

**XÂY DỰNG VÀ THẨM ĐỊNH PHƯƠNG PHÁP ĐỊNH LƯỢNG  
QUERCETIN TRONG CÂY TRAI HOA TRẦN (*MURDANNIA  
NUDIFLORA (L) BRENNAN*) BẰNG SẮC KÝ LỎNG HIỆU NĂNG CAO**

*Nguyễn Văn Khởi<sup>1</sup>, Trần Thị Phương<sup>2</sup>, Lê Việt Hải<sup>1</sup>, Vũ Đức Lợi<sup>2</sup>  
Lê Hồng Dương<sup>3</sup>, Chử Đức Thành<sup>1</sup>, Nguyễn Thị Thanh Hằng<sup>1</sup>, Chử Văn Mến<sup>1\*</sup>*

**Tóm tắt**

**Mục tiêu:** Xây dựng và thẩm định phương pháp định lượng Quercetin trong cây trai hoa trần (*Murdannia nudiflora (L.) Brenan.*) bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao (High-performance liquid chromatography - HPLC). **Phương pháp nghiên cứu:** Khảo sát, lựa chọn điều kiện sắc ký tối ưu, thẩm định theo hướng dẫn của Ủy ban Quốc tế về đồng bộ hóa yêu cầu kỹ thuật phân tích cho dược phẩm dùng trên người (International Conference on Harmonization - ICH) trên các tiêu chí về độ đặc hiệu, độ lặp lại, tuyến tính, độ đúng và độ chính xác. **Kết quả:** Xác định được các điều kiện sắc ký gồm cột Optimapak C<sub>18</sub> (250mm x 4,6mm; 5 $\mu$ m), pha động MeOH - acid formic 0,2% (30:70), tốc độ pha động 0,7 mL/phút, thể tích bơm mẫu là 20 $\mu$ L và bước sóng phát hiện là 370nm. Kết quả thẩm định cho thấy phương pháp có độ đặc hiệu, độ chính xác, độ đúng cao, giới hạn định lượng thấp, đáp ứng yêu cầu về độ tuyến tính. Kết quả định lượng cho thấy hàm lượng Quercetin trong cây trai hoa trần là 15,29  $\pm$  0,18 mg/g. **Kết luận:** Nghiên cứu đã xây dựng được phương pháp HPLC để định lượng Quercetin trong cây trai hoa trần.

**Từ khóa:** Cây trai hoa trần; Quercetin; Sắc ký lỏng hiệu năng cao.

<sup>1</sup>Học viện Quân y

<sup>2</sup>Khoa Dược, Học viện Y Dược học cổ truyền Việt Nam

<sup>3</sup>Trường Đại học Khoa học và Công nghệ Hà Nội, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

\*Tác giả liên hệ: Chử Văn Mến (chuvanmen@vmmu.edu.vn)

Ngày nhận bài: 04/3/2024

Ngày được chấp nhận đăng: 14/7/2024

<http://doi.org/10.56535/jmpm.v49i7.763>

## DEVELOPMENT AND VALIDATION OF THE QUANTIFICATION OF QUERCETIN IN MURDANNIA NUDIFLORA BY HIGH-PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY METHOD

### Abstract

**Objectives:** To develop and validate the quantification of Quercetin in *Murdannia nudiflora* (L.) Brenan using the high-performance liquid chromatography (HPLC) method. **Methods:** Evaluating, selecting the optimal chromatographic conditions, and validating the method according to International Conference of Harmonization (ICH) guidelines for specificity, repeatability, linearity, accuracy, and precision. **Results:** The optimal chromatographic condition was Optimapak C<sub>18</sub> column (250mm x 4.6mm; 5µm), the mobile phase contained MeOH - aqueous acid formic 0.2% (30:70) in isocratic with a flow rate of 0.7 mL/min, injection volume was 20µL, and detection wavelength of 370nm. The method validation results showed good specificity, precision, and accuracy with a low limit of quantitation (LOQ) and good linearity. The developed method was then applied to quantitate the content of Quercetin in *Murdannia nudiflora* (L.) Brenan. The content of quercetin was 15,29 ± 0,18 mg/g. **Conclusion:** The study successfully developed and validated the HPLC method for quantifying Quercetin in *Murdannia nudiflora* (L.) Brenan.

