

Xác định quercetin dạng tự do trong dịch chiết nụ hoa của cây Hòe (*Sophora japonica* L.) bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao

Lê Huy Hoàng^{1,2,*}, Đỗ Thị Hải Anh¹, Đỗ Thị Huệ¹,
Trần Thị Kiều Oanh³, Nguyễn Quang Huy¹

¹Khoa Sinh học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQGHN,
334 Nguyễn Trãi, Thanh Xuân, Hà Nội, Việt Nam

²Viện Công nghệ mới, Viện Khoa học và Công nghệ Quân sự,
17 Hoàng Sâm, Nghĩa Đô, Cầu Giấy, Hà Nội, Việt Nam

³Bệnh viện Quân Y 354, 120 Đốc Ngữ, Ba Đình, Hà Nội, Việt Nam

Nhận ngày 16 tháng 8 năm 2017

Chỉnh sửa ngày 09 tháng 9 năm 2017; Chấp nhận đăng ngày 10 tháng 10 năm 2017

Tóm tắt: Bài báo đã thiết lập được kỹ thuật tách, định tính trực tiếp quercetin dạng tự do (aglycon) trong dịch chiết methanol nụ hoa Hòe bằng phương pháp HPLC đơn giản, dễ thực hiện. Nghiên cứu thực nghiệm trên hệ thống HPLC Agilent 1260 Infinity với cột pha đảo ZORBAX SB-C18 (nhiệt độ 25°C), tốc độ dòng 0,5 ml/phút, áp suất trung bình 30-35 bar và đầu dò dây diot quang (DAD) chúng tôi đã lựa chọn được bước sóng $\lambda = 370\text{nm}$, thể tích tiêm mẫu 20 μl , thời gian phân tích 16 phút với hệ pha động (% thể tích) gồm methanol (15%), acetonitril (20%) và hỗn hợp C (65%, pha sẵn chứa 1% axit axetic gồm methanol, acetonitril và H₂O với tỉ lệ % thể tích lần lượt là 40%, 15%, 45%). Theo điều kiện sắc ký đó, rửa giải đẳng dòng kết hợp phương pháp chuẩn ngoại và thêm chất chuẩn quercetin vào mẫu thử, chúng tôi đã xác định được quercetin tự do trong dịch chiết nụ hoa Hòe có thời gian lưu $t_r = 8,84 \pm 0,04$ (phút). Độ ổn định của hệ thống đã được đánh giá thông qua độ lệch chuẩn tương đối (RSD,%) của thời gian lưu, diện tích, chiều cao và hệ số kéo đuôi của đỉnh quercetin tự do trong dịch chiết hoa Hòe. Kết quả cho thấy các giá trị RSD đều nhỏ hơn 1%, chứng tỏ phương pháp HPLC thiết lập được có độ chọn lọc và độ chính xác cao. Kết quả này tạo tiền đề cho các nghiên cứu tiếp theo nhằm kết hợp phương pháp hóa lý và sinh học trong nghiên cứu về hoạt chất quercetin.

Từ khóa: Quercetin, HPLC, nụ hoa Hòe, dịch chiết methanol, *Sophora japonica* L.

1. Đặt vấn đề

Quercetin là flavonoid thực vật có hoạt tính chống oxy hóa mạnh [1], ngay cả ở nồng độ thấp [1-3]. Quercetin được sử dụng làm nguyên

liệu cho lĩnh vực thực phẩm chức năng, mỹ phẩm,... [4-5]. Quercetin tồn tại tự nhiên ở dạng tự do (gọi là aglycon) hoặc dạng liên kết, thường gặp là rutin [4-5]. Ở nước ta và một số nước Châu Á khác, quercetin được thu nhận chủ yếu từ rutin trong nụ hoa khô của cây Hòe (*Sophora japonica* L.). Flavonoid có nhiều ở cây Hòe, trong đó hàm

*Tác giả liên hệ. ĐT: 84-983191138.

Email: hoang201314@gmail.com

<https://doi.org/10.25073/2588-1140/vnunst.4534>

lượng rutin là lớn nhất (6 đến 38% trong nụ) [5-6].

Điều kiện thu nhận hoạt chất tự nhiên sẽ phát sinh các gốc oxy hóa [7-8] và quercetin có đặc tính chống oxy hóa sẽ dễ bị biến đổi [7-9]. Khi đó, độ ổn định đồng thời về đặc tính hóa lý và sinh học của quercetin dạng aglycon trong quá trình thu nhận cần phải được nghiên cứu và đánh giá đầy đủ [7-8-9]. Trong nghiên cứu hoạt tính chống oxy hóa của hợp chất tự nhiên, các mô hình kết hợp kỹ thuật sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) với phản ứng quét gốc tự do DPPH đã được nghiên cứu và phát triển [10-11-12-13]. Sự có mặt của hoạt chất và mức độ tương tác với gốc tự do được đánh giá thông qua thời gian lưu, diện tích và/hoặc chiều cao của đỉnh quan tâm. Theo chúng tôi được biết chưa có mô hình tương tự được áp dụng cho hoạt chất quercetin thu nhận ở Việt Nam.

Hệ thống HPLC trong các mô hình kết hợp đó được sử dụng để trực tiếp phân tách, định tính, định lượng hoạt chất trong mẫu nghiên cứu. Điều kiện thực nghiệm cần phải đáp ứng yêu cầu của phương pháp phân tích HPLC. Các yếu tố ảnh hưởng đến kết quả phân tích HPLC bao gồm sự tinh sạch của mẫu, pha động, loại cột, thể tích tiêm mẫu và bước sóng cũng như loại đầu dò phát hiện [10].

