



Original Article

Development of a High-Performance Liquid Chromatography Method for Simultaneous Determination of Hesperidin and Sodium Benzoate in Kien Ty Syrup

Do Thi Dinh³, Tran Thi Van Anh¹, Nguyen Van Khanh²,
Dao Viet Hung¹, Nguyen Thanh Hai², Pham Quoc Tuan^{1,*}

¹Phu Tho College of Medicine and Pharmacy, 2201 Hung Vuong, Gia Cam, Viet Tri, Phu Tho, Vietnam

²VNU University of Medicine and Pharmacy, 144 Xuan Thuy, Cau Giay, Hanoi, Vietnam

³Hai Duong Central College of Pharmacy, 324 Nguyen Luong Bang, Thanh Binh, Hai Duong, Vietnam

Received 08 March 2024

Revised 23 March 2024; Accepted 03 April 2024

Abstract: The Kien ty syrup is formulated from six medicinal materials, including *Pericarpium Citri Reticulatae*, *Fructus Aurantii immaturus*, *Radix Codonopsis*, *Rhizoma Atractylodis macrocephalae*, *Fructus Crataegi*, *Fructus Hordei germinatus* and sodium benzoate as a preservative. Hesperidin, a bioflavonoid found in *Pericarpium Citri Reticulatae* and *Fructus Aurantii immaturus*, is used to assess the syrup's quality in terms of the assay. In this study, an HPLC method for the simultaneous determination of hesperidin and sodium benzoate in Kien ty syrup was developed. The method was performed on an Agilent C18 column (250 × 4.6 mm; 5 μm) with the mobile phase being a mixture of 0.05 M phosphate buffer solution (pH 5.5): acetonitrile (70:30, v/v), running in an isocratic elution mode. The flow rate was set at 1.0 mL/min, and the injection volume was 10 μL. The analytes were detected at 225 nm. The method was validated and met the requirements according to ICH and AOAC guidelines. Applying the developed quantification method, the analysis of three sirup lots revealed that the content of hesperidin and sodium benzoate ranged from 0.480-0.504 mg/mL and 2.869-2.306 mg/mL, respectively. The study results indicate that this quantification method can be applied for the simultaneous determination of hesperidin and sodium benzoate in Kien ty syrup and similar products.

Keywords: Kien ty sirup, Hesperidin, Sodium benzoate, Simultaneous quantification, HPLC.

* Corresponding author.

E-mail address: phamquoctuan@duocphutho.edu.vn

<https://doi.org/10.25073/2588-1132/vnumps.4585>

Xây dựng phương pháp định lượng đồng thời hesperidin và natri benzoat trong sirô Kiện tỳ bằng hệ thống sắc ký lỏng hiệu năng cao

Đỗ Thị Định³, Trần Thị Vân Anh¹, Nguyễn Văn Khanh²,
Đào Việt Hưng¹, Nguyễn Thanh Hải², Phạm Quốc Tuấn^{1,*}

¹Trường Cao đẳng Y Dược Phú Thọ, 2201 Hùng Vương, Gia Cẩm, Việt Trì, Phú Thọ, Việt Nam

²Trường Đại học Y Dược, Đại học Quốc gia Hà Nội, 144 Xuân Thủy, Cầu Giấy, Hà Nội, Việt Nam

³Trường Cao đẳng Dược Trung ương Hải Dương,

324 Nguyễn Lương Bằng, Thanh Bình, Hải Dương, Việt Nam

Nhận ngày 08 tháng 3 năm 2024

Chỉnh sửa ngày 23 tháng 3 năm 2024; Chấp nhận đăng ngày 03 tháng 4 năm 2024

Tóm tắt: Sirô Kiện tỳ được bào chế từ sáu dược liệu gồm *Pericarpium Citri Reticulatae*, *Fructus Aurantii immaturus*, *Radix Codonopsis*, *Rhizoma Atractylodis macrocephalae*, *Fructus Crataegi*, *Fructus Hordei germaninatus* và natri benzoate làm chất bảo quản. Hesperidin là một bioflavonoid được tìm thấy trong *Pericarpium Citri Reticulatae*, *Fructus Aurantii immaturus*, được sử dụng để đánh giá chất lượng của sirô về về chỉ tiêu định lượng. Trong nghiên cứu này, phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) được xây dựng để xác định đồng thời hesperidin và natri benzoat trong sirô Kiện tỳ. Phương pháp được thực hiện trên cột Agilent C18 (250 × 4,6 mm; 5 μm) với pha động là hỗn hợp dung dịch đệm phosphat 0,05 M pH 5,5 : acetonitril (70:30, tt/tt), chạy theo chế độ rửa giải đẳng dòng. Tốc độ dòng 1,0 mL/phút, thể tích tiêm là 10 μL. Các chất được phát hiện ở bước sóng 225 nm. Phương pháp được thẩm định và đáp ứng được các yêu cầu theo hướng dẫn của ICH, AOAC. Áp dụng phương pháp định lượng đã xây dựng, phân tích 03 lô sirô Kiện tỳ cho thấy hàm lượng hesperidin và natri benzoat lần lượt dao động trong khoảng 0,480-0,504 mg/mL và 2,869-2,306 mg/mL. Kết quả nghiên cứu cho thấy phương pháp định lượng này có thể áp dụng để xác định đồng thời hesperidin và natri benzoat trong sirô Kiện tỳ và các sản phẩm tương tự.

