

DEVELOPMENT OF AN HPLC METHOD FOR QUANTIFICATION OF HESPERIDIN IN ANNGON-FUS SYRUP

Tran Thi Van Anh¹, Nguyen Van Khanh², Dao Viet Hung¹, Nguyen Thi Minh Diep¹, Ha Thanh Hoa¹, Ngo Thi Xuan Thinh¹, Pham Thanh Loan³, Nguyen Thu Quynh⁴, Tran Thi Anh Nguyet², Pham Quoc Tuan^{1*}

¹Phu Tho College of Medicine and Pharmacy, ²VNU - School of Medicine and Pharmacy

³Hung Vuong University, ⁴TNU - University of Medicine and Pharmacy

ARTICLE INFO	ABSTRACT
Received: 30/9/2023	Hesperidin, a bioflavonoid predominantly found in <i>Citrus</i> fruits, is used as a marker to standardize the quality of the Anngon-Fus syrup. This formula primarily consists of two medicinal materials from the <i>Citrus</i> genus, namely <i>Pericarpium Citri reticulatae</i> and <i>Fructus Aurantii immaturus</i> . An HPLC method was developed and validated for this purpose. The analysis was conducted on an HPLC system using an Agilent C18 (250 × 4.6 mm; 5 μm) with acetonitrile: water (30:70 v/v) serving as the mobile phase at a flow rate of 1.0 mL/min. The injection volume was set at 10 μL, and detection was performed at 284 nm using a DAD detector. The method was validated for suitability, linearity, accuracy, precision, detection limit and quantitation limit in accordance with ICH, AOAC guidelines. The study results indicated a strong correlation coefficient (R=0,9999) in linear regression and a recovery rate of 98.32 - 99.18% for hesperidin. Therefore, this method provides an accurate, rapid, simple, and effective tool for the quantitative analysis of hesperidin in Anngon-Fus syrup and other preparations containing <i>Citrus</i> fruit extracts.
Revised: 05/01/2024	
Published: 03/02/2024	
KEYWORDS	
Hesperidin	
HPLC	
Anngon-Fus Syrup	
<i>Pericarpium Citri reticulatae</i>	
<i>Fructus Aurantii immaturus</i>	

XÂY DỰNG PHƯƠNG PHÁP ĐỊNH LƯỢNG HESPERIDIN TRONG SIRO ANNGON-FUS BẰNG HỆ THỐNG SẮC KÝ LỎNG HIỆU NĂNG CAO

Trần Thị Vân Anh¹, Nguyễn Văn Khánh², Đào Việt Hưng¹, Nguyễn Thị Minh Diệp¹, Hà Thanh Hòa¹, Ngô Thị Xuân Thịnh¹, Phạm Thanh Loan³, Nguyễn Thu Quỳnh⁴, Trần Thị Ánh Nguyệt², Phạm Quốc Tuấn^{1*}

¹Trường Cao đẳng Y Dược Phú Thọ, ²Trường Đại học Y Dược - ĐH Quốc gia Hà Nội

³Trường Đại học Hùng Vương, ⁴Trường Đại học Y Dược - ĐH Thái Nguyên

THÔNG TIN BÀI BÁO	TÓM TẮT
Ngày nhận bài: 30/9/2023	Hesperidin là một bioflavonoid chủ yếu có ở quả của các loài thuộc chi <i>Citrus</i> , được sử dụng làm chất đánh dấu để tiêu chuẩn hóa siro Anngon-Fus. Trong công thức này chứa hai dược liệu chính có nguồn gốc từ các loài thuộc chi <i>Citrus</i> là Trần bì và Chi thực. Với mục đích đó, phương pháp định lượng bằng HPLC được xây dựng và thẩm định. Phân tích thực hiện trên hệ thống HPLC, sử dụng cột Agilent C18 (250 × 4,6 mm; 5 μm) và pha động là hỗn hợp acetonitril : nước (30:70 tt/tt) với tốc độ dòng 1,0 ml/phút. Thể tích tiêm là 10 μl và phát hiện được thực hiện ở bước sóng 284 nm bằng đầu dò DAD. Phương pháp được thẩm định về tính tương thích hệ thống, độ tuyến tính, độ chính xác, độ đúng, giới hạn phát hiện và giới hạn định lượng theo các hướng dẫn của ICH và AOAC. Kết quả nghiên cứu chỉ ra phương trình hồi quy tuyến tính có hệ số tương quan chặt (R=0,9999) và độ thu hồi của hesperidin là 98,32 - 99,18%. Do đó, phương pháp phân tích này là một công cụ chính xác, nhanh chóng, đơn giản và hiệu quả để định lượng hesperidin trong siro Anngon-Fus và các sản phẩm khác chứa cao chiết từ quả của chi <i>Citrus</i> .
Ngày hoàn thiện: 05/01/2024	
Ngày đăng: 03/02/2024	
TỪ KHÓA	
Hesperidin	
Sắc ký lỏng hiệu năng cao	
Siro Anngon-Fus	
Trần bì	
Chi thực	