Với mục tiêu phát triển mô hình nói trên để nghiên cứu về đặc tính hóa lý và sinh học của hoạt chất quercetin, bài báo này tập trung xác định điều kiện phân tách, nhận diện đỉnh quercetin và đánh giá độ ổn định của hệ thống HPLC trên mẫu nghiên cứu là dịch chiết methanol từ nụ hoa hòe.

2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Nguyên liệu

- Dung môi methanol, acetonitril, axit axetic băng được cung cấp bởi hãng Merck, Đức dùng cho phân tích HPLC. Các dung môi dùng cho chiết xuất, đạt yêu cầu phân tích được cung cấp từ công ty TNHH TEKCO Việt Nam.

- Mẫu chuẩn quercetin ($C_5H_{10}O_7 \cdot 2H_2O$), số kiểm soát 0216322.02, là chuẩn dược điển Việt Nam do Viện kiểm nghiệm thuốc Trung Ương/Bộ Y tế cung cấp, có độ ẩm 8,75 %, hàm lượng tính theo chất khan là 90,87%.

- Mẫu nụ hoa Hòe, là dược liệu chuẩn có nguồn gốc từ cây Hòe (*Styphnolobium japonicum* (L) Schott Syn hoặc *Sophora japonica* L.), họ Đậu (Fabaceae), số kiểm soát CV 0116042.01, do Viện kiểm nghiệm thuốc Trung Ương/Bộ Y tế cung cấp. Mẫu nụ hoa hòe là nụ hoa đã phơi hoặc sấy nhẹ đến khô, có độ ẩm 10,0%, hàm lượng rutin 21,1%.

2.2. Thiết bị

- Hệ thống HPLC dùng trong nghiên cứu là Agilent 1260 Infinity Bio-Inert Quaternary LC System hãng Agilent Technologies, Đức) [13] với phần mềm Open LAB CDS.

- Mẫu nghiên cứu được xử lý trên các thiết bị: máy siêu âm Elmasonic S-100, máy lọc chân không, cân phân tích, máy đo pH, cối nghiền mẫu. Các dụng cụ thủy tinh (bình định mức, pipet, cối nghiền), đồ tiêu hao (giấy lọc, màng lọc, đầu hút) đạt chất lượng dùng cho phân tích được cung cấp bởi công ty TNHH TEKCO Việt Nam.

2.3. Phương pháp

2.3.1. Xử lý mẫu thử

Nụ hoa Hòe nguyên hạt, không sấy lại được cân lấy khoảng 1g, thêm 25 ml methanol, siêu âm ở nhiệt độ $65^{\circ}C$ trong 30 phút, lọc và thu dịch chiết [5-7-14]. Phần bã sau lọc được nghiền nhỏ trên cối thủy tinh, thêm 25ml methanol, tiếp tục siêu âm ở điều kiện như trên. Các phần dịch chiết và bã của mẫu thử sau siêu âm được gộp lại, cho vào bình chiết, ngâm qua đêm. Sau thời gian ngâm, dịch chiết được thu lại bằng cách nhỏ giọt, lọc và được định mức 100 ml bằng methanol. Dịch chiết sau định mức được hút lấy 5 ml, lọc qua màng lọc $0,45 \mu m$, thu dịch lọc và bảo quản dịch ở $4^{\circ}C$.

2.3.2. Xử lý mẫu chuẩn

Mẫu chuẩn quercetin được cân lấy 10 mg, cho vào bình định mức 10 ml, hòa tan và thêm đủ methanol tới vạch, lắc đều [5]. Dung dịch đó

được lấy chính xác 1 ml, tiếp tục cho vào bình định mức 10 ml, thêm methanol tới vạch. Tiếp tục lặp lại 1 lần nữa thu được dung dịch quercetin mẫu chuẩn nồng độ 10 µg/ml (dạng $C_5H_{10}O_7 \cdot 2H_2O$), lọc qua màng lọc 0,45 µm, thu dịch lọc và bảo quản dịch ở 4°C.

2.3.3. Xử lý mẫu cho thí nghiệm thêm chất chuẩn quercetin vào dịch chiết hoa Hòe

- Mẫu 1: Dung dịch methanol chứa quercetin chuẩn (nồng độ 10µg/ml) được lấy chính xác 0,5 ml và thêm vào 0,5 ml methanol, được mẫu 1 có thể tích 1 ml.

- Mẫu 2: Dịch chiết methanol của nụ hoa Hòe được lấy chính xác 0,5 ml và thêm vào chính xác 0,5 ml dung dịch quercetin chuẩn (nồng độ 10µg/ml, pha trong methanol), trộn lẫn được hỗn hợp mẫu 2 có thể tích 1 ml.

- Mẫu 3: Dịch chiết methanol của nụ hoa Hòe được lấy chính xác 0,5ml và thêm vào 0,5 ml methanol được mẫu 3 có thể tích 1ml.

Dung dịch quercetin chuẩn và dịch chiết methanol của nụ hoa Hòe được chuẩn bị theo phần xử lý mẫu chuẩn và mẫu thử như đã nêu ở trên. Các mẫu được bảo quản ở 4°C.

2.3.4. Nghiên cứu thiết lập phương pháp HPLC

- Mẫu nghiên cứu được phân tách trên cột pha đảo ZORBAX SB-C18 (Agilent) có kích thước 4,6 x 150 mm, cỡ hạt 5µm. Áp suất cột có thể điều chỉnh từ 0 đến 400 bar. Nhiệt độ phân tách là 25°C [10]. Tốc độ dòng là 0,5 ml/phút [15]. Thời gian phân tích không quá 25 phút [10].