Từ khóa: Sirô Kiện tỳ, Hesperidin, Natri benzoat, Định lượng đồng thời, HPLC.

1. Mở đầu

Trong quả của một số loài thuộc chi *Citrus*, họ Cam (Rutaceae) như *C. sinensis*, *C. paradise*, *C. reticulata*, *C. aurantifolia* và *C. limon* có chứa hàm lượng cao hesperidin (3,5,7-trihydroxyflavanon-7-rhamnoglucosid) - một citroflavonoid thuộc nhóm flavanon [1-3]. Các nghiên cứu đã công bố cho thấy hesperidin có

nhiều tác dụng sinh học có giá trị phòng và điều trị bệnh như chống oxy hóa, chống viêm, giảm đau, kháng khuẩn, kháng nấm, chống ung thư, bảo vệ rối loạn tim mạch, thoái hóa thần kinh,... [1, 4-5]. Hàm lượng hesperidin phụ thuộc vào thứ, thành phần của quả, thời tiết, mức độ trưởng thành của quả [1]. Hai dược liệu từ quả của chi *Citrus* được sử dụng nhiều trong Y học cổ truyền là Trần bì [vỏ quả chín phơi hoặc sấy khô để lâu

* Tác giả liên hệ.

Địa chỉ email: phamquoctuan@duocphutho.edu.vn

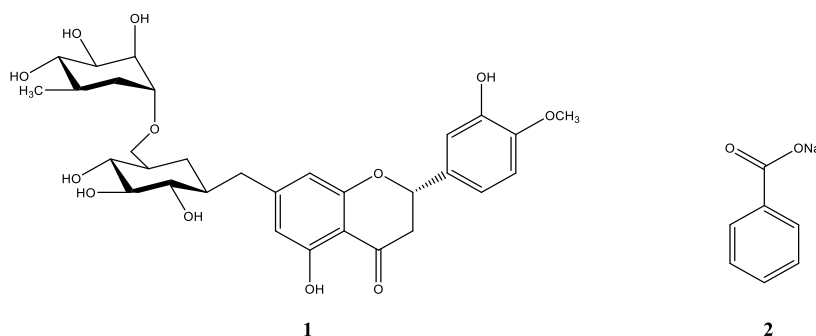
<https://doi.org/10.25073/2588-1132/vnumps.4585>

nấm 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*)] [3]. Theo Dược điển Việt Nam V, hàm lượng của hesperidin trong chuyên luận Trần bì, Chi thực khá cao, lần lượt không dưới 3,5% và 5,0% [3].

Acid benzoic và muối kim loại kiềm, kiềm thổ của nó (kali, natri, calci) được sử dụng làm chất phụ gia bảo quản chống vi sinh vật trong thực phẩm, dược phẩm. Trong đó, natri benzoat được sử dụng rộng rãi trong mỹ phẩm, thực phẩm, dược phẩm. Nồng độ sử dụng trong dược phẩm đường uống là 0,02-0,5% [6].

Sirô Kiện tỳ nghiên cứu được bào chế theo Dược điển Trung Quốc (ChP) 2020 để điều trị tỳ

vị hư nhược, đầy bụng, ăn không tiêu, phân lỏng gồm 6 dược liệu: Đàng sâm, Bạch truật, Trần bì, Chi thực, Sơn tra, Mạch nha và sử dụng natri benzoat làm chất bảo quản [2]. Hàm lượng natri benzoat trong sirô rất quan trọng, ảnh hưởng đến chất lượng, an toàn của chế phẩm. Mặt khác, hesperidin được sử dụng làm marker đánh giá chỉ tiêu hàm lượng của sirô này [2]. Nhằm góp phần xây dựng tiêu chuẩn và nâng cao công tác kiểm tra, giám sát chất lượng thực phẩm bảo vệ sức khỏe, thuốc chứa dược liệu có thành phần là hesperidin và sử dụng chất bảo quản là natri benzoat, nhóm nghiên cứu đã xây dựng và thẩm định phương pháp định lượng đồng thời hesperidin và natri benzoat trong sirô Kiện tỳ bằng kỹ thuật HPLC-PDA.



Hình 1. Cấu trúc hóa học của hesperidin (1) và natri benzoat (2).

2. Nguyên liệu, thiết bị và phương pháp nghiên cứu

2.1. Nguyên liệu, thiết bị

2.1.1. Đối tượng nghiên cứu

- Sirô Kiện tỳ nghiên cứu: do Trung tâm Nghiên cứu và Chuyển giao Công nghệ Dược, Trường Cao đẳng Y Dược Phú Thọ bào chế, gồm 03 lot: KT012023; KT022023 và KT032023.