**Keywords:** *Murdannia nudiflora*; Quercetin; High-performance liquid chromatography.

### ĐẶT VẤN ĐỀ

Cây trai hoa trần (*Murdannia nudiflora* (L.) Brenan) là dược liệu có nguồn gốc từ châu Á chủ yếu ở các vùng nhiệt đới và cận nhiệt đới. Tại Việt Nam, cây thường mọc ở ven đường, ven rừng, ven suối, ven sông hay các thung lũng nơi ẩm mát. Trong cây trai hoa trần chứa Quercetin - dẫn xuất nhóm flavonoid có nhiều tác dụng sinh học như chống oxy hoá, giảm đau chống

viêm, kháng khuẩn, chống ung thư, bảo vệ gan... Một số nghiên cứu trên thế giới đã chỉ ra tác dụng chống oxy hoá của Quercetin trên mô hình động vật thực nghiệm [3, 4]. Hiện nay, chưa có nghiên cứu nào tiến hành xây dựng và thẩm định phương pháp định lượng Quercetin trong cây trai hoa trần ở Việt Nam. Vì vậy, nghiên cứu này được thực hiện nhằm: *Xây dựng và thẩm định phương pháp định lượng*

*Quercetin trong cây trai hoa trần ở Việt Nam bằng phương pháp HPLC*, góp phần tiêu chuẩn hóa nguyên liệu cây trai hoa trần ở Việt Nam, là nền tảng cho các nghiên cứu sau này. Đồng thời, nghiên cứu cũng tiến hành so sánh hàm lượng của Quercetin trong mẫu chiết xuất từ cây trai hoa trần theo các phương pháp khác nhau.

## ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 1. Đối tượng, vật liệu nghiên cứu

Toàn thân cây trai hoa trần được thu hái ở thị trấn Thanh Sơn, huyện Thanh Sơn, tỉnh Phú Thọ, thu hái vào tháng 02/2023, được rửa sạch, phơi khô và nghiền nhỏ qua cỡ rây 1400/355, mất khối lượng do làm khô của dược liệu trai hoa trần là  $6,992 \pm 0,137\%$ .

Quercetin chuẩn 98% (Viện Dược Liệu). Methanol, acid formic, ethanol và các hóa chất khác đạt tiêu chuẩn phân tích HPLC.

Hệ thống HPLC Waters CBIC/Eqm.03.02 (Mỹ), cân phân tích, máy lắc siêu âm.

### 2. Phương pháp nghiên cứu

\* *Phương pháp nghiên cứu*: Khảo sát chiết dược liệu bằng dung môi ethanol ở các nồng độ 90%, 70%, 50%

và 30%, trong các khoảng thời gian 30 phút, 60 phút, 90 phút, 180 phút. Chiết theo phương pháp siêu âm và chiết hồi lưu, so sánh kết quả và lựa chọn phương pháp chiết phù hợp nhất. Hàm lượng Quercetin trong dịch chiết được định lượng bằng HPLC.

\* *Chuẩn bị dung dịch chuẩn và thử*:

- Mẫu chuẩn: Hòa tan 1mg Quercetin chuẩn trong 50mL EtOH 30% để được dung dịch có nồng độ 20  $\mu\text{g/mL}$ .

- Mẫu thử: Cân chính xác khoảng 1,0g bột trai hoa trần chiết siêu âm với 15mL EtOH 30% trong 90 phút. Lọc dịch chiết qua giấy lọc, cho vào máy ly tâm để ly tâm với tốc độ 10.000 vòng trong 2 phút, sau đó gạn lấy lớp trên, cuối cùng lọc qua màng lọc 0,45 $\mu\text{m}$ .

- Mẫu trắng: EtOH 30%.

\* *Lựa chọn điều kiện sắc ký*:

- Cột Optimapak C<sub>18</sub> (250mm x 4,6mm; 5 $\mu\text{m}$ ); pha động: MeOH - acid formic 0,2% (30:70); tốc độ dòng 0,7 mL/phút; thể tích tiêm 20 $\mu\text{L}$ ; detector PDA-UV tại bước sóng 370nm.

Hệ dung môi tối ưu cho HPLC được khảo sát từ các hệ dung môi: acetonitril :methanol, acid acetic:methanol, acid formic:methanol. Kết quả chọn ra được dung môi ethanol 30% và hệ dung môi MeOH - acid formic 0,2% (30:70), là

dung môi và hệ dung môi tối ưu nhất để định lượng Quercetin chuẩn và Quercetin trong cây trai hoa trần.