DOI: <https://doi.org/10.34238/tnu-jst.8871>

* Corresponding author. Email: phamquoctuan@duocphutho.edu.vn

1. Giới thiệu

Theo Y học cổ truyền, tạng là các tổ chức trong cơ thể có chức năng tàng trữ, quản lý các hoạt động của cơ thể, gồm có 5 tạng (tâm, can, tỳ, phế, thận). Tỳ có thể coi là lá lách và có nhiều chức năng như: ích khí sinh huyết, chủ chân tay, cơ nhục, chủ thăng. Khi tỳ hư (yếu) thì sinh ra các triệu chứng của bệnh như: chân tay mềm yếu, cơ bắp teo nhão, kém ăn, khó tiêu, phân lỏng,... [1].

Theo Y học cổ truyền Trung Quốc và Việt Nam có nhiều dược liệu có tác dụng kiện tỳ (làm tỳ mạnh khỏe lên) như: Nhân sâm, Đảng sâm, Bạch truật, Hoài sơn, Hoàng kỳ, Cam thảo, Đại táo, Bạch biển đậu, Sơn tra, Long nhãn,... [1]-[3]. Hiện nay, một số bài thuốc bổ tỳ, kiện vị được sử dụng như: Quy tỳ thang (hoàn), Bổ trung ích khí, Quân tử thang,... đều chứa các dược liệu có chức năng bổ tỳ [1], [2].

Nhằm mục đích bào chế một sản phẩm có nguồn gốc từ thảo dược có công năng kiện tỳ, khai vị, sử dụng trong trường hợp tỳ vị hư nhược, đầy bụng, ăn không tiêu, kích thích ăn ngon, siro Anngon-Fus được nghiên cứu bào chế gồm các dược liệu: Đảng sâm Việt Nam, Bạch truật, Trần bì, Chỉ thực, Táo mèo, Long nhãn. Công thức siro Anngon-Fus được nghiên cứu dựa trên nền công thức siro Kiện tỳ trong Dược điển Trung Quốc (ChP.) 2020, có thay đổi một số dược liệu cho phù hợp với nguồn dược liệu trồng trọt, thu hái tại Việt Nam [3]. Mặt khác, hesperidin là một bioflavonoid có chứa nhiều trong quả của một số loài thuộc chi *Citrus* [2]-[4]. Hiện nay, có rất nhiều nghiên cứu định lượng hesperidin trong các sản phẩm thuốc, thực phẩm bảo vệ sức khỏe, thực phẩm được công bố trong và ngoài nước [5]-[8]. Để tiêu chuẩn hóa chất lượng sản phẩm, hesperidin là thành phần quan trọng có trong hai dược liệu chính của siro Anngon-Fus là Trần bì và Chỉ thực được lựa chọn làm chất đánh dấu xây dựng phương pháp định lượng và chỉ tiêu hàm lượng; từ đó góp phần xây dựng tiêu chuẩn cơ sở và kiểm tra chất lượng các sản phẩm có chứa các dược liệu tương tự như siro Anngon-Fus lưu hành trên thị trường.

2. Phương pháp nghiên cứu

2.1. Dược liệu và tá dược

Các dược liệu bào chế siro: Đảng sâm Việt Nam (*Radix Codonopsis javanicae*), Bạch truật (*Rhizoma Atractylodis macrocephalae*), Trần bì (*Pericarpium Citri reticulatae*), Chỉ thực (*Fructus Aurantii immaturus*), Long nhãn (*Arillus Longan*) đạt yêu cầu Dược điển Việt Nam V và Táo mèo (*Fructus Docyniae indicae*) đạt tiêu chuẩn cơ sở. Các tá dược đạt tiêu chuẩn dược dụng.