- Tiêm mẫu [10]: Mẫu khảo sát được tiêm tự động ở các thể tích là 10µl, 15µl, 20µl và 25µl để lựa chọn thể tích tiêm phù hợp cho hệ thống sắc ký dùng cho nghiên cứu.

- Pha động: Trên cơ sở tỉ lệ tham khảo [16-17], chúng tôi tạo kênh C pha sẵn chứa 1% axit axetic, chứa các thành phần với % thể tích methanol/acetonitril/ H_2O lần lượt là 40/15/45.

Pha động được rửa giải theo cách thức đẳng dòng có tỉ lệ phối trộn khác nhau của kênh A (methanol), kênh D (acetonitril) và kênh C. Trong đó kênh C có thành phần như đã mô tả ở trên, có thể tích giảm dần trong các hệ khảo sát từ 1 đến 6. Các hệ khảo sát có tỉ lệ như sau: hệ

1(0/100/0), hệ 2 (10/80/10), hệ 3(10/70/30), hệ 4 (15/65/20), hệ 5 (10/60/30), hệ 6 (20/50/30).

- Đầu dò dây diot quang (diode array detector-DAD) phát hiện quercetin: Chúng tôi tiến hành quét phổ đồng thời ở 4 bước sóng 283nm, 330nm, 367nm [7] và 370nm [17-18] để khảo sát, xác định bước sóng phù hợp cho nhận diện quercetin trong mẫu nghiên cứu.

- Định quercetin trong dịch chiết methanol hoa hòe được xác định theo phương pháp chuẩn ngoại và khẳng định bằng phương pháp thêm chuẩn quercetin vào dịch chiết [5-17-20].

2.3.5. Xử lý số liệu

Các thông số trong sắc ký được xử lý với sự hỗ trợ của phần mềm xử lý số liệu kèm theo hệ thống HPLC. Kết quả được xử lý theo các công cụ thống kê của phần mềm Microsoft Excel 2010.

Kết quả được đánh giá [5-17-19-20] thông qua hình dạng sắc ký đồ, thời gian lưu (t_R , yêu cầu tương đương mẫu chuẩn), độ phân giải đỉnh (R_s , yêu cầu $R_s > 1,5$); tính đối xứng của đỉnh thông qua hệ số kéo đuôi (T , yêu cầu $0,8 \leq T \leq 2,0$ và giá trị T càng gần 1 sắc ký đồ của đỉnh quan tâm càng có dạng phân phối chuẩn Gauss, kết quả phân tích càng chính xác); hiệu lực tách cột (số đĩa lý thuyết N , yêu cầu $N > 2000$) và mức độ đáp ứng tín hiệu DAD tại bước sóng nghiên cứu (thông qua chiều cao hoặc diện tích của đỉnh quan tâm).

Độ ổn định của hệ thống được thực hiện trên mẫu thử với 5 lần lặp lại, yêu cầu độ lệch chuẩn tương đối RSD (%) của thời gian lưu nhỏ hơn 1%; RSD (%) của diện tích đỉnh, chiều cao đỉnh, hệ số kéo đuôi có RSD < 2% là đạt yêu cầu.

3. Kết quả nghiên cứu

3.1. Xác định điều kiện phân tách, nhận diện quercetin bằng hệ thống HPLC theo phương pháp chuẩn ngoại

Quercetin có tính axit yếu với $pK_{a1} = 5,87$ và $pK_{a2} = 8,48$ [9] với pha động có pH 3-4 sẽ thuận tiện cho quá trình phân tách khi rửa rã [7]. Hiện nay, khuynh hướng sử dụng pha động không chứa dung dịch đệm ngày càng gia tăng

để tránh gây mòn hệ thống sắc ký [20]. Trong nghiên cứu này chúng tôi thiết lập pha động chứa axit axetic không có đệm để phân tách quercetin.

3.1.1. Kết quả xác định bước sóng, khoảng thời gian lưu, đỉnh chiếm ưu thế, đỉnh quan tâm khi rửa giải theo pha động hệ 1

Mẫu chuẩn và thử được rửa giải đẳng dòng với pha động hệ 1, thể tích tiêm mẫu 10 μ l, áp suất trung bình 30 bar [13] để xác định bước sóng và định tính quercetin theo phương pháp chuẩn ngoại. Kết quả thu được trên hình 1 (1a và 1b).

Hình 1a thể hiện phổ đáp ứng tín hiệu DAD (dạng 3D) của mẫu chuẩn khi phân tích đồng thời ở 4 bước sóng như đã nêu ở trên. Kết quả thu được cho thấy sự đáp ứng tín hiệu của quercetin cao nhất tại bước sóng $\lambda=370$ nm. Kết quả này phù hợp với một số nghiên cứu đã công bố trên mẫu chứa quercetin nhưng với hệ pha động khác [5-17-18]. Bước sóng $\lambda=370$ nm được tiếp tục lựa chọn để nhận diện quercetin trong mẫu thử dịch chiết nụ hoa Hòe, kết quả thể hiện trên hình 1b. Sắc ký đồ trên hình 1b xuất hiện đỉnh chiếm ưu thế, là đỉnh của chất có sự đáp ứng tín hiệu DAD cao nhất. Theo phiếu kiểm soát CV 0116042.01 có thể khẳng định chất đó chính là rutin. Các đỉnh của chất phía sau được xác định trong tổng thời gian phân tích là 25 phút.