Công thức: Đàng sâm (*Radix Codonopsis*): 51,3 g; Bạch truật (*Rhizoma Atractylodis macrocephalae*): 76,9 g; Trần bì (*Pericarpium Citri reticulatae*): 51,3 g; Chi thực (*Fructus Aurantii immaturus*): 51,3 g; Sơn tra (*Fructus Crataegi*): 38,5 g; Mạch nha (*Fructus Hordei germinatus*): 38,5 g; Natri benzoat: 3,0 g; Sucrose: 650 g, nước tinh khiết vừa đủ 1000 ml [2].

Lot sirô sử dụng xây dựng phương pháp là KT012023.

- Sirô placebo: sirô đơn không chứa natri benzoat.

2.1.2. Hóa chất, dung môi và chất chuẩn

Các dung môi, hóa chất gồm: acetonitril (MeCN), methanol (MeOH) được mua của hãng Merck KGaA (Đức), dùng cho HPLC; đệm phosphat 0,05 M pH 5,5. Chất chuẩn: hesperidin (1) cung cấp bởi hãng ChemFaces (Trung Quốc), có độ tinh khiết 98,0%; natri benzoat (2) được cung cấp bởi Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương, có độ tinh khiết 99,5%.

2.1.3. 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

μm); 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.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Phương pháp phân tích

Các điều kiện sắc ký để khảo sát như sau:

- Thiết bị: hệ thống máy HPLC Agilent 1260 Technologies với đầu dò DAD, bơm mẫu tự động;
- Cột sắc ký Agilent C18 ($250 \times 4,6 \text{ mm}$; $5 \mu\text{m}$);

- Nhiệt độ cột: $25 \pm 0,1 \text{ }^\circ\text{C}$;

- Pha động: hỗn hợp đệm phosphat 0,05 M pH 5,5 và MeCN;

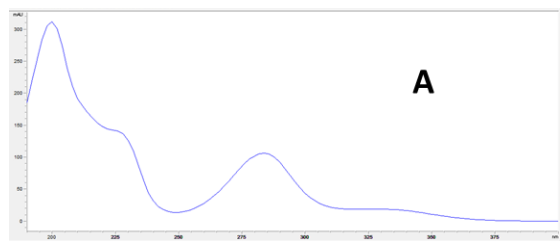
- Thể tích tiêm: $10 \mu\text{l}$;

- Tốc độ dòng: $1,0 \text{ ml/min}$.

Khảo sát bước sóng phát hiện, tỷ lệ dung môi, tốc độ dòng pha động.

2.2.2. Chuẩn bị các dung dịch chuẩn và thử

Dung dịch chuẩn: hòa tan chất chuẩn **1** và **2** trong MeOH 50% để được dung dịch có nồng độ tương ứng chính xác khoảng 10, 20, 50, 100, 200, 500, 1000 $\mu\text{g/ml}$.



Dung dịch thử: đong chính xác 5 ml sirô, cho vào bình định mức 50 ml, thêm khoảng 35 ml MeOH 50%, siêu âm trong 30 min. Để nguội, bổ sung MeOH 50% đến vạch, lắc đều. Lọc qua màng lọc $0,20 \mu\text{m}$ trước khi chạy sắc ký.

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

2.2.3. Thẩm định phương pháp

Thẩm định phương pháp phân tích theo hướng dẫn của ICH, AOAC [7, 8].

2.2.4. Xử lý số liệu thống kê

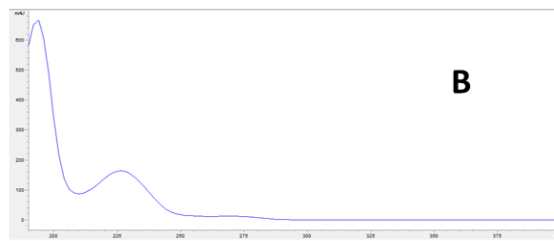
Mỗi mẫu nghiên cứu được làm lặp lại 3 lần. Kết quả được xử lý thống kê bằng phần mềm Microsoft Excel 2019.

3. Kết quả nghiên cứu

3.1. Lựa chọn điều kiện sắc ký

3.1.1. Lựa chọn bước sóng phát hiện

Quét phổ UV của từng dung dịch chuẩn hesperidin (**1**) và natri benzoat (**2**) ở dải bước sóng 200 – 400 nm. Kết quả thu được ở Hình 2.



Hình 2. Phổ UV của hesperidin (A), natri benzoat (B).

Trên phổ UV của chất **1** có cực đại hấp thụ ở các bước sóng 200, 225 và 284 nm; chất **2** có cực đại hấp thụ ở các bước sóng 194 và 225 nm. Để hạn chế sai số trong quá trình thực hiện, bước sóng 225 nm là cực đại hấp thụ của cả 2 chất được lựa chọn làm bước sóng phân tích đồng thời chất **1** và **2**.