\* *Thẩm định phương pháp phân tích* [5]: Thực hiện yêu cầu chung của ICH, phương pháp phân tích được thẩm định về độ đặc hiệu, tính tương thích của hệ thống sắc ký, độ đúng và độ lặp lại, giới hạn phát hiện (LOD), khoảng tuyến tính và giới hạn định lượng (LOQ).

Áp dụng phương pháp xây dựng được định lượng Quercetin trong mẫu

cây trai hoa trần: Sử dụng phương pháp đã được thẩm định tiến hành định lượng một số mẫu dược liệu của cây trai hoa trần

\* *Xử lý số liệu*: Bằng các phần mềm chuẩn Excel.

### 3. Đạo đức nghiên cứu

Bài báo tuân thủ đầy đủ các quy định về đạo đức trong lĩnh vực nghiên cứu y Sinh học. Nhóm tác giả cam kết không có xung đột lợi ích trong nghiên cứu.

## KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ BÀN LUẬN

### 1. Kết quả khảo sát tối ưu hoá điều kiện chiết và điều kiện sắc ký

Kết quả khảo sát dung môi chiết giữa ethanol ở các nồng độ 90%, 70%, 50% và 30% trong 90 phút bằng phương pháp siêu âm cho thấy ở các nồng độ chiết bằng ethanol 30% cho diện tích pic là cao nhất.

**Bảng 1.** Kết quả khảo sát dung môi chiết dược liệu và theo các khoảng thời gian.

Dung môi	Thời gian (phút)	Diện tích pic (mAU*s)	Dung môi	Thời gian (phút)	Diện tích pic (mAU*s)
EtOH 70	90	1152027	EtOH 30	30	1090773
EtOH 50	90	1315158	EtOH 30	60	1154761
EtOH 30	90	1589868	EtOH 30	90	1589868

Kết quả lựa chọn phương pháp chiết: Cân khoảng 1,0g dược liệu cho vào bình chiết, thêm dung môi tới vạch, dung môi chiết xuất là EtOH 30%, chiết 1 lần, thời gian chiết là 90 phút, tỷ lệ dung môi/dược liệu là 15/1. Tiến hành khảo sát hai phương pháp là phương pháp chiết siêu âm và phương pháp chiết hồi lưu.

**Bảng 2.** Kết quả khảo sát lựa chọn phương pháp chiết xuất.

Mẫu	Hiệu suất chiết Quercetin từ dược liệu Trai hoa trần (%)			
	Phương pháp siêu âm		Phương pháp hồi lưu	
	Spic ( $\mu\text{V}\cdot\text{s}$ )	Khối lượng (g)	Spic ( $\mu\text{V}\cdot\text{s}$ )	Khối lượng (g)
1	1589868	1,0109	1280827	1,042
2	1535160	0,9501	1240716	1,009
3	1581996	1,0001	1242340	1,011
$\bar{X} \pm \text{SD}$	$1569008 \pm 29576$	$0,9897 \pm 0,0356$	$1254627 \pm 22703$	$1,0207 \pm 0,0185$

Kết quả ở bảng 1 cho thấy phương pháp chiết siêu âm cho diện tích pic cao hơn nhiều so với phương pháp hồi lưu. Do vậy, phương pháp chiết siêu âm được lựa chọn cho các khảo sát tiếp theo.

Từ các kết quả trên, chúng tôi đưa ra điều kiện xử lý mẫu tối ưu như sau: Cân chính xác khoảng 1,0g bột trai hoa trần chiết siêu âm với 15mL EtOH 30% trong 90 phút. Lọc dịch chiết qua giấy lọc, cho vào máy ly tâm để ly tâm với tốc độ 10.000 vòng trong 2 phút, sau đó gạn lấy lớp trên, cuối cùng lọc qua màng lọc 0,45 $\mu\text{m}$ .

