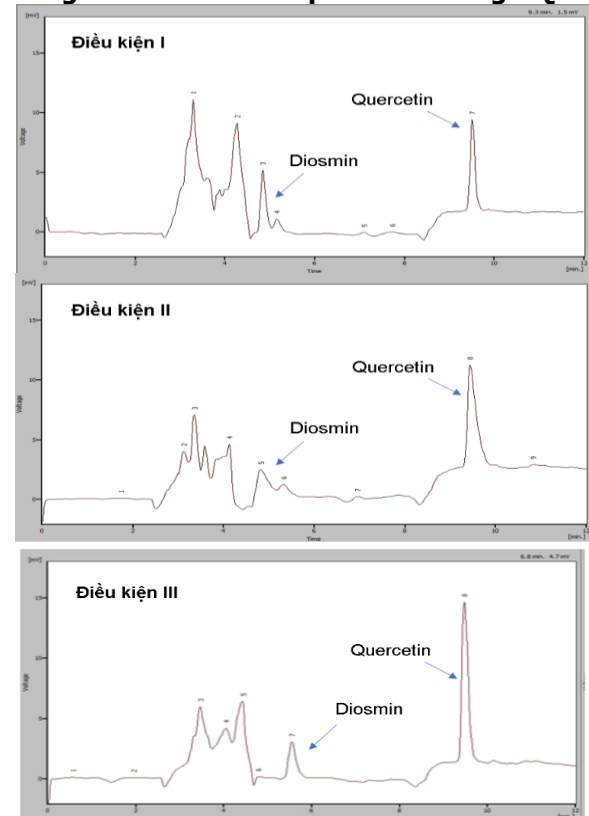
Mỗi thử nghiệm được lặp lại 3 lần. So sánh hàm lượng diosmin và quercetin định lượng được của 2 tỷ lệ khảo sát, đánh giá và chọn tỷ lệ pha loãng phù hợp.

**Thẩm định quy trình định lượng đồng thời diosmin và quercetin trong DQE**

Quy trình định lượng đồng thời diosmin và quercetin trong DQE được thẩm định theo hướng dẫn của ICH gồm tính độ đặc hiệu, tương thích hệ thống, tính tuyến tính, độ chính xác và độ đúng [4].

**III. KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN**

**Khảo sát điều kiện HPLC định lượng đồng thời diosmin và quercetin trong DQE**



**Hình 2. Sắc ký đồ HPLC định lượng đồng**

**thời diosmin và quercetin trong DQE với các điều kiện pha động khảo sát**

Ở điều kiện I và điều kiện II, pic của diosmin bị chệch đỉnh (Hình 2). Điều kiện III tách được các pic diosmin và quercetin khỏi các pic tạp, đồng thời pic diosmin và quercetin đều đạt yêu cầu về độ phân giải. Vì vậy, điều kiện III được chọn làm hệ dung môi rửa giải để định lượng đồng thời diosmin và quercetin trong DQE.

**Khảo sát quy trình xử lý mẫu.** Bảng 2 cho thấy hàm lượng diosmin và quercetin xác định được với hai tỷ lệ pha loãng DQE khác nhau không có ý nghĩa thống kê ( $p > 0,05$ ). Khi tăng lượng hỗn hợp dung môi chiết xuất, tăng tỷ lệ pha loãng DQE từ 70 lên 100 lần, lượng diosmin và quercetin chiết được không tăng, chứng tỏ tỷ lệ pha loãng 70 lần đã chiết kiệt diosmin và quercetin trong mẫu thử DQE. Vì vậy, tỷ lệ pha loãng DQE trong quy trình xử lý mẫu thử được chọn là 70 lần.

**Bảng 2. Hàm lượng diosmin và quercetin xác định được trong DQE ứng với các tỷ lệ pha loãng khảo sát**

| Tỷ lệ pha loãng DQE (lần) | Hàm lượng diosmin trong DQE (% , kl/kl) | Hàm lượng quercetin trong DQE (% ,kl/kl) |
|---------------------------|---|--|
| 100                       | 0,0048 ± 0,001                          | 0,0110 ± 0,002                           |
| 70                        | 0,0049 ± 0,001                          | 0,0110 ± 0,001                           |

**Quy trình định lượng đồng thời diosmin và quercetin trong DQE**

**Chuẩn bị mẫu thử:** Cân chính xác khoảng 0,0714 g DQE vào bình định mức 5 ml, thêm khoảng 4 ml hỗn hợp dung môi methanol:DMSO (8:2), siêu âm 10 phút, bổ sung hỗn hợp dung môi tới vạch, lọc qua màng lọc 0,22 µm.