2.2. Hóa chất, dung môi

Các dung môi, hóa chất sử dụng nghiên cứu xây dựng phương pháp định lượng gồm: acetonitril (MeCN), methanol (MeOH) được mua của hãng Merck KGaA (Đức), dùng cho HPLC; nước cất hai lần. Chất chuẩn: hesperidin cung cấp bởi hãng ChemFaces (Trung Quốc), có độ tinh khiết 98,0%.

2.3. Bào chế siro Anngon-Fus

Siro Anngon-Fus do Trung tâm Nghiên cứu và Chuyển giao Công nghệ Dược, Trường Cao đẳng Y Dược Phú Thọ bào chế, gồm 03 lot nghiên cứu: NC012023; NC022023 và NC032023.

2.3.1. Công thức

Đảng sâm Việt Nam: 51,3 g; Bạch truật: 76,9 g; Trần bì: 51,3 g; Chỉ thực: 51,3 g; Táo mèo: 38,5 g; Long nhãn: 38,5 g; Natri benzoat: 3,0 g; Sucrose, các tá dược khác, nước tinh khiết vừa đủ 1000 ml.

2.3.2. Bào chế

Cắt lấy tinh dầu Trần bì. Sau đó sắc Trần bì (sau khi cắt lấy tinh dầu) với các dược liệu còn lại

với nước 3 lần x 1,5 giờ/lần. Lọc, gộp dịch lọc và cô đặc đến khoảng 500 ml. Cân đường sucrose, thêm nước và đun sôi, lọc, cho vào dịch được liệu đã cô đặc; thêm natri benzoat và các tá dược khác (trừ hương liệu) trộn đều, làm lạnh. Thêm tinh dầu Trần bì, hương liệu, pha loãng với nước được 1000 ml siro. Đóng chai nhựa màu nâu 100 ml, đầy nắp kín.

2.3.3. *Bảo quản*: Bảo quản ở nơi mát, tránh ánh sáng.

2.4. *Bào chế siro placebo*

Bào chế siro placebo như mục 2.3 nhưng không chứa dược liệu.

2.5. *Thiết bị*

Hệ thống HPLC: Agilent 1260 Technologies với đầu dò DAD, bơm mẫu tự động (Agilent, Mỹ), cột sắc ký Agilent C18 (250 x 4,6 mm; 5 μ m); cân phân tích AUW220D (Shimadzu, Nhật Bản), bể chiết siêu âm D-78224 (Đức), các dụng cụ thủy tinh: bình định mức, pipet, micropipet,... có độ chính xác thích hợp.

2.6. *Phương pháp nghiên cứu*

2.6.1. *Khảo sát điều kiện sắc ký*

Dựa trên tham khảo các tài liệu [3], [6], [9] và điều kiện trang thiết bị, hóa chất hiện có, chúng tôi lựa chọn các điều kiện sắc ký để khảo sát như sau:

- Cột sắc ký Agilent C18 (250 x 4,6 mm; 5 μ m);
- Pha động: MeCN: nước;
- Bước sóng: 284 nm;
- Thể tích tiêm: 10 μ l.

Khảo sát tỷ lệ dung môi, tốc độ dòng pha động.

2.6.2. *Chuẩn bị dung dịch*

Dung dịch chuẩn: Cân và pha chính xác lượng chất chuẩn hesperidin trong MeOH 70% để được dung dịch có nồng độ chính xác 1000 μ g/ml. Từ dung dịch trên pha loãng thành dãy dung dịch chuẩn có nồng độ từ 10, 20, 50, 100, 200, 500 μ g/ml.

Dung dịch thử: Đong chính xác 10 ml siro, cho vào bình định mức 25 ml, thêm 10 ml MeOH 70%, siêu âm trong 10 phút. Để nguội, bổ sung MeOH 70% đến vạch, lắc đều. Lọc qua màng lọc 0,20 μ m trước khi chạy sắc ký.

Mẫu trắng: Thực hiện như pha chế dung dịch thử nhưng thay siro thuốc bằng siro placebo.