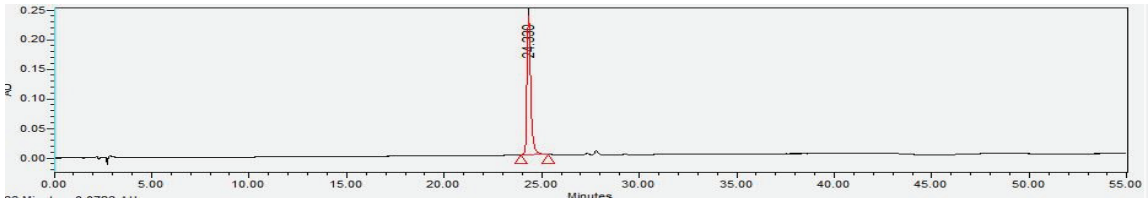
Khảo sát các điều kiện HPLC được lựa chọn theo yêu cầu để thu được sắc ký đồ với độ phân giải tốt hơn của các pic liên kề trong thời gian lưu tốt hơn. Các dung dịch rửa giải sắc ký được thêm các loại acid khác nhau (acid acetic, acid formic, acid phosphoric) ở các nồng độ khác nhau (0,01M, 0,05M

và 0,1M) để tiến hành khảo sát, đánh giá khả năng tách các thành phần trong mẫu. Kết quả cho thấy, khi thêm acid formic 0,2% vào pha động pic thu được có độ phân giải tốt và đối xứng về hình dạng. Sau khi khảo sát các hệ dung môi acetonitril:methanol; acid acetic:methanol; acid formic:methanol; acid phosphoric:methanol thấy acid formic:methanol cho kết quả tốt hơn các hệ còn lại; do đó, hệ này được lựa chọn làm điều kiện sắc ký.

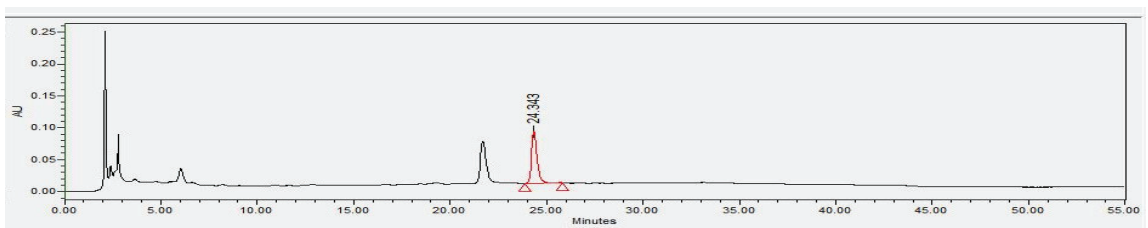
Khảo sát tín hiệu thu được ở bước sóng từ 254 - 400nm cho thấy tại bước sóng 370nm, giá trị tỷ lệ tín hiệu trên nhiều cao nhất, do đó, bước sóng này được chọn để phân tích. Sắc ký đồ thu được từ các mẫu chuẩn và mẫu thử được thể hiện rõ. Các đỉnh sắc ký của chất phân tích trong mẫu được xác định bằng cách so sánh thời gian lưu của chúng với thời gian lưu của chất chuẩn đối chiếu.

## 2. Kết quả thẩm định phương pháp

Sắc ký đồ của Quercetin trong mẫu chuẩn (a) và mẫu thử (b) ở nồng độ EtOH 30<sup>0</sup>:



Mẫu Quercetin chuẩn (a)

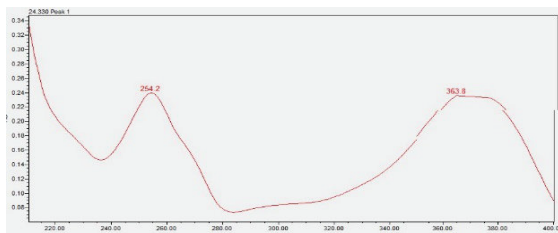


Mẫu thử (b)

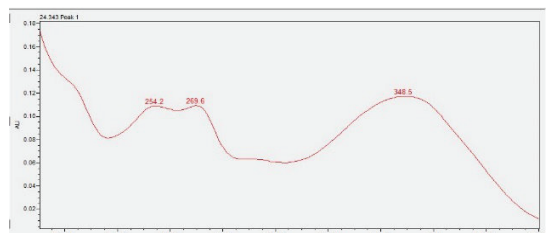
**Hình 1.** Sắc ký đồ của Quercetin trong mẫu chuẩn (a) và mẫu thử (b) từ dịch chiết trai hoa trần.

Kết quả cho thấy hình ảnh pic tách rõ ràng, sắc nét, nhiều nền thấp. Thời gian xuất hiện pic Quercetin trong mẫu thử là 24,343 phút tương ứng với thời gian xuất hiện pic Quercetin mẫu chuẩn (24,330 phút) (Hình 1).