Điều kiện HPLC: Máy HPLC Azura, detector UV- Vis, cột sắc ký C18 Synchronis (250 x 4,6 mm; 5 µm), tiền cột HQ 105 C18 (10 x 4,6mm; 5 µm), bước sóng phát hiện 268 nm, nhiệt độ cột 30°C, thể tích tiêm mẫu 20µl. Pha động gồm acetonitril và dung dịch acid formic 0,2 % tỷ lệ theo điều kiện III (Bảng 1).

Hàm lượng diosmin hoặc quercetin (%) trong DQE được tính theo công thức:

$$X (\%) = \frac{S_t \times C_c \times 5}{S_c \times 1000 \times a} \times \text{độ tinh khiết của chuẩn} \times 100$$

S<sub>t</sub>: Diện tích pic diosmin (hoặc quercetin) của mẫu thử

S<sub>c</sub>: Diện tích pic diosmin (hoặc quercetin) của mẫu chuẩn

C: Nồng độ dung dịch diosmin (hoặc quercetin) chuẩn (µg/ml)

a: Khối lượng cân của DQE (mg)

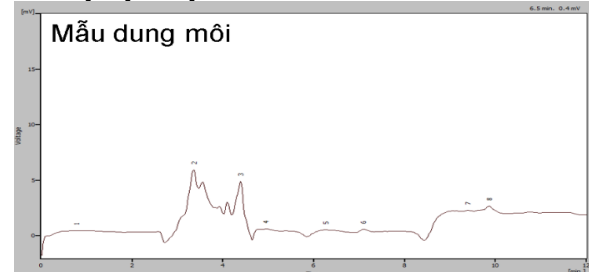
**Thẩm định quy trình định lượng đồng thời diosmin và quercetin trong DQE**

**Tính tương thích hệ thống.** Kết quả khảo sát tính tương thích hệ thống (Bảng 3) cho thấy các thông số thời gian lưu (t<sub>R</sub>), diện tích pic (S) có RSD ≤ 2%. Hệ số bất đối (As), độ phân giải (Rs), số đĩa lý thuyết (N) đạt yêu cầu phân tích. Như vậy, tính tương thích hệ thống của phương pháp HPLC định lượng đồng thời diosmin và quercetin trong DQE đạt yêu cầu.