2.6.3. *Thẩm định phương pháp*

Thẩm định phương pháp phân tích theo hướng dẫn của ICH, AOAC với các tiêu chí: Tính thích hợp của hệ thống, độ đặc hiệu, khoảng tuyến tính, độ chính xác, độ đúng, giới hạn phát hiện (LOD) và giới hạn định lượng (LOQ) [10], [11].

2.6.4. *Xử lý số liệu thống kê*

Mỗi mẫu nghiên cứu được làm lặp lại 3 lần. Kết quả được xử lý thống kê bằng phần mềm Microsoft Excel 2019.

3. *Kết quả nghiên cứu và bàn luận*

3.1. *Lựa chọn điều kiện sắc ký*

Tiến hành khảo sát tỷ lệ dung môi pha động, tốc độ dòng, nhiệt độ cột của hệ môi MeCN - nước. Kết quả điều kiện lựa chọn được như sau:

- Pha động (chạy đẳng dòng): MeCN : nước = 30:70 (tt/tt);
- Bước sóng phát hiện: 284 nm;

- Nhiệt độ cột: $25 \pm 0,1^{\circ}\text{C}$;
- Tốc độ dòng: 1,0 ml/min;
- Thể tích tiêm: 10 μl ;
- Thời gian phân tích: 10 min.

Với điều kiện này, hesperidin được tách khỏi các chất khác trong siro, pic cân đối và gọn, thời gian lưu (t_R) ngắn (4,31 min) (Hình 1B).

3.2. Thẩm định phương pháp định lượng

3.2.1. Tính thích hợp của hệ thống

Tiêm lặp lại 6 lần 10 μl dung dịch chuẩn hesperidin nồng độ 100 $\mu\text{g/ml}$ vào hệ thống sắc ký. Tiến hành chạy sắc ký ở điều kiện đã lựa chọn. Kết quả được ghi lại ở Bảng 1.

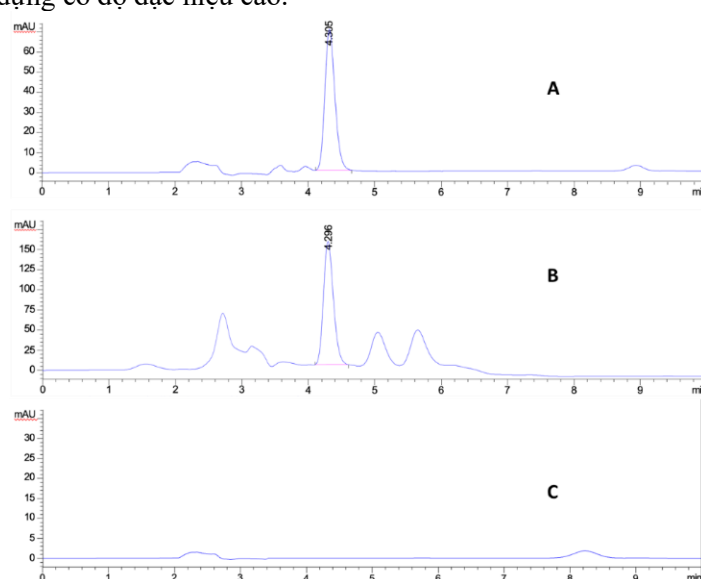
Bảng 1. Kết quả khảo sát tính thích hợp hệ thống

Số lần phân tích	t_R (min)	S_{pic} (mAU.s)
1	4,304	418,5
2	4,311	419,2
3	4,307	421,2
4	4,305	424,7
5	4,319	418,8
6	4,298	415,3
Trung bình (TB)	4,307	419,6
RSD (%)	0,17	0,75

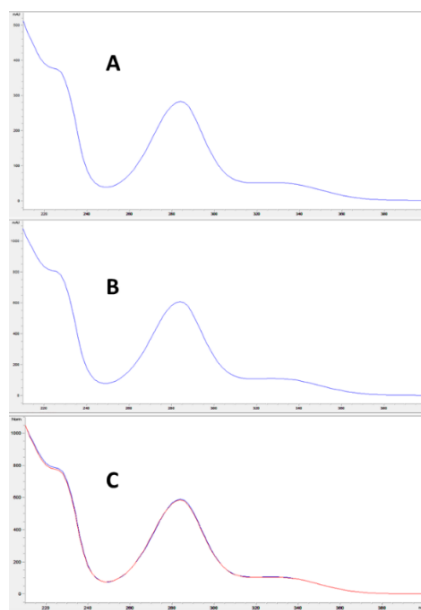
Số liệu ở Bảng 1 cho thấy độ lệch chuẩn tương đối (RSD) của t_R và S_{pic} của hesperidin $< 2\%$. Do vậy hệ thống sắc ký phù hợp cho việc xác định hàm lượng hesperidin trong siro Anngon-Fus.