3.1.2. Lựa chọn pha động

Sau khi tiến hành khảo sát các điều kiện sắc ký như mục 2.2.1, kết quả lựa chọn được chương trình sắc ký tối ưu tại Bảng 1.

- Cột sắc ký Agilent C18 ($250 \times 4,6 \text{ mm}$; $5 \mu\text{m}$);

- Pha động: đệm phosphat 0,05 M pH 5,5: MeCN=70:30 (tt/tt), rửa giải theo chế độ đẳng dòng;

- Nhiệt độ cột: $25 \pm 0,1 \text{ }^\circ\text{C}$;

- Thể tích tiêm: $10 \mu\text{l}$;

- Tốc độ dòng: $1,0 \text{ ml/min}$.

Với điều kiện sắc ký lựa chọn, hai chất **1** và **2** được tách ra khỏi nhau và tách khỏi các chất khác trong sirô Kiện tỳ. Pic của **1** và **2** cân đối,

gọn, thời gian lưu (t_R) lần lượt là khoảng 4,4 và 6,3 min (Hình 2).

3.2. Thẩm định phương pháp định lượng

3.2.1. Tính thích hợp của hệ thống

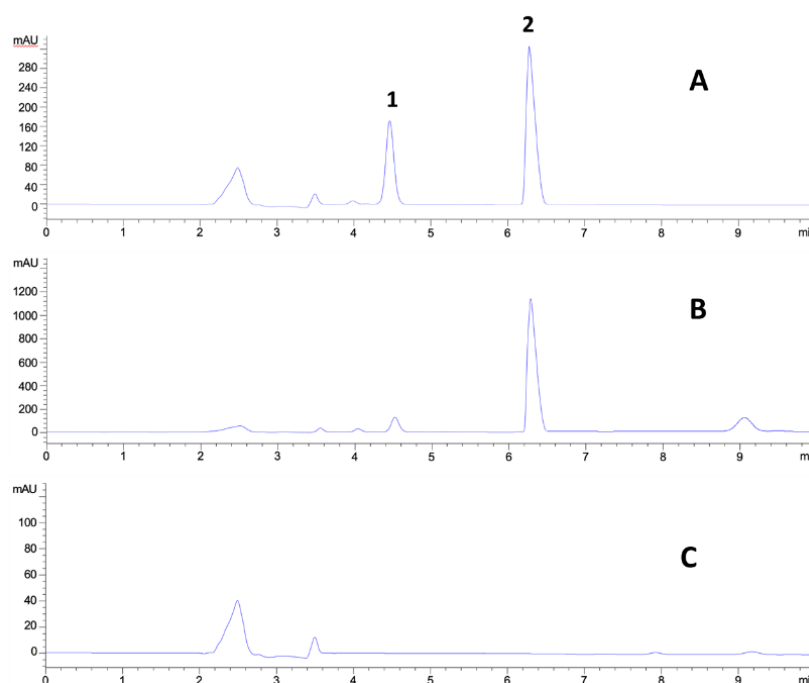
Để xác định tính thích hợp của hệ thống sắc ký, tiến hành tiêm lặp lại 6 lần, mỗi lần 10 μ l dung dịch hỗn hợp chất chuẩn **1** và **2** (nồng độ mỗi chất là 100 μ g/ml) vào hệ thống và chạy sắc

ký ở điều kiện đã lựa chọn. Kết quả thu được S_{pic} và thời gian lưu (t_R) của các chất như trong Bảng 1.

Dữ liệu thực nghiệm ở Bảng 3 cho thấy độ lệch chuẩn tương đối (RSD) của t_R và S_{pic} của hai chất **1-2** đều nhỏ hơn $< 2\%$. Thêm vào đó, độ phân giải (R_s) của 2 pic hesperidin (**1**) và natri benzoat (**2**) là 5,19 ($>1,5$). Như vậy tính tương thích của hệ thống sắc ký phù hợp cho việc định lượng đồng thời chất **1** và **2**.

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

Số lần phân tích	Hesperidin (1)		Natri benzoat (2)	
	t_R (min)	S_{pic} (mAU.s)	t_R (min)	S_{pic} (mAU.s)
1	4,441	496,0	6,321	1198,5
2	4,434	499,7	6,293	1189,9
3	4,419	488,6	6,289	1193,0
4	4,425	493,5	6,280	1178,4
5	4,459	489,3	6,294	1184,6
6	4,427	492,4	6,285	1177,7
Trung bình (TB) \pm SD	4,434 \pm 0,01	493,3 \pm 4,18	6,294 \pm 0,01	1187,0 \pm 8,28
RSD (%)	0,32	0,85	0,23	0,70