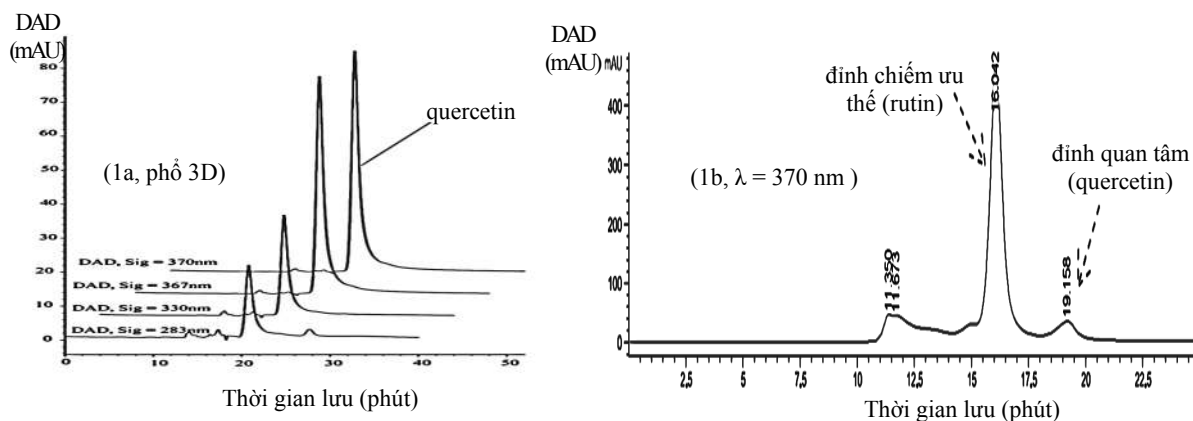
Nụ hoa Hòe trong nghiên cứu này có hàm lượng rutin được tiêu chuẩn hóa là 21,1%. Khi

đó với cột phân tách là pha đảo thì rutin (đỉnh chiếm ưu thế) do phân cực hơn quercetin sẽ có thời gian lưu ngắn hơn nên được rửa giải ra trước [16]. Trên hình 1b, có thể thấy đỉnh ngay sau đỉnh chiếm ưu thế có thời gian lưu khoảng 19 phút, tương đương với đỉnh của quercetin chuẩn ở hình 1a. Như vậy, kết hợp kết quả hình 1a và 1b, có thể bước đầu xác định đỉnh quan tâm nối tiếp ngay sau đỉnh rutin ở hình 1b là quercetin. Đồng thời, kết quả sắc ký ở hình 1 cho thấy thời gian lưu của đỉnh quercetin kéo dài, nên đỉnh bị doãng. Vì vậy, trong nghiên cứu này cần phải tiếp tục khảo sát hệ pha động nhằm giảm thời gian lưu của quercetin.

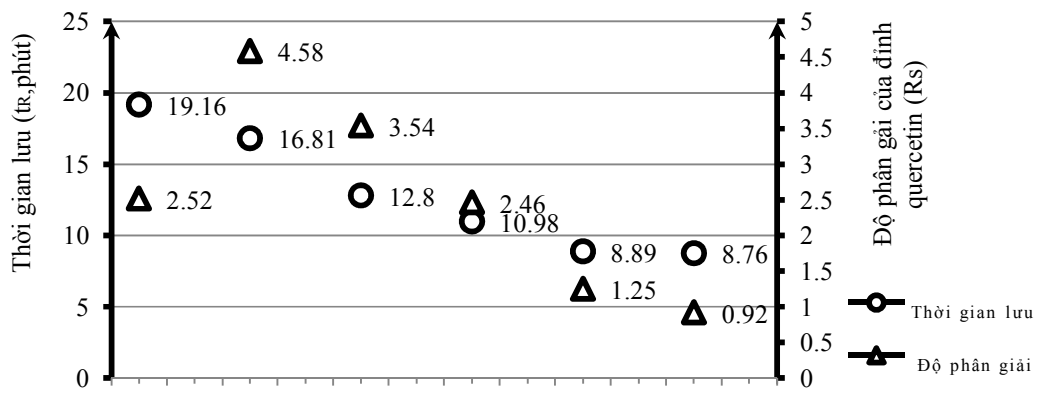
3.1.2. Kết quả xác định hệ pha động phù hợp

Kết quả khảo sát thời gian lưu và độ phân giải của đỉnh quan tâm (quercetin) khi rửa giải bằng 6 hệ pha động được thể hiện trên hình 2 và 3. Kết quả cho thấy hệ 1, hệ 2, hệ 3 và hệ 4 cho hiệu quả tách đỉnh quan tâm so với đỉnh chiếm ưu thế (rutin, phía trước) là tốt nhất, thể hiện độ phân giải R_s đều lớn hơn 1,5 (hình 2) và sắc ký đồ phân tách rõ ràng (hình 3a). Hệ 5 và hệ 6 có R_s thấp (nhỏ hơn 1,5) nên đỉnh quan tâm không tách được khỏi đỉnh chiếm ưu thế (hình 3b).