3.2.2. Độ đặc hiệu

Chuẩn bị dung dịch chuẩn hesperidin (nồng độ 100 $\mu\text{g/ml}$), dung dịch thử và mẫu trắng, tiến hành chạy sắc ký trong cùng một điều kiện đã khảo sát tối ưu. Kết quả thu được trên sắc ký đồ của mẫu trắng không có pic tập tại thời gian lưu của hesperidin; pic của hesperidin trên sắc ký đồ của dung dịch chuẩn và dung dịch thử có hình dạng phổ UV tương đồng và thời gian lưu trùng nhau ($p > 0,05$) (Hình 1). Đồng thời, độ tinh khiết của pic hesperidin trên dung dịch chuẩn, dung dịch thử $> 0,9999$ và hệ số match (chồng phổ) là 0,9999 (Hình 2). Từ kết quả khảo sát ở trên, phương pháp xây dựng có độ đặc hiệu cao.



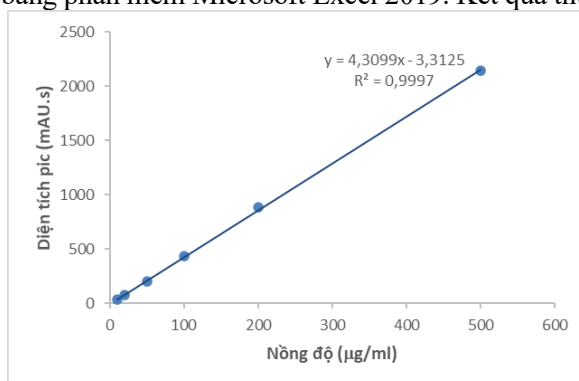
Hình 1. Sắc ký đồ HPLC của các dung dịch: chuẩn (A); thử (B); mẫu trắng (C)



Hình 2. Phổ UV của hesperidin trong các dung dịch: chuẩn (A) và thử (B); chồng phổ UV (C)

3.2.3. Khoảng tuyến tính, giới hạn phát hiện, giới hạn định lượng

Pha chế một dãy gồm 06 dung dịch chuẩn của hesperidin có nồng độ từ 10 µg/ml đến 500 µg/ml như mục 2.6.2. Tiến hành sắc ký, ghi kết quả, tính toán hệ số tương quan (R), xây dựng phương trình hồi quy tuyến tính bằng phần mềm Microsoft Excel 2019. Kết quả thu được ở Hình 3.



Hình 3. Đồ thị biểu diễn mối tương quan giữa diện tích pic và nồng độ của hesperidin

Từ kết quả thực nghiệm cho thấy, trong khoảng nồng độ hesperidin khảo sát, phương trình hồi quy tuyến tính xây dựng được có sự tương quan chặt giữa nồng độ và diện tích pic ($R=0,9999$). Mặt khác LOD, LOQ của hesperidin được xác định ở nồng độ dựa trên tỷ lệ tín hiệu chất phân tích so với nhiễu đường nền (S/N) lần lượt là 3 và 10. Kết quả thu được là 0,15 µg/ml đối với LOD và 0,5 µg/ml đối với LOQ.

3.2.4. Độ lặp lại và độ chính xác trung gian

Độ lặp lại của phương pháp được thực hiện bởi xác định hàm lượng hesperidin trong mẫu siro Anngon-Fus 6 lần theo quy trình phân tích đã xây dựng. Độ chính xác trung gian được thực hiện tương tự như độ lặp lại nhưng ở ngày kế tiếp và khác người thực hiện. Ghi kết quả, tính toán RSD. Số liệu nghiên cứu được trình bày ở Bảng 2.