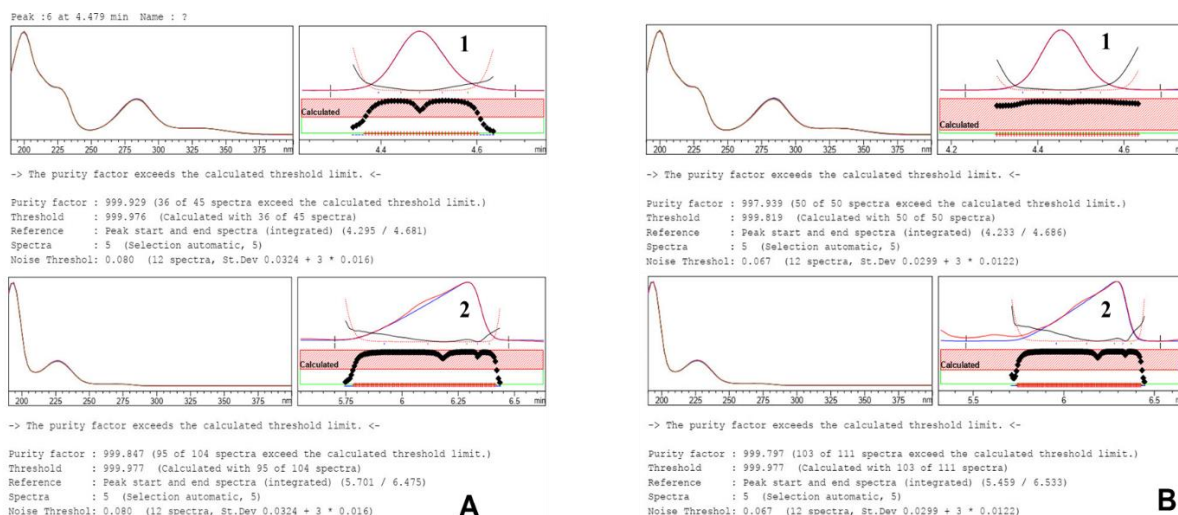
Hình 3. Sắc ký đồ HPLC của hỗn hợp chất chuẩn (A), dung dịch thử (B), mẫu trắng (C).

3.2.2. Độ đặc hiệu của phương pháp

Tiến hành sắc ký dung dịch hỗn hợp chất chuẩn 1 và 2 (nồng độ mỗi chất là 100 µg/ml), dung dịch thử, mẫu trắng. Kết quả được thể hiện ở Hình 3.

Trên các sắc ký đồ ở Hình 3 cho thấy mẫu trắng không có pic tạp tại thời gian lưu của các chất 1-2. Mặt khác, hình dạng phổ UV tương

đồng của pic chất 1 và 2 trên sắc ký đồ của dung dịch chuẩn, dung dịch thử và thời gian lưu trùng nhau (hệ số Math của hai chất là 1 khi chồng phổ UV). Độ tinh khiết của các pic dung dịch chuẩn, dung dịch thử ≥ 99,8% (Hình 4). Như vậy kết luận rằng phương pháp xây dựng có độ đặc hiệu và chọn lọc cao, thích hợp để định lượng đồng thời các chất 1-2 trong sirô Kiện tỳ.



Hình 4. Độ tinh khiết pic chất 1-2 của dung dịch chuẩn (A), dung dịch thử (B).

Bảng 2. Kết quả phương trình tuyến tính, LOD, LOQ của 1, 2

STT	Nồng độ dung dịch (µg/ml)	Spic (mAu.s)	
		Hesperidin (1)	Natri benzoat (2)
1	10	52,5	103,2
2	20	96,5	225,7
3	50	241,6	567,2
4	100	498,5	1192,4
5	200	989,4	2301,5
6	500	2393,7	5734,8
7	1000	4873,4	11348
Phương trình hồi quy		Y = 4,857X + 2,074	Y = 11,355X + 18,048
Hệ số tương quan (R ²)		0,9999	0,9999
LOD (µg/ml)		0,15	0,075
LOQ (µg/ml)		0,50	0,25

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

Chuẩn bị 07 dung dịch hỗn hợp chất chuẩn 1-2 có nồng độ mỗi chất là 10, 20, 50, 100, 200, 500, 1000 µg/ml như Mục 2.2.2. Tiến hành sắc ký theo điều kiện lựa chọn ở trên, ghi kết quả, xử lý số liệu thống kê, tính toán hệ số tương quan (R^2), xây dựng phương trình hồi quy tuyến tính bậc 1. LOD, LOQ của 1, 2 được xác định ở nồng độ dựa trên tỷ lệ tín hiệu chất phân tích chia cho nhiễu đường nền (S/N) lần lượt là 3 và 10 Kết quả thu được ở Bảng 2.

Kết quả thực nghiệm và xử lý số liệu thống kê chỉ ra rằng, trong khoảng nồng độ khảo sát của chất 1 và 2 có sự tuyến tính giữa S_{pic} và nồng

độ, với hệ số tương quan chặt (R^2 của hai chất đều là 0,9999).

LOD, LOQ của chất 1 được xác định lần lượt là 00,15 và 0,50 µg/ml; tương tự, LOD, LOQ của chất 2 lần lượt là 0,75 và 0,25 µg/ml.