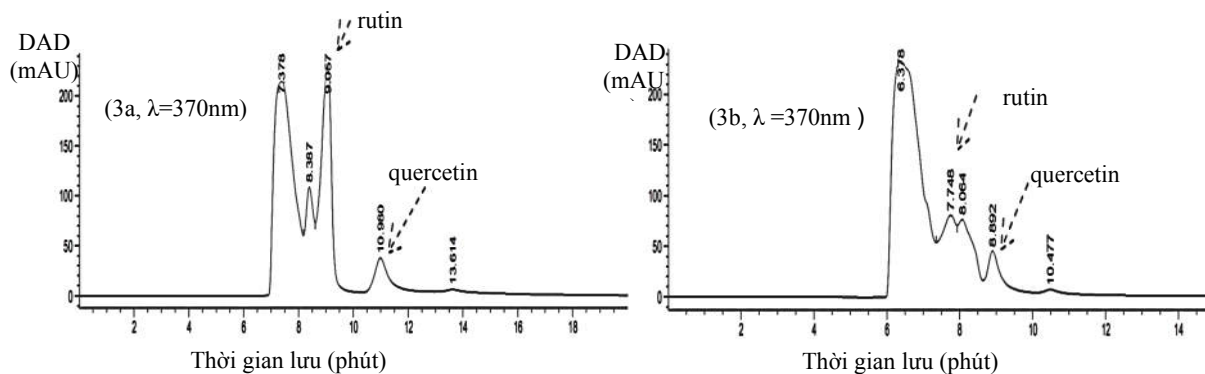
Kết quả thực nghiệm thu được ở hình 2 cũng cho thấy ở hệ 4, đỉnh quan tâm (quercetin) có thời gian lưu nhỏ nhất trong 4 hệ với $t_R= 10,98$ phút và có $R_s = 2,46$. Như vậy, pha động theo hệ 4 (có tỉ lệ A/C/D = 15/65/20) sẽ được lựa chọn cho các nghiên cứu tiếp theo.



Hình 1. Kết quả đáp ứng tín hiệu DAD khi rửa giải theo hệ 1.



Hình 2. Khảo sát thời gian lưu và độ phân giải của đỉnh quan tâm (quercetin) theo các hệ pha động khác nhau.



Hình 3. Sắc ký đồ mẫu thử (nụ hoa Hòe) theo hệ pha động được lựa chọn (3a-hệ 4) và hệ không tách được (3b-hệ 5).

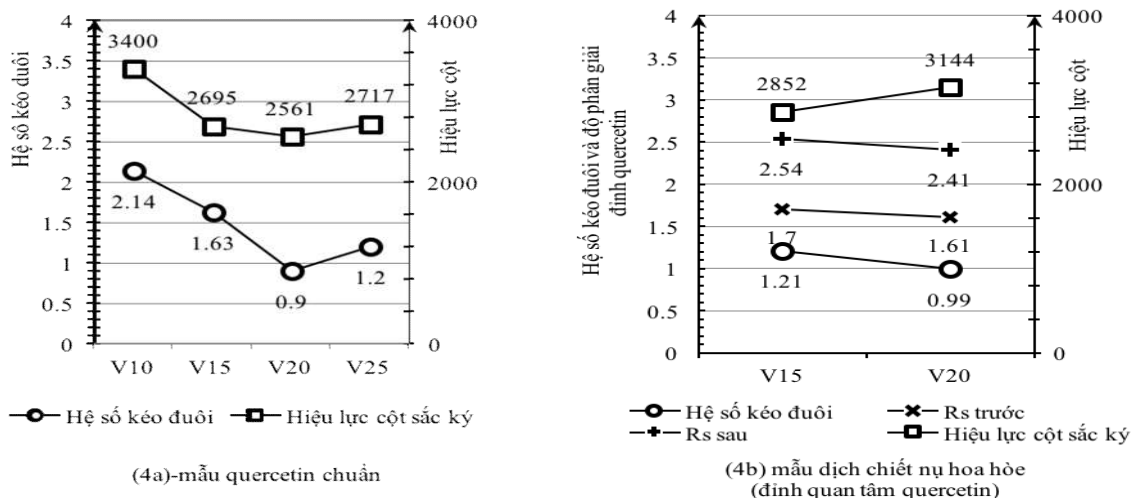
3.1.3. Xác định thể tích tiêm mẫu

Trên cơ sở hệ pha động đã xác định, chúng tôi tiếp tục khảo sát vòng tiêm mẫu của mẫu chuẩn sau đó đến mẫu thử, ở các thể tích 10 μ l (V10), 15 μ l (V15), 20 μ l (V20) và 25 μ l (V25) để đưa ra thể tích phù hợp. Trong kỹ thuật HPLC, bên cạnh thời gian lưu sự đáp ứng tín hiệu được sử dụng để phân tích các chất đó là diện tích đỉnh hoặc chiều cao đỉnh. Để xác định thể tích tiêm mẫu, chỉ tiêu đánh giá lựa chọn là hiệu lực cột (N), hệ số kéo đuôi của đỉnh (T) và sắc ký đồ. Trên mẫu thử, chúng tôi cũng tiến hành kiểm tra thêm độ phân giải (Rs) của đỉnh quan tâm về phía trước và phía sau. Kết quả thu được thể hiện trên hình 4 và 5.