Bảng 2. Kết quả xác định độ lặp lại và độ chính xác trung gian của hesperidin trong siro

STT	Phân tích hesperidin trong ngày		Phân tích hesperidin khác ngày	
	Spic (mAU.s)	Hàm lượng (mg/ml)	Spic (mAU.s)	Hàm lượng (mg/ml)
1	877,6	0,511	881,0	0,513
2	855,2	0,498	894,8	0,521
3	865,5	0,504	879,3	0,512
4	886,2	0,516	898,3	0,523
5	869,0	0,506	875,9	0,510
6	879,3	0,512	862,1	0,502
TB=0,508 mg/ml; RSD= 1,27% (n=6)		TB= 0,515 mg/ml; RSD= 1,49% (n=6)		
TB=0,511 mg/ml; RSD= 1,45% (n=12); P _{trong ngày/khác ngày} =0,192 (>0,05)				

Kết quả ở Bảng 2 cho thấy, hàm lượng của hesperidin trong siro khi phân tích trong ngày và khác ngày không khác nhau có ý nghĩa thống kê ($p>0,05$). Mặt khác, RSD của hàm lượng hesperidin phân tích trong ngày, khác ngày (n=6), trong ngày và khác ngày (n=12) đều <2%, phù hợp với hướng dẫn của AOAC [11]. Do đó, độ lặp lại và độ chính xác trung gian của phương pháp đáp ứng yêu cầu để định lượng hesperidin trong siro nghiên cứu.

3.2.5. Độ đúng

Xác định độ đúng của phương pháp định lượng dựa vào hiệu suất thu hồi bằng cách thêm chuẩn vào nền dung dịch siro (siro pha loãng 2,5 lần bằng MeOH 70%) để được nồng độ chất nghiên cứu nằm trong khoảng 80%, 100% và 120% so với nồng độ mẫu nghiên cứu. Mỗi mức nồng độ thực hiện 3 mẫu độc lập. Tính hiệu suất thu hồi và kết quả được trình bày trong Bảng 3.

Bảng 3. Kết quả đánh giá độ đúng của phương pháp

Hàm lượng hesperidin thêm vào (µg/ml)	Hàm lượng hesperidin tìm thấy (µg/ml)	Hiệu suất thu hồi (%)	Trung bình hiệu suất thu hồi (%)	RSD (%)
0	204,4	-	-	
200	403,6	99,60	98,40	1,20
	398,9	97,25		
	401,1	98,35		
300	503,5	99,70	98,32	1,77
	501,1	98,90		
	493,5	96,37		
400	605,3	100,44	99,18	1,06
	599,2	97,46		
	603,7	99,66		
TB		98,63		

Hiệu suất thu hồi của hesperidin ở 3 nồng độ thêm vào đạt từ 98,32-99,18% (trung bình 98,63%) nằm trong khoảng 95-105%. Vì vậy, độ đúng của phương pháp phân tích đáp ứng theo yêu cầu của AOAC thông qua đánh giá hiệu suất thu hồi [11].

3.3. Xác định hàm lượng hesperin trong các lot sản phẩm nghiên cứu

Áp dụng phương pháp phân tích đã được xây dựng và thẩm định, xác định hàm lượng hesperidin trong 03 lot siro Anngon-Fus nghiên cứu. Kết quả phân tích được trình bày ở Bảng 4.

Bảng 4. Kết quả định lượng hesperidin trong các mẫu siro Anngon-Fus

STT	Lot siro	Hàm lượng hesperidin (mg/ml)
1	NC012023	0,511
2	NC022023	0,497
3	NC032023	0,501

Từ kết quả nghiên cứu cho thấy, hàm lượng hesperidin trong 3 lot chế phẩm nghiên cứu nằm trong khoảng 0,497 - 0,511 mg/ml.