3.2.4. Độ lặp lại và độ chính xác trung gian

Tiến hành phân tích sirô Kiện tỳ (lot KT012023) theo quy trình phân tích đã thiết lập, thực hiện trong ngày và ngày kế tiếp, người thực hiện cũng khác nhau, mỗi ngày phân tích 06 mẫu thử. Độ lặp lại được xác định dựa vào kết quả đánh giá ngày thử nghiệm thứ nhất, độ chính xác trung gian dựa vào kết quả ngày thực hiện kế tiếp. Kết quả thu được trình bày ở Bảng 3.

Bảng 3. Kết quả xác định độ lặp lại và độ chính xác trung gian

Số TT	Phân tích trong ngày				Phân tích khác ngày			
	Hesperidin (1)		Natri benzoat (2)		Hesperidin (1)		Natri benzoat (2)	
	Spic (mAU.s)	Hàm lượng (mg/ml)	Spic (mAU.s)	Hàm lượng (mg/ml)	Spic (mAU.s)	Hàm lượng (mg/ml)	Spic (mAU.s)	Hàm lượng (mg/ml)
1	246,5	0,503	3441,0	3,014	249,6	0,510	3505,5	3,071
2	243,7	0,497	3412,1	2,989	252,4	0,515	3528,1	3,091
3	249,1	0,509	3521,3	3,085	247,5	0,505	3493,8	3,061
4	244,4	0,499	3442,4	3,016	248,9	0,508	3491,3	3,059
5	248,9	0,508	3489,1	3,057	246,2	0,503	3442,5	3,016
6	240,8	0,492	3392,2	2,972	243,0	0,496	3418,9	2,995
TB±SD (mg/ml)		0,501±0,007	3,022±0,042		0,506±0,006		3,049±0,036	
RSD (%)		1,32	1,40		1,28		1,18	
Hesperidin: TB = 0,504 mg/ml, RSD= 1,34% (n=12); Natri benzoat: TB = 3,036 mg/ml, RSD= 1,31% (n=12).								

Độ lặp lại và độ chính xác trung gian của phương pháp đều cho giá trị RSD của kết quả phân tích các chất 1-2 trong sirô Kiện tỳ < 2,0 %, nằm trong khoảng cho phép theo quy định của AOAC [8].

3.2.5. Độ đúng

Độ đúng của phương pháp được xác định thông qua đánh giá hiệu suất thu hồi. Hiệu suất thu hồi được xác định bằng phương pháp thêm chuẩn với 3 mức nồng độ 25, 50, 75 µg/ml đối

với hesperidin (1) và 150, 300, 450 µg/ml đối với natri benzoat (2) vào nền sirô (pha loãng 10 lần). Tiến hành phân tích theo điều kiện đã chọn, mỗi mức nồng độ thực hiện 3 lần, kết quả được trình bày trong Bảng 4.

Từ kết quả Bảng 4 cho thấy hiệu suất thu hồi trung bình của hesperidin từ 97,87 % đến 98,62%, natri benzoat từ 98,71 % đến 99,26 % nằm trong khoảng 95,0-105%. Như vậy, phương pháp có độ đúng đạt yêu cầu theo AOAC về hiệu suất thu hồi.

Bảng 4. Kết quả đánh giá hiệu suất thu hồi

Số TT	Hesperidin (1)			Natri benzoat (2)		
	Hàm lượng thêm vào (µg/ml)	Hàm lượng tìm thấy (µg/ml)	Hiệu suất thu hồi (%)	Hàm lượng thêm vào (µg/ml)	Hàm lượng tìm thấy (µg/ml)	Hiệu suất thu hồi (%)
1	0	49,4	-	0	301,6	-
2	25	74,2	99,20	150	446,9	96,87
	25	73,7	97,20	150	452,3	100,47
	25	74,1	98,80	150	450,0	98,93
	Hiệu suất thu hồi trung bình: 98,40% RSD: 1,08%			Hiệu suất thu hồi trung bình: 98,76% RSD: 1,83%		
3	50	97,9	97,00	300	603,3	100,57
	50	98,5	98,20	300	596,6	98,33
	50	98,8	98,80	300	598,2	98,87
	Hiệu suất thu hồi trung bình: 98,00% RSD: 10,94%			Hiệu suất thu hồi trung bình: 99,26% RSD: 1,18%		
4	75	123,1	98,27	450	746,1	98,78
	75	124,2	99,73	450	742,8	98,04
	75	122,8	97,87	450	748,5	99,31
Hiệu suất thu hồi trung bình: 98,62% RSD: 1,00%			Hiệu suất thu hồi trung bình: 98,71% RSD: 0,64%			

3.3. Định lượng hesperidin và natri benzoat trong các lot sirô Kiện tỳ

Áp dụng phương pháp định lượng đã xây dựng và thẩm định ở trên để xác định hàm lượng hesperidin (1) và natri benzoat (2) trong 3 lot sirô

Kiện tỳ nghiên cứu. Kết quả định lượng được thể hiện ở Bảng 5.

Kết quả định lượng cho thấy cả 3 lot sirô có hàm lượng hesperidin đạt chỉ tiêu theo ChP 2020 (>0,2 mg/ml) và hàm lượng natri benzoat từ 96,33% đến 101,20% so với hàm lượng trong công thức.