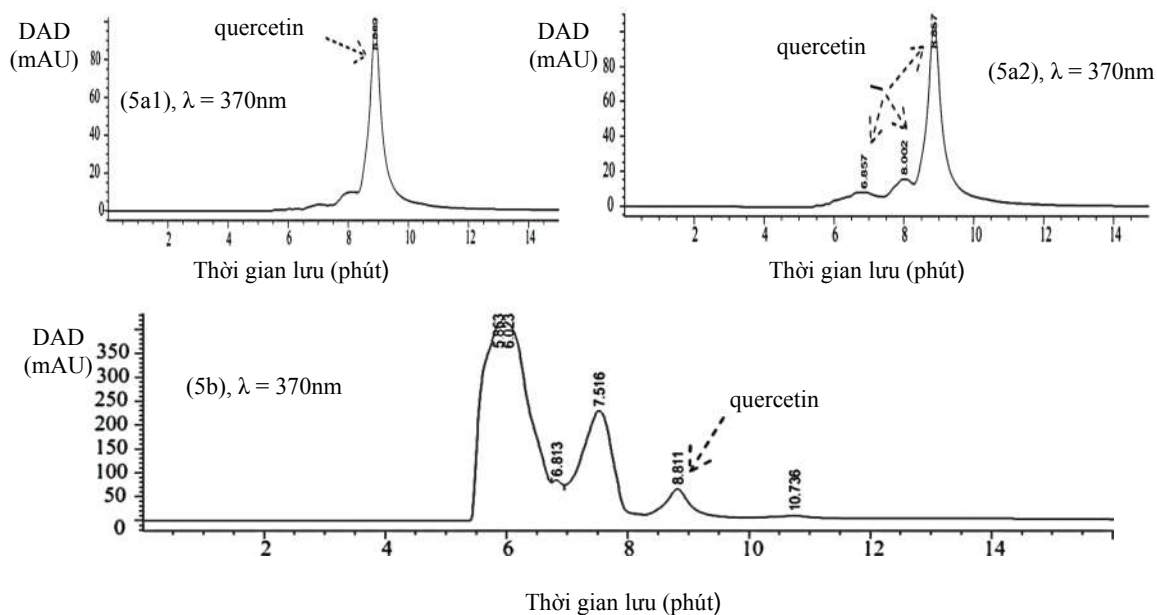
Kết quả khảo sát trên mẫu chuẩn thể hiện ở hình 4a cho thấy các thể tích tiêm mẫu đều có hiệu lực cột đạt yêu cầu ($N > 2000$). Ở thể tích

tiêm V10 đỉnh bị kéo đuôi mạnh, thể hiện ở giá trị hệ số kéo đuôi nằm ngoài khoảng giới hạn cho phép. Ở thể tích V25, V20 và V15 hệ số kéo đuôi đều đạt yêu cầu. Ở thể tích V25 các thông số sắc ký đều đạt yêu cầu, nhưng kết quả sắc ký đồ trên hình 5a2 xuất hiện đỉnh phụ, thể hiện sự phân tách chưa hiệu quả. Trong ba thể tích đó thì thể tích V20 cho kết quả tốt nhất, thể hiện ở kết quả sắc ký đồ thu được sắc nét, rõ ràng với hệ số kéo đuôi T của đỉnh đạt gần 1, hiệu lực cột đạt yêu cầu (hình 4a và 5a1).

Với kết quả thu được trên mẫu chuẩn, chúng tôi tiếp tục khảo sát trên mẫu thử ở thể tích V15 và V20. Kết quả thu được trên mẫu thử tiếp tục khẳng định ở thể tích tiêm $V = 20 \mu$ l hệ số kéo đuôi T là tốt nhất và các giá trị độ phân giải của đỉnh quan tâm, hiệu lực cột đều đạt yêu cầu (hình 4b và 5b).



Hình 4. Kết quả khảo sát thể tích tiêm mẫu chuẩn quercetin (4a) và mẫu thử dịch chiết nụ hoa hòe (4b).



Hình 5. Kết quả sắc ký đồ ở hệ 4, áp suất trung bình 35 bar, thời gian phân tích 16 phút, (5a1)- mẫu chuẩn thể tích tiêm V20, (5a2)-mẫu chuẩn thể tích tiêm V25, (5b)- mẫu thử hoa hòe thể tích tiêm V20.

Kết quả thu được ở hình 2 cũng cho thấy hệ 1 cho khả năng phân tách hiệu quả quercetin ra khỏi rutin, điều này là phù hợp với kết quả nghiên cứu đã công bố [16]. Tuy nhiên có sự khác biệt lớn trong thời gian lưu. Trong nghiên cứu này, với hệ tham khảo (hệ 1) đã cho thời gian lưu của quercetin trên 19 phút so với công bố là 5 phút [16].

Sự gia tăng về thời gian lưu nói trên có thể do sự khác nhau ở cột phân tách, do hàm lượng rutin quá lớn và có thể là do ảnh hưởng của áp suất đầu cột. Vì vậy để giảm thời gian lưu làm cơ sở cho nghiên cứu tiếp theo, trong nghiên cứu này chúng tôi tăng áp suất từ 30 lên 35 bar [13]. Kết quả thực nghiệm ở hình 5 cho thấy thời gian lưu của đỉnh quercetin đã giảm xuống dưới 10 phút.