So sánh về phổ hấp thụ UV của mẫu thử và mẫu chuẩn: Kết quả chồng phổ cho thấy, mẫu thử và mẫu chuẩn có độ trùng khít của phổ là 0,9986 (Hình 2), chứng tỏ pic thu được trên sắc ký đồ giữa mẫu thử tinh khiết và các thành phần khác có trong mẫu thử không ảnh hưởng đến việc phân tích Quercetin, từ đó, cho phép tiến hành định tính, định lượng.



Phổ UV mẫu chuẩn (a)



Phổ UV mẫu thử (b)

**Hình 2.** Phổ UV của Quercetin trong mẫu chuẩn (a) và mẫu thử (b) từ dịch chiết trai hoa trần.



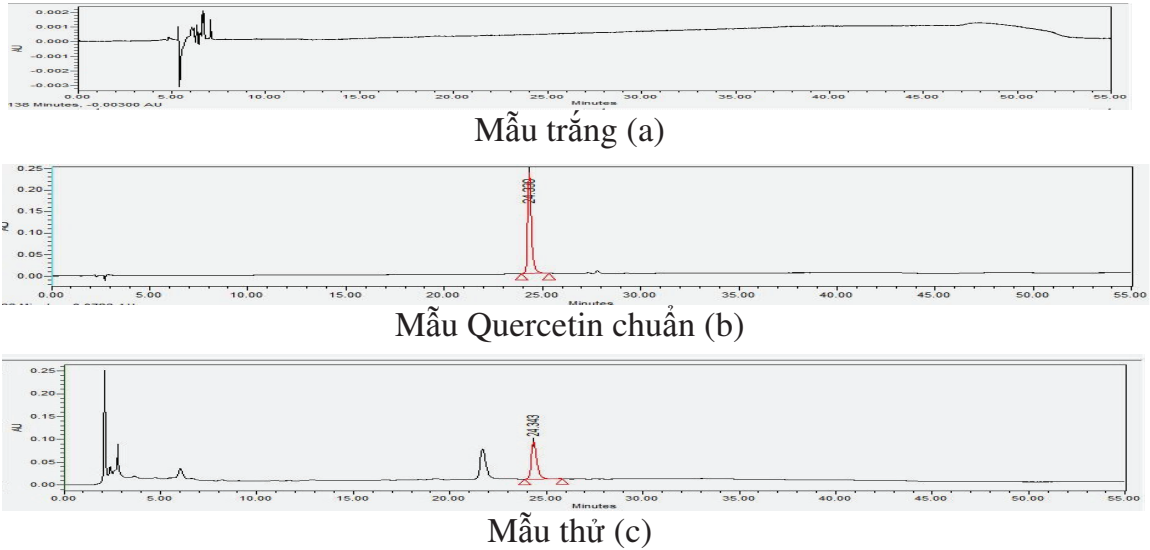
Tính tương thích hệ thống: Tiến hành sắc ký lặp lại 6 lần mẫu chuẩn Quercetin nồng độ 250 µg/mL theo điều kiện sắc ký. Chuẩn Quercetin có độ tinh khiết 98,1%, trong quá trình cân, khối lượng mẫu chuẩn đã cân là 0,001g. Kết quả tính tương thích hệ thống được thể hiện ở bảng 2. Tính thích hợp của hệ thống sắc ký được đánh giá dựa vào độ lệch chuẩn tương đối, diện tích pic, thời gian lưu.

**Bảng 3.** Kết quả tính tương thích của hệ thống sắc ký được đánh giá.

STT	Thời gian lưu (phút)	Diện tích pic (mAU*s)	Số đĩa lý thuyết	Hệ số bất đối xứng
1	24,795	3,110,061	77833	1,04
2	24,741	3,195,032	79957	1,07
3	24,330	3,085,880	77225	1,03
4	24,914	3,129,559	78318	1,05
5	24,378	3,094,794	77448	1,04
6	24,723	3,192,226	79886	1,07
$\bar{X} \pm SD$	$24,65 \pm 0,24$	$3134592 \pm 48080,17$	$78444 \pm 1203$	$1,05 \pm 0,016$
RSD (%)	0,96	1,53	1,53	1,59

Kết quả ở bảng 3 cho thấy, độ lệch chuẩn tương đối RSD (%) về diện tích pic 1,53 và thời gian lưu 0,96 đều < 2%. Như vậy, phương pháp phù hợp với hệ thống phân tích.