Bảng 5. Kết quả định lượng hesperidin và natri benzoat trong các lot sirô Kiện tỳ

Số TT	Lot sirô	Hàm lượng (TB±SD, mg/ml)	
		Hesperidin (1)	Natri benzoat (2)
1	KT012023	0,504±0,007	3,036 ±0,040
2	KT022023	0,494 ±0,010	2,983 ±0,071
3	KT032023	0,480 ±0,009	2,869±0,039

4. Bàn luận

Hiện nay có nhiều phương pháp định lượng hesperidin trong dược liệu hoặc chế phẩm chứa dược liệu từ quả của chi *Citrus* như đo quang [3, 9], LC-MS [10], HPTLC [11], HPLC [2, 3, 12, 13]. Theo ChP 2020, phương pháp HPLC được

áp dụng để định lượng hesperidin trong sirô Kiện tỳ với điều kiện sắc ký như sau: Cột Silica gel C18; pha động: hỗn hợp dung môi MeCN : nước: acid phosphoric (20:80:0,1, tt/tt); thể tích tiêm mẫu: 10 µl; bước sóng phát hiện: 284 nm; số đĩa lý thuyết ≥ 4000 [2]. Mặt khác, trong sirô này, natri benzoat được sử dụng làm chất bảo quản

chống ức chế sự phát triển của vi khuẩn, nấm men, nấm mốc hàm lượng là 0,3% [2, 14]. Mặc dù natri benzoat dung nạp tốt, khá an toàn (LD₅₀ đối với chuột nhắt dùng đường uống là 1,6 g/kg) và được WHO chấp nhận liều dùng đường uống hàng ngày là không quá 5 mg/kg thể trọng tính theo acid benzoic [6, 14], ở Trung Quốc không quá 2 g/kg thể trọng [15], tuy nhiên chúng có thể gặp một số tác dụng không mong muốn như nổi mề đay, shock phản vệ, đột biến gen, ảnh hưởng đến hệ thống miễn dịch, gan, thận, khả năng sinh sản,... [6, 14].

Phương pháp HPLC với đầu dò UV hoặc DAD thường được sử dụng để định lượng đồng thời natri benzoat và một số chất khác trong các chế phẩm thực phẩm, dược phẩm, mỹ phẩm [16-18]. Về công bố định lượng đồng thời natri benzoat với flavonoid trong các chế phẩm còn khiêm tốn. Trương Minh Nhật và cộng sự (2023) xây dựng phương pháp định lượng đồng thời naringin, natri benzoat, kali sorbat trong viên nang buri non, sử dụng cột Silica gel C18, pha động: MeCN – dung dịch acid acetic 0,1% trong nước (20 :80, tt/tt); chạy đẳng dòng, tốc độ dòng 1,0 ml/min, bước sóng phát hiện 235 nm; *t_R* đối với naringin, natri benzoat, kali sorbat lần lượt là 12,6, 15,7, 14,7 min [16]. Nghiên cứu của P. B. Andrade và cộng sự (1999) đã phát triển phương pháp định lượng đồng thời natri benzoat và các hợp chất phenolic (acid cinnamic và dẫn xuất, flavonoid) trong mứt Mọc qua (Quince jam), sử dụng cột Spherisorb ODS2 (25,0 x 0,46 cm; 5 μ m); pha động: hỗn hợp nước – acid formic (19:1, tt/tt) (A) và MeOH (B) rửa giải gradient, bước sóng phát hiện 280 nm [19].

Theo tra cứu của chúng tôi, đến thời điểm hiện tại chưa có công trình nào nghiên cứu định lượng đồng thời natri benzoat và hesperidin trong các chế phẩm thuốc, thực phẩm bảo vệ sức khỏe được công bố. Chuyên luận sirô Kiện tỳ trong ChP 2020 chỉ quy định hàm lượng hesperidin ($\geq 0,2$ mg/ml), không quy định hàm lượng natri benzoat mặc dù nó cần phải kiểm soát [2]. Trong nghiên cứu này cho kết quả thời gian phân tích ngắn (khoảng 10 min), dễ thực hiện, kết quả chính xác, tin cậy, ít ảnh hưởng đến

độ bền của cột do sử dụng đệm phosphat thay cho acid phosphoric như ChP2020 [2]. Thêm vào đó, phương pháp phân tích đã được thẩm định và đáp ứng các yêu cầu của ICH, AOAC nên có thể triển khai áp dụng vào thực tiễn để định lượng đồng thời hesperidin, natri benzoat trong sirô Kiện tỳ và các chế phẩm tương tự.

5. Kết luận

Phương pháp định lượng đồng thời hesperidin và natri benzoat trong sirô Kiện tỳ trên hệ thống sắc ký lỏng hiệu năng cao 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. Dựa trên quy trình đã thiết lập, 03 lot sirô nghiên cứu được phân tích, kết quả thu được hàm lượng của hesperidin, natri benzoat lần lượt nằm trong khoảng 0,480-0,504 mg/ml và 2,869-2,306 mg/ml. Phương pháp phân tích này có thể ứng dụng để xác định hàm lượng của hesperidin, natri benzoat trong các chế phẩm chứa 2 chất này.