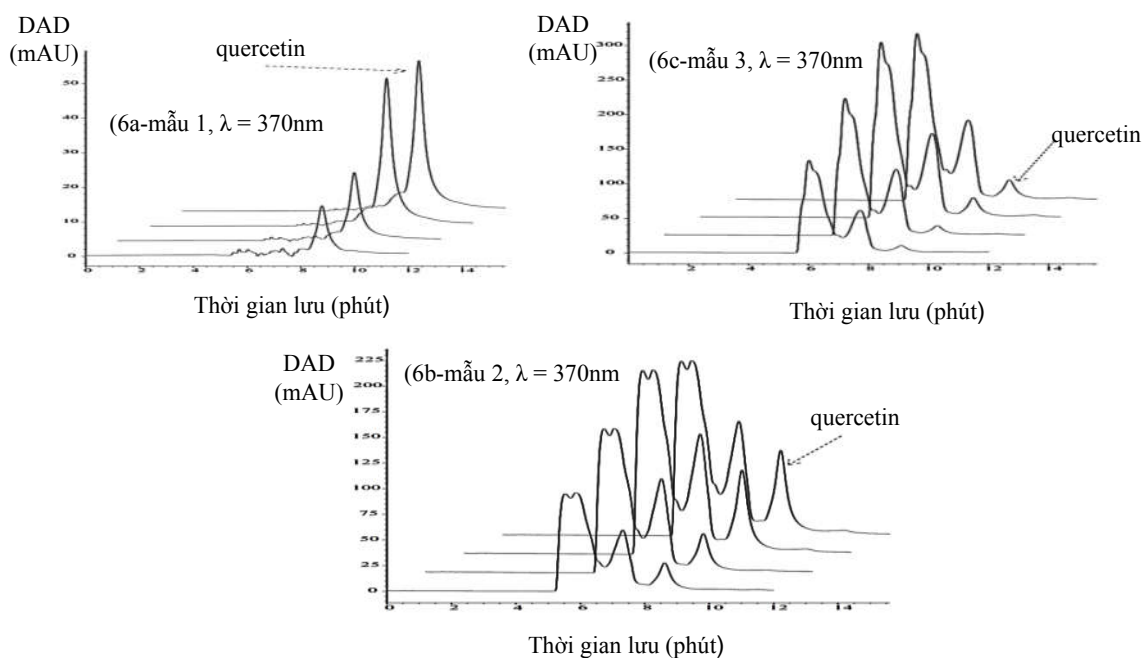
Thời gian phân tích phụ thuộc nhiều vào mục tiêu của việc tiến hành phân tích mẫu, bao gồm thời gian tách, phát hiện các chất và thời gian rửa cột. Với cột phân tách trong nghiên cứu này là ZORBAX SB-C18 có thể tích 2,5 ml với tốc độ dòng 0,5 ml/phút thì sẽ cần tối thiểu 5 phút để rửa cột sau phân tích.

Như vậy với kết quả thực nghiệm ở hình 5 cho thấy sẽ cần khoảng 11 phút cho phân tách, phát hiện các chất và 5 phút để rửa cột. Vì vậy trong nghiên cứu này lựa chọn thời gian phân tích 16 phút là phù hợp.

3.2. Khẳng định đỉnh quercetin trong dịch chiết hoa Hòe bằng phương pháp thêm chất chuẩn

Định tính quercetin đơn thuần theo phương pháp chuẩn ngoại bằng HPLC là chưa đảm bảo sự chắc chắn. Trong bài báo này, bên cạnh phương pháp ngoại chuẩn đã thực hiện ở trên, chúng tôi kết hợp với phương pháp thêm chất chuẩn để tiếp tục nhận diện và khẳng định đỉnh quercetin trong dịch chiết nụ hoa Hòe.

Nghiên cứu được thực hiện trên các mẫu 1, 2, 3 như đã nêu ở mục 2.3.3. Kết quả thu được thể hiện ở hình 6 (6a, 6b và 6c)



Hình 6. Hình ảnh 3D quét phổ ở 4 bước sóng trong thí nghiệm thêm chất chuẩn quercetin (mẫu 1, mẫu 2 và mẫu 3 được chuẩn bị theo mục 2.3.3 như đã mô tả ở phần phương pháp).

Kết quả sắc ký đồ trên hình 6b và 6c cho thấy mẫu hỗn hợp dịch chiết hoa Hòe thêm chuẩn quercetin (mẫu 2) và mẫu dịch chiết hoa Hòe pha thêm methanol (mẫu 3) có số đỉnh như nhau, ở mẫu 2 không có thêm đỉnh mới với các thời gian lưu đều nhỏ hơn 10 phút. Bên cạnh đó, sắc ký đồ trên hình 6a của mẫu chuẩn quercetin pha thêm methanol (mẫu 1) có duy nhất 1 đỉnh, cũng có thời gian lưu nhỏ hơn 10 phút.

Như vậy trong mẫu 2 (hình 6b), đỉnh của quercetin chuẩn thêm vào sẽ trùng với 1 trong các đỉnh trên hình 6c và có thời gian lưu trùng với đỉnh trên hình 6a. Để xác định đỉnh quercetin trên sắc ký đồ 6c của mẫu 3, chúng tôi tiến hành so sánh thời gian lưu kết hợp với sự đáp ứng tín hiệu DAD (giá trị đối chiếu với trục tung) của đỉnh quan tâm ở mẫu 1 và mẫu 3 so với mẫu 2.

Kết quả trên hình 6b, 6c cho thấy sự đáp ứng tín hiệu tại 4 bước sóng của đỉnh tách biệt rõ ràng, nối tiếp ngay sau đỉnh chiếm ưu thế trong mẫu 2 và mẫu 3 đều có thời gian lưu trùng với thời gian lưu của quercetin trong mẫu 1 (hình 6a), với thời gian lưu khoảng 8,8 phút. Tiếp theo, chúng tôi đổi chiều giá trị trên trục tung cho thấy sự đáp ứng tín hiệu DAD của đỉnh quan tâm đó ở cả 4 bước sóng trong mẫu 2 là cao nhất, tương đương với tổng sự đáp ứng tín hiệu DAD của đỉnh quan tâm đó ở mẫu 1 và mẫu 3.

Các kết quả thu được ở trên đã khẳng định mẫu 3 có chứa quercetin. Trên hình 6c, đỉnh quercetin là đỉnh tách biệt rõ ràng, nối tiếp ngay sau đỉnh chiếm ưu thế, có thời gian lưu khoảng 8,8 phút. Kết quả này là tương đồng với kết quả đã thu được khi sử dụng phương pháp chuẩn ngoại như đã nêu mục 3.1.