**Bảng 3. Tính tương thích hệ thống của quy trình định lượng diosmin và quercetin trong DQE**

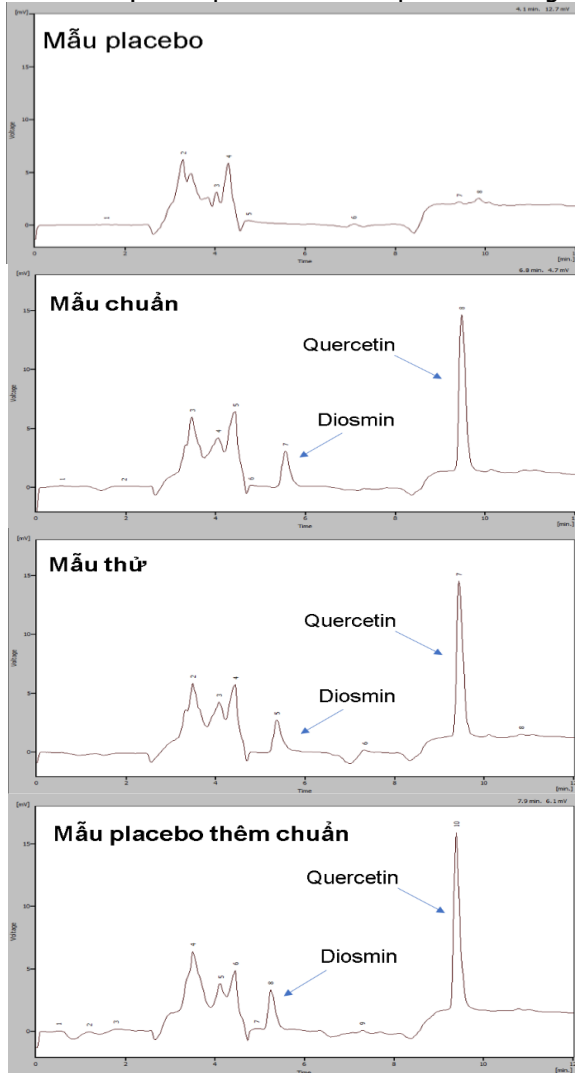
| Diosmin   |                       |           |                     |      |                            |        |
|-----------|-----------------------|-----------|---------------------|------|----------------------------|--------|
| STT       | t <sub>R</sub> (phút) | S (mAU.s) | Rs1                 | Rs2  | As                         | N      |
| 1         | 5,17                  | 27,73     | 1,77                | 1,67 | 1,12                       | 131455 |
| 2         | 5,33                  | 27,54     | 2,11                | 2,12 | 1,13                       | 113459 |
| 3         | 5,23                  | 27,79     | 1,64                | 2,02 | 0,99                       | 110285 |
| 4         | 5,35                  | 27,92     | 1,54                | 1,51 | 1,16                       | 114169 |
| 5         | 5,45                  | 27,36     | 2,84                | 1,93 | 1,20                       | 151685 |
| 6         | 5,36                  | 27,39     | 1,67                | 1,89 | 0,91                       | 120661 |
| TB        | 5,27                  | 27,62     | 1,96                | 1,89 | 1,13                       | 120286 |
| %RSD      | 1,66                  | 0,82      |                     |      |                            |        |
| Quercetin |                       |           |                     |      |                            |        |
| STT       | t <sub>R</sub> (phút) | S (mAU.s) | Rs1                 | Rs2  | As                         | N      |
| 1         | 9,42                  | 129,18    | 1,70                | 2,53 | 1,20                       | 353701 |
| 2         | 9,38                  | 128,14    | 1,53                | 2,63 | 1,01                       | 351202 |
| 3         | 9,38                  | 128,28    | 1,57                | 1,54 | 1,13                       | 433582 |
| 4         | 9,28                  | 129,92    | 2,70                | 2,66 | 1,15                       | 353701 |
| 5         | 9,35                  | 129,02    | 2,04                | 1,93 | 1,14                       | 348711 |
| 6         | 9,45                  | 128,88    | 1,50                | 2,01 | 1,17                       | 356210 |
| TB        | 9,37                  | 128,88    | 1,80                | 2,22 | 1,09                       | 366185 |
| % RSD     | 0,62                  | 0,56      |                     |      |                            |        |
| Yêu cầu   | RSD <2%               | RSD <2%   | R <sub>s</sub> ≥1,5 |      | 0,8 ≤ A <sub>s</sub> ≤ 1,2 |        |

**Độ đặc hiệu**



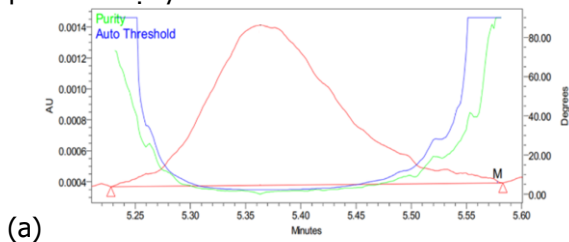
Kết quả khảo sát tính đặc hiệu (Hình 3) cho thấy sắc ký đồ của mẫu dung môi và mẫu placebo không có pic xuất hiện trong khoảng thời gian lưu tương ứng pic diosmin (t<sub>R</sub> ≈ 5,3 phút) và pic

quercetin ( $t_R \approx 9,4$  phút). Sắc ký đồ của mẫu thử cho các pic có thời gian lưu tương ứng với pic diosmin và quercetin trong mẫu hỗn hợp chuẩn. Khi thêm hỗn hợp chuẩn vào mẫu placebo, chiều cao và diện tích pic diosmin và quercetin tăng.

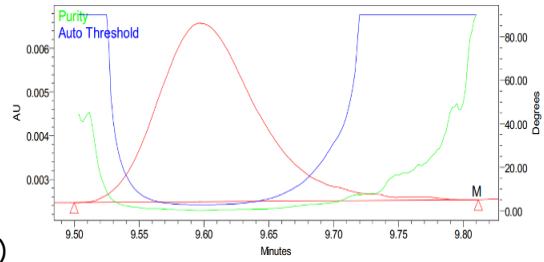


**Hình 3. Sắc ký đồ HPLC khảo sát tính đặc hiệu của quy trình định lượng diosmin và quercetin trong DQE ( $t_R$  của diosmin và quercetin lần lượt là 5,3 và 9,4 phút)**

Hình 4 cho thấy độ tinh khiết pic diosmin và quercetin đạt yêu cầu.