3.4. Bàn luận

Hesperidin là bioflavonoid, thuộc nhóm flavanon, có chứa nhiều trong vỏ quả của các loài chi *Citrus* như: *C. sinensis*, *C. paradise*, *C. reticulata*, *C. aurantifolia* và *C. limon* [4]. Nó sở hữu nhiều tác dụng sinh học hữu ích như chống oxy hóa, phòng các bệnh tim mạch, chống ung thư, chống viêm [4]. Trong thành phần siro Anngon-Fus, 6 dược liệu được sử dụng, trong đó có Trần bì [là vỏ quả chín phơi hoặc sấy khô để lâu năm của cây Quýt (*C. reticulata*)] và Chi thực [(là quả non được bỏ đôi hay để nguyên đã phơi hay sấy khô của cây Cam chua (*C. aurantium*) hoặc cây Cam ngọt (*C. sinensis*)], chúng chiếm số lượng nhiều nhất (tổng số 33,37%) và hàm lượng hesperidin trong hai dược liệu này khá cao, lần lượt lớn hơn 3,5% và 5,0% [2]. Mặt khác, theo Y học cổ truyền, dược liệu Trần bì có công năng: lý khí kiện tỳ, hóa đờm rạo thấp; chủ trị: bụng đau, đầy trướng, kém ăn, nôn mửa, ỉa lỏng, ho đờm nhiều; Chi thực có công năng phá khí tiêu tích, hóa đờm tiêu bĩ; chủ trị: thực tích, thực nhiệt tích ở đại tràng gây táo bón, đàm trọc ứ trệ ở ngực gây đau trong ngực, ăn không tiêu, bụng đầy trướng [2]. Công năng, chủ trị của hai dược liệu này cùng các dược liệu khác trong công thức góp phần tạo ra công năng, chủ trị của chế phẩm. Chính vì lý do đó, hesperidin được lựa chọn làm chất đánh dấu xây dựng phương pháp định lượng hoạt chất trong siro Anngon-Fus.

Hiện nay, để định lượng hesperidin riêng lẻ hoặc đồng thời với các flavonoid khác trong dược liệu từ chi *Citrus*, cũng như trong các chế phẩm của chúng, nhiều phương pháp được áp dụng như đo quang [2], [12], HPTLC [13], HPLC [2], [3], [9], [14], LC-MS [15]. Phương pháp HPLC được sử dụng rất rộng rãi để định lượng hesperidin trong các chế phẩm dược phẩm, thực phẩm, thực phẩm bảo vệ sức khỏe [3], [5]-[9].

Với kết quả thu được cho thấy, phương pháp nghiên cứu có độ đặc hiệu, tính tương tích hệ thống cao, thời gian lưu ngắn ($t_R=4,31$), phương trình hồi quy tuyến tính với hệ số tương quan chặt ($R=0,9999$) giữa Spic và nồng độ, độ chính xác và độ đúng đạt yêu cầu theo hướng dẫn của ICH, AOAC [10], [11]. So với một số kết quả nghiên cứu được công bố [3], [5]-[9] thấy rằng phương pháp của nghiên cứu này thực hiện với hệ dung môi MeCN-nước không acid hóa, chạy đẳng dòng, thời gian chạy ngắn (10 min), do vậy ít ảnh hưởng và kéo dài tuổi thọ của cột hơn, tiết kiệm chi phí nhưng vẫn thu được kết quả mong muốn. Vì vậy có thể áp dụng vào thực tiễn để đánh giá hàm lượng hesperidin trong các chế phẩm dược phẩm, thực phẩm có chứa dược liệu (cao dược liệu) Trần bì, Chi thực vì sự tiện lợi, kinh tế, đơn giản, dễ thực hiện.

Trong siro nghiên cứu, hai dược liệu Trần bì và Chi thực có hàm lượng như siro Kiện tỳ trong ChP. 2020. Bên cạnh đó, kết quả định lượng hesperidin trong 3 lot nghiên cứu nằm trong khoảng 0,497 - 0,511 mg/ml, lớn hơn 0,2 mg/ml theo quy định tối thiểu của ChP. 2020 [3]. Tuy nhiên, kết quả chỉ bước đầu đánh giá hàm lượng hesperidin sau khi bào chế, vì là một flavonoid dễ bị oxy hóa, đặc biệt là môi trường nước và có chứa nhiều tác nhân xúc tác cho quá trình oxy hóa - khử, do vậy cần phải tiếp tục theo dõi, đánh giá độ ổn định về hàm lượng để có căn cứ đề xuất tuổi thọ của chế phẩm theo tiêu chí hàm lượng.