Tính đặc hiệu: Tiến hành phân tích đồng thời mẫu chuẩn Quercetin, mẫu trắng và mẫu thử trong cùng điều kiện sắc ký (Hình 3). Kết quả cho thấy, thời gian xuất hiện pic của Quercetin trên sắc ký đồ mẫu thử và mẫu chuẩn như nhau. Pic không xuất hiện ở mẫu trắng trong thời gian tương ứng. Pic trên mẫu chuẩn và mẫu thử sắc nét, rõ ràng, độ rộng chân pic nhỏ. Kết quả cho thấy phương pháp phân tích có tính đặc hiệu đảm bảo.

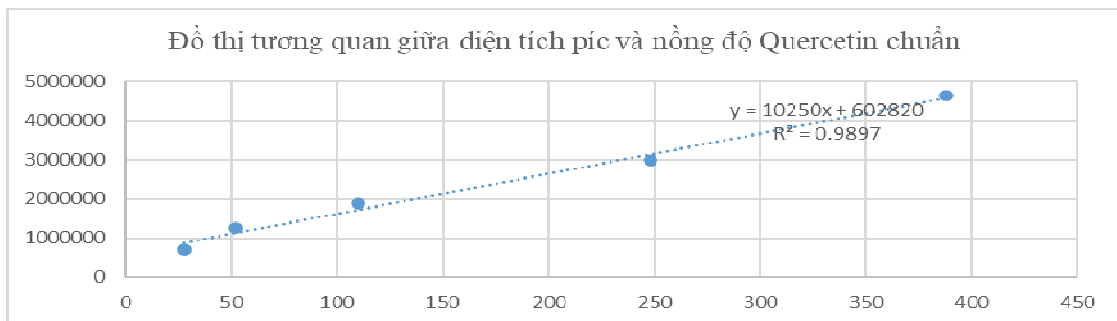


**Hình 3.** Sắc ký đồ của Quercetin trong 3 mẫu: Mẫu trắng (a), mẫu chuẩn (b), mẫu thử (c).

Khoảng nồng độ tuyến tính: Khảo sát khoảng tuyến tính của phương pháp, nghiên cứu tiến hành pha một dãy dung dịch chuẩn có nồng độ 25, 50, 100, 250, 400  $\mu\text{g/mL}$ , sau đó, xác định tương quan giữa diện tích pic và nồng độ các dung dịch Quercetin chuẩn.

**Bảng 4.** Sự tương quan giữa diện tích pic và nồng độ Quercetin chuẩn.

Nồng độ chuẩn Quercetin ( $\mu\text{g/mL}$ )	Diện tích pic ( $\mu\text{V*s}$ )
27,7	719941
52,2	1254236
110	1891113
248,5	2980110
388	4639164



**Hình 4.** Đồ thị tương quan: Diện tích pic và nồng độ Quercetin chuẩn.



Kết quả ở bảng 4 và hình 4 cho thấy khoảng nồng độ khảo sát có sự tương quan tuyến tính giữa diện tích pic và nồng độ Quercetin chuẩn với phương trình đường chuẩn là  $y = 10250x + 602820$ , giá trị  $R^2 = 0,9897$ .

Độ đúng và độ lặp lại:

**Bảng 5.** Kết quả đánh giá độ lặp lại.

Khối lượng dược liệu (g)	Diện tích pic ( $\mu V*s$ )	Hàm lượng (mg/g)
0,9789	1548133	15,18
1,0439	1611014	15,18
1,0001	1584122	15,39
1,0215	1601707	15,37
0,9501	1535160	15,43
1,0109	1589868	15,35
	$\bar{X} \pm SD$	15,320 $\pm$ 0,108
	RSD (%)	0,705

Kết quả bảng 4 cho thấy phương pháp có độ lặp lại cao với RSD = 0,705%. Hàm lượng của Quercetin trong dược liệu trai hoa trần là 15,320  $\pm$  0,108 mg/g.