Tài liệu tham khảo

- [1] G. V. Dijk, A. Editor, Hesperidin: A Review on Extraction Methods, Stability and Biological Activities, Vol. 14, No. 12, 2022, pp. 2387.
- [2] Chinese Pharmacopoeia Commission, Pharmacopoeia of the People's Republic of China, China Medical Science Press, Vol. 1, 2020.
- [3] Vietnamese Ministry of Health, Vietnamese Pharmacopoeia V, Hanoi: Medical Publishing House, Vol. 2, 2017 (in Vietnamese).
- [4] E. M. Galati, M. T. Monforte, S. Kirjavainen, A. M. Forestieri, A. Trovato, M. M. Tripodo, Biological Effects of Hesperidin, A Citrus Flavonoid. (Note D): Antiinflammatory and Analgesic Activity, Farmaco, Vol. 40, No. 11, 1994, pp. 709-712.
- [5] E. M. Altundağ, G. Altunoğlu, M. Güran, G. Şanlıtürk, M. Afshani, D. Balcı, In Vitro Anticancer, Antimicrobial and Antifungal Activity Analysis of Natural Flavonoid Hesperidin, Journal of Nutrition and Internal Medicine, Vol. 23, No. 4, 2021, pp. 4:e2021306.

- [6] R. C. Rowe, P. J. Sheskey, S. C. Owen, *The Handbook of Pharmaceutical Excipients*, Butler & Tanner, Frome, Somerset, 2006.
- [7] ICH, *Validation of Analytical Procedure: Text and Methodology Q2 (R1)*, 2005.
- [8] AOAC International, *Guidelines for Standard Method Performance Requirements*, Appendix F, 2016, pp. 3.
- [9] I. L. Bennani, M. A. Chentoufi, I. Sbai E. Otmani, A. Cheikh, N. Bamou, M. E. Karbane, 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, 2020, pp. 100-107.
- [10] A. V. Hoang, N. L. Pham, N. P. D. Nguyen, H. V. Diep, M. N. Truong, H. L. T. Nguyen, Simultaneous Determination of Naringin and Hesperidin in Young Pomelo Powder by Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry (LC-MS/MS), *Vietnam Medical Journal*, Vol. 523, 2023, pp. 201-206 (in Vietnamese).
- [11] P. Alam, A. Alam, M. K. Anwer, 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, 2014, pp. 262-266.
- [12] F. I. Kanaze, C. Gabrieli, E. Kokkalou, M. Georgarakis, 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, 2003, pp. 243-249.
- [13] T. T. P. Nguyen, T. H. H. Nguyen, T. T. Dam, Simultaneous Determination of Rutin, Hesperidin and Quercetin Contents in Solid Dietary Supplements by High Performance Liquid Chromatography, *Vietnam Journal of Food Control*, Vol. 3, No. 1, 2020, pp. 38-45 (in Vietnamese).
- [14] Ł. J. W. Nowicka, M. Herbet, Sodium Benzoate - Harmfulness and Potential Use in Therapies for Disorders Related to the Nervous System: A Review, *Nutrients*, Vol. 14, No. 7, 2022, pp. 1497.
- [15] N. Xiao, S. Ruan, Q. Mo, M. Zhao, F. Feng, The Effect of Sodium Benzoate on Host Health: Insight into Physiological Indexes and Gut Microbiota, *Foods*, Vol. 12, No. 22, 2023, pp. 4081.
- [16] N. M. Truong, C. H. Nguyen, D. V. Truong, T. L. H. Nguyen, H. T. Nguyen, Simultaneous Determination of Naringin, Sodium Benzoate, Andpotassium Sorbate in Immature Solubility of Product, *Vietnam Medical Journal*, Vol. 1B, No. 530, 2023, pp. 282-288 (in Vietnamese).
- [17] V. T. T. Tong, C. D. Le, H. V. Nguyen, H. T. Phung, Identification and Determination of Benzyl Alcohol, Salicylic Acid, Sodium Benzoate in Shampoo by HPLC Method, *Journal of Drug Quality Control*, Vol. 21, No. 79, 2023, pp. 27-31 (in Vietnamese).
- [18] Development and Validation of a RP-HPLC Method for Simultaneous Determination of Desloratadine and Sodium Benzoate in the Experimental Cough Syrup, *Journal of Drug Quality Control*, Vol. 75, No. 20, 2022, pp. 8-18.
- [19] P. B. Andrade, B. M. Silva, A. R. F. Carvalho, R. M. Seabra, M. A. Ferreira, Development of an Hplc/Diode-Array Detector Method for Simultaneous Determination of Sodium Benzoate and Phenolic Compounds in Quince Jam, *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, Vol. 22, No. 7, 1999, pp. 1069-1075.