4. Kết luận

Phương pháp định lượng hesperidin trong siro Anngon-Fus trên hệ thống sắc ký lỏng hiệu năng cao, với đầu dò DAD được xây dựng, thẩm định và đã đáp ứng các yêu cầu theo hướng dẫn của ICH, AOAC về độ đặc hiệu, tính thích hợp của hệ thống, khoảng tuyến tính, độ đúng, độ lặp lại, giới hạn phát hiện và giới hạn định lượng. Áp dụng quy trình phân tích đã được xây dựng, đánh giá hàm lượng hesperidin trong 3 lot chế phẩm nghiên cứu, kết quả thu được lần lượt là 0,511, 0,497 và 0,501 mg/ml

Lời cảm ơn

Nghiên cứu này được tài trợ bởi Sở Khoa học và Công nghệ tỉnh Phú Thọ và Trường Cao đẳng Y Dược Phú Thọ.

TÀI LIỆU THAM KHẢO/ REFERENCES

- [1] X. S. Pham (Ed.), *Traditional Pharmacy*. Ha Noi: Medical Publishing House, 2002.
- [2] Vietnamese Ministry of Health, *Vietnamse Pharmacopoeia V*, vol. II, Hanoi: Medical Publishing House, 2017.
- [3] Chinese Pharmacopoeia Commission, *Pharmacopoeia of the People's republic of China*, vol. 1, China Medical Science Press, 2020.
- [4] G. V. Dijk and A. Editor, "Hesperidin: A Review on Extraction Methods, Stability and Biological Activities," *Nutrients*, vol. 14, no. 12, p. 2387, 2022.
- [5] E. Büyüktuncel, "Fast Determination of Naringin and Hesperidin in Natural and Commercial Citrus Juices by HPLC Method," *Asian Journal of Chemistry*, vol. 29, no. 11, pp. 2384-2386, 2017.
- [6] S. Narapureddy, T. V. Reddy, and V. S. N. Murthy, "Development and validation of RP-HPLC-PDA method for the quantification of hesperidin in bulk and its pharmaceutical dosage form," *Indo American Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 8, no. 2, pp. 362-369, 2021.
- [7] T. T. P. Nguyen, T. H. H. Nguyen, and T. T. Dam, "Simultaneous determination of Rutin, Hesperidin and Quercetin contents in solid dietary supplements by high performance liquid chromatography," (in Vietnamese), *Vietnam Journal of Food Control*, vol. 3, no. 1, pp. 38-45, 2020.
- [8] M. Piponski, T. B. Stoimenova, M. Topkoska, S. Stefov, M. Piponska, and G. T. Serafimovska, "Development and Validation of a fast and simple RP-HPLC method," *Macedonian Journal of Chemistry and Chemical Engineering*, vol. 37, no. 2, pp. 127-134, 2018.
- [9] S. S. Chimagave, S. S. Jalalpure, A. K. Patil, and B. K. Kurangi, "Development and validation of stability indicating RP-HPLC method for estimation of hesperidin in nanotransfersome and Madhiphala rasayana—An Ayurvedic marketed product," *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, vol. 13, no. 2, pp. 039-048, 2023.
- [10] ICH, *Validation of analytical procedure: text and methodology Q2 (R1)*, 2005.
- [11] AOAC International, *Guidelines for Standard Method Performance Requirements*, Appendix F, p.3, 2016.
- [12] I. Bennani, M. A. Chentoufi, I. Sbair, E. Otmani, A. Cheikh, N. Bamou, M. E. Karbane, and M. Bouatia, "Development and validation of two spectrophotometric methods for simultaneous determination of diosmine and hesperidin in mixture and their applications," *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, vol. 10, no 7, pp. 100-107, 2020.
- [13] P. Alam, A. Alam, Md. K. Anwer, and S. I. Alqasoumi, "Quantitative estimation of hesperidin by HPTLC in different varieties of citrus peels," *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, vol. 4, no 4, pp. 262-266, 2014.
- [14] F. I. Kanaze, C. Gabrieli, E. Kokkalou, M. Georgarakis, and I. opas, "Simultaneous reversed-phase high-performance liquid chromatographic method for the determination of diosmin, hesperidin and naringin in different citrus fruit juices and pharmaceutical formulations," *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, vol. 33, pp. 243-249, 2003.
- [15] A. V. Hoang, N. L. Pham, N. P. D. Nguyen, H. V. Diep, M. N. Truong, and H. L. T. Nguyen, "Simultaneous determination of naringin and hesperidin in young pomelo powder by liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) (in Vietnamese)," *Vietnam Medical Journal*, vol. 523, pp. 201-206, 2023.