**Bảng 6.** Kết quả đánh giá độ đúng.

Thêm vào (mg)	Diện tích pic	Tìm lại (mg)	Độ thu hồi (%)	$\bar{X} \pm SD$	RSD (%)
3,062	1968034	3,01	98,40		
3,062	1981386	3,12	101,81	100,60 $\pm$ 1,91	1,90
3,062	1980597	3,11	101,61		
7,655	2448802	6,77	88,44		
7,655	2465358	6,90	90,13	89,22 $\pm$ 0,85	0,96
7,655	2455225	6,82	89,09		
15,31	3501826	15,00	97,96		
15,31	3446010	14,56	95,12	97,2 $\pm$ 1,82	1,88
15,31	3512529	15,08	98,51		

Kết quả phân tích dung dịch thử thêm chuẩn được trình bày ở bảng 5. Tỷ lệ thu hồi ở các nồng độ khác nhau từ 88,44 - 101,81 nằm trong khoảng 80 - 120% so với lượng chuẩn thêm vào; RSD thu được từ 0,96 - 1,90 < 2%, chứng tỏ phương pháp được phát triển đảm bảo độ chính xác trong khoảng nồng độ 80 - 120% nồng độ định lượng theo yêu cầu của ICH.

Giới hạn phát hiện và giới hạn định lượng: Tiến hành xác định LOD bằng cách định lượng hoạt chất có trong mẫu thử, sau đó pha loãng dung dịch

thử này nhiều lần để được các dung dịch thử có nồng độ giảm dần, tiến hành sắc ký để xác định nồng độ tối thiểu, đồng thời phát hiện được đáp ứng của chất phân tích

Kết quả cho thấy giới hạn phát hiện và giới hạn định lượng của Quercetin lần lượt là 0,001 µg/mL và 0,004 µg/mL.

Kết quả áp dụng phương pháp đã thẩm định định lượng Quercetin trong trai hoa trần: Sử dụng phương pháp thẩm định được tiến hành định lượng các mẫu trai hoa trần có kết quả thể hiện ở bảng 7.

**Bảng 7.** Hàm lượng Quercetin trong trai hoa trần.

Mẫu	Khối lượng dược liệu (g)	Diện tích pic (µV*s)	Hàm lượng (mg/g)
Mẫu 1	1,042	1602213	15,08
Mẫu 2	1,012	1593902	15,40
Mẫu 3	1,003	1585232	15,38
	$\bar{x} \pm SD$		15,29 ± 0,18

Kết quả cho thấy hàm lượng Quercetin trong trai hoa trần là 15,29 ± 0,18 mg/g. Phương pháp đã xây dựng cho độ chính xác và tin cậy cao.

**KẾT LUẬN**

Nghiên cứu đã xây dựng và thẩm định được phương pháp định lượng Quercetin trong cây trai hoa trần bằng phương pháp HPLC sử dụng cột Optimapak C<sub>18</sub> (250mm x 4,6mm; 5µm); pha động: MeOH - acid formic 0,2% (30:70); tốc

độ dòng 0,7 mL/phút; thể tích tiêm 20µL; detector PDA-UV tại bước sóng 370nm. Kết quả thẩm định cho thấy phương pháp có độ tuyến tính cao, độ đúng, độ chính xác, độ đặc hiệu cao, giới hạn định lượng thấp cho phép định lượng các mẫu có hàm lượng hoạt chất thấp.

**TÀI LIỆU THAM KHẢO**

1. Bộ Y tế. Dược liệu học I & II. Nhà xuất bản Y học Hà Nội. 2011; 74-85.
2. Mạnh NH, Men, CV Lợi, VĐ, & Linh, TX. Chiết xuất, phân lập một số hợp chất từ lá cây bao tử (*Murdannia bracteata* (CB Clarke) JK Morton ex DY Hong). *Journal of 108-Clinical Medicine and Phamarcy*. 2019.
3. Huang ZF, et al. Study on the components and antioxidant activities of the liposoluble constituents from *Murdannia nudiflora* (Linn.) Brenan. *Chin. J. Mod. Appl. Pharm.* 35:674-677. Atkinson Jeffrey Lansing (2014), *Biology, ecology, and control of doveweed* (*Murdannia nudiflora* [L.] Brenan), Clemson University. 2018.
4. Hong Deyuan, et al. *Murdannia nudiflora*. *Flora of China*. 2000; (24)30.
5. Patwari BN, et al. Phytochemical screening and analgesic effects of ethanolic extract of plant *Murdannia nudiflora* (L) Brenan (Commelinaceae) in albino mice using hot plate method. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 2014; (6):512-515.
6. Thái Duy Thìn, Vũ Đức Lợi, Đặng Thị Ngọc Thu, Nghiên cứu định lượng quercetin nguyên liệu bằng phương pháp HPLC. *Tạp chí Dược học*. 2010; (411):43.