(a)



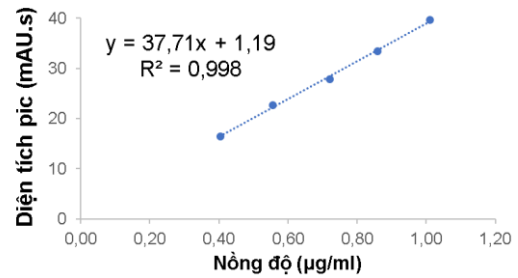
(b)

**Hình 4. Độ tinh khiết pic (a) diosmin và (b) quercetin trong mẫu thử**

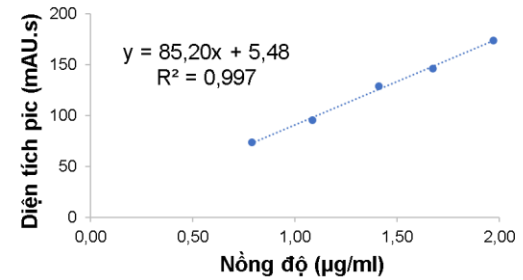
**Tính tuyến tính.** Kết quả khảo sát mối tương quan giữa diện tích pic với nồng độ diosmin và quercetin được trình bày trong Bảng 4 và Hình 5.

**Bảng 4. Tương quan giữa nồng độ và diện tích pic của diosmin và quercetin**

| Diosmin                      |                       | Quercetin                    |                       |
|------------------------------|-----------------------|------------------------------|-----------------------|
| Nồng độ ( $\mu\text{g/ml}$ ) | Diện tích pic (mAU.s) | Nồng độ ( $\mu\text{g/ml}$ ) | Diện tích pic (mAU.s) |
| 0,41                         | 16,39                 | 0,78                         | 73,33                 |
| 0,56                         | 22,62                 | 1,08                         | 95,64                 |
| 0,72                         | 27,85                 | 1,41                         | 128,59                |
| 0,86                         | 33,42                 | 1,68                         | 146,13                |
| 1,01                         | 39,58                 | 1,97                         | 173,82                |



(a)



(b)

**Hình 5. Tương quan giữa nồng độ và diện tích pic của (a) diosmin và (b) quercetin**  
**Độ lặp lại và độ chính xác trung gian**  
**Bảng 5. Độ lặp lại và độ chính xác trung gian của quy trình định lượng**

|         |      | Ngày 1 |      | Ngày 2 |  |
|---------|------|--------|------|--------|--|
| Diosmin |      |        |      |        |  |
| STT     | Diện | Hàm    | Diện | Hàm    |  |

|                | tích pic | lượng diosmin (%) | tích pic | lượng diosmin (%) |
|----------------|----------|-------------------|----------|-------------------|
| 1              | 27,89    | 0,0048            | 27,27    | 0,0047            |
| 2              | 27,53    | 0,0048            | 27,99    | 0,0047            |
| 3              | 27,97    | 0,0049            | 27,27    | 0,0049            |
| 4              | 27,41    | 0,0047            | 27,01    | 0,0047            |
| 5              | 27,70    | 0,0048            | 27,47    | 0,0048            |
| 6              | 27,92    | 0,0049            | 26,34    | 0,0047            |
| <b>TB</b>      |          | 0,0048            |          | 0,0048            |
| <b>RSD (%)</b> |          | 1,56              |          | 1,61              |

**Giá trị thống kê 2 ngày:**  
TB = 0,0048%; RSD = 1,75 %

| <b>Quercetin</b> |               |                         |               |                         |
|------------------|---------------|-------------------------|---------------|-------------------------|
| STT              | Diện tích pic | Hàm lượng quercetin (%) | Diện tích pic | Hàm lượng quercetin (%) |
| 1                | 128,82        | 0,0110                  | 127,36        | 0,0109                  |
| 2                | 128,47        | 0,0111                  | 128,93        | 0,0111                  |
| 3                | 128,07        | 0,0110                  | 126,85        | 0,0109                  |
| 4                | 128,60        | 0,0110                  | 127,13        | 0,0110                  |
| 5                | 127,79        | 0,0109                  | 127,31        | 0,0109                  |
| 6                | 127,32        | 0,0109                  | 127,45        | 0,0109                  |
| <b>TB</b>        |               | 0,0110                  |               | 0,0110                  |
| <b>RSD (%)</b>   |               | 0,69                    |               | 0,70                    |

**Giá trị thống kê 2 ngày:**  
TB = 0,0110%; RSD = 0,71%

Bảng 5 cho thấy hàm lượng của diosmin và quercetin trong DQE lần lượt là 0,0048% và 0,0110%. Các giá trị RSD của diosmin và quercetin đều nhỏ hơn 2%. Vì vậy, độ lặp lại của quy trình định lượng diosmin và quercetin trong DQE đạt yêu cầu.

**Độ đúng.** Độ đúng được thực hiện bằng cách thêm hỗn hợp chuẩn diosmin và quercetin vào mẫu placebo ở 3 mức 80%, 100% và 120% so với nồng độ diosmin và quercetin trong mẫu thử. Kết quả khảo sát độ đúng được trình bày trong Bảng 6.

**Bảng 6. Kết quả khảo sát độ đúng của quy trình định lượng**

| <b>Diosmin</b>       |                    |                            |
|----------------------|--------------------|----------------------------|
| Mức nồng độ thêm vào | Tỉ lệ hồi phục (%) | Giá trị trung bình         |
| 80%                  | 99,53              | TB = 99,99%<br>RSD = 0,86% |
|                      | 100,98             |                            |
|                      | 99,45              |                            |
| 100%                 | 100,01             | TB = 99,68%<br>RSD = 0,84% |
|                      | 98,73              |                            |
|                      | 100,30             |                            |
| 120%                 | 99,81              | TB = 99,74%                |

|                  | 99,49  | RSD = 0,23%                 |
|------------------|--------|-----------------------------|
|                  | 99,93  |                             |
| <b>Quercetin</b> |        |                             |
| 80%              | 99,87  | TB = 99,95%<br>RSD = 0,34%  |
|                  | 99,67  |                             |
|                  | 100,32 |                             |
| 100%             | 100,00 | TB = 99,99%<br>RSD = 0,29%  |
|                  | 100,28 |                             |
|                  | 99,69  |                             |
| 120%             | 99,57  | TB = 100,05%<br>RSD = 0,42% |
|                  | 100,33 |                             |
|                  | 100,24 |                             |

Hàm lượng trung bình của diosmin và quercetin trong DQE lần lượt là 0,0048% và 0,0110%. Theo yêu cầu về độ hồi phục và RSD tương ứng với nồng độ chất phân tích, tỉ lệ phục hồi cho phép phương pháp định lượng đồng thời diosmin và quercetin trong DQE trong khoảng 95 - 105% [2]. Bảng 6 cho thấy quy trình định lượng diosmin và quercetin trong DQE đạt yêu cầu về độ đúng.

#### IV. KẾT LUẬN

Quy trình định lượng đồng thời diosmin và quercetin trong DQE đã được xây dựng thành công. Kết quả thẩm định cho thấy quy trình định lượng đạt các yêu cầu về độ đặc hiệu, tính tương thích hệ thống và tính tuyến tính. Độ chính xác trung gian ứng với diosmin và quercetin lần lượt là 1,75% và 0,71%. Độ đúng đạt yêu cầu với độ phục hồi của diosmin và quercetin lần lượt trong khoảng 98,73-100,98% và 99,57 - 100,33%.

#### V. LỜI CẢM ƠN

Công trình nghiên cứu nhận được kinh phí tài trợ bởi Đại học Y Dược Thành phố Hồ Chí Minh.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Corsale I, Carrieri P, Martellucci J, Piccolomini A, Verre L, Rigutini M, Panicucci S**, "Flavonoid mixture (diosmin, troxerutin, rutin, hesperidin, quercetin) in the treatment of I-III degree hemorrhoidal disease: a double-blind multicenter prospective comparative study", *Int J Colorectal Dis*, 2018, 33(11), pp. 1595-1600.
- Lê Quan Nghiêm, Huỳnh Văn Hóa**, Bào chế và sinh dược học tập 2, NXB Giáo dục Việt Nam, 2014.
- Vũ Lê Hà, Võ Thanh Hóa, Nguyễn Đức Hạnh**, "Xây dựng quy trình định lượng đồng thời diosmin và quercetin trong vi nhũ tương DQM bằng phương pháp HPLC-UV", *Tạp chí Y học Việt Nam*, 2022, 519(1), pp. 252-258.
- Ludwig Huber**, Validation and qualification in analytical laboratories, New York: Informa Healthcare, 2007.