Kết quả quét phổ ở cả 4 bước sóng đã một lần nữa khẳng định, bước sóng $\lambda=370$ nm được lựa chọn là phù hợp cho nghiên cứu xác định quercetin trong dịch chiết nụ hoa Hòe.

3.3. Đánh giá độ ổn định của phương pháp HPLC đã thiết lập

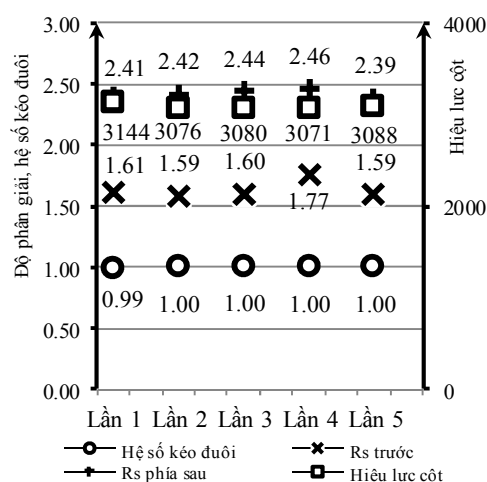
Với các kết quả khảo sát đã giúp chúng tôi thiết lập được điều kiện phân tích phù hợp như sau: cột phân tách pha đảo ZORBAX SB-C18,

Bảng 1. Độ ổn định của hệ thống sắc ký đối với đỉnh quercetin trong dịch chiết methanol nụ hoa Hòe

STT	Thời gian lưu (phút)	Diện tích (mAU.s)	Chiều cao (mAU)	Hệ số kéo đuôi
1	8,814	1467,723	55,813	0,993
2	8,796	1457,612	55,574	1,000
3	8,881	1484,981	55,871	1,003
4	8,868	1471,704	55,465	1,000
5	8,814	1475,010	56,230	1,000
Trung bình	8,835	1471,406	55,792	0,999
SD	0,037	10,015	0,299	0,004
RSD (%)	0,419	0,681	0,536	0,400

pha động gồm methanol:acetonitril: hỗn hợp C (15/20/65, % thể tích, pH = 3,63) với hỗn hợp C được pha sẵn bao gồm methanol: acetonitril: H₂O = 40:15:45 chứa 1% axit axetic (% thể tích), tốc độ dòng 0,5 ml/phút, thể tích tiêm mẫu 20 μ l, phân tích ở nhiệt độ 25°C, thời gian phân tích là 16 phút, bước sóng phân tích thích hợp là 370 nm, rửa giải đẳng dòng với áp suất phân tách trung bình 35 bar.

Điều kiện phân tích HPLC được chúng tôi tiếp tục đánh giá độ ổn định trên mẫu thử. Kết quả thể hiện ở hình 7 và bảng 1.



Hình 7. Thông số sắc ký sau 5 lần lặp.

Kết quả thu được cho thấy thời gian lưu của đỉnh quercetin là $t_r = 8,84 \pm 0,04$ (phút), độ lệch chuẩn tương đối RSD (%) của thời gian lưu, diện tích đỉnh, chiều cao đỉnh và hệ số kéo đuôi của đỉnh đều nhỏ hơn 1%. Như vậy các thông số sắc ký đều đạt yêu cầu của phương pháp phân tích HPLC.

Kết quả đó đã khẳng định điều kiện sắc ký HPLC do chúng tôi thiết lập được trong bài báo này đảm bảo tính chọn lọc để phân tách và phát hiện quercetin trong dịch chiết, đáp ứng tốt về tính chính xác, tính thích hợp hệ thống HPLC.

4. Kết luận và khuyến nghị

4.1. Kết luận

1. Nghiên cứu này đã xác định được điều kiện HPLC phù hợp trong điều kiện Việt Nam để phân tách và phát hiện quercetin trực tiếp từ dịch chiết methanol của nụ hoa Hòe. Kết quả đánh giá cho thấy hệ thống có độ ổn định cao với RSD của thông số nghiên cứu đều nhỏ hơn 1%.

2. Với điều kiện HPLC thiết lập được, kết hợp phương pháp chuẩn ngoại và thêm chất chuẩn, chúng tôi đã xác định được quercetin trong dịch chiết hoa Hòe có thời gian lưu $t_r = 8,84 \pm 0,04$ (phút) với độ chọn lọc và độ chính xác cao.

4.2. Khuyến nghị

1. Tiếp tục khảo sát về áp suất, tốc độ dòng, khoảng tuyến tính,... để xác định hàm lượng quercetin trong dịch chiết nụ hoa Hòe bằng phương pháp HPLC-DAD và đánh giá so sánh độ tin cậy với phương pháp LC-MS.

2. Áp dụng phương pháp HPLC thiết lập được để xây dựng mô hình DPPH-HPLC (offline) dùng cho nghiên cứu độ ổn định hóa lý và hoạt tính quét gốc tự do của quercetin.

Tài liệu tham khảo

- [1] Erlund, I, Review of the flavonoids quercetin, hesperetin, and naringenin. Dietary sources, bioactivities, bioavailability, and epidemiology. *Nutrition Research*, 24 (2004) 851.
- [2] Robaszekiewicz A, Balcerczyk A, Bartosz G Antioxidative and prooxidative effects of quercetin on A549 cells, *Cell Biol Int*, 31 (2007) 1245.
- [3] Jaouad Bouayed and Torsten Bohn, Exogenous antioxidants - Double edged swords in cellular redox state, *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 3 (2010) 228.
- [4] Vasantha R.H.P., et al., Ultrasonication-assisted solvent extraction of quercetin glycosides from Idared Apple Peels. *Molecules*, 16 (2011) 9783.
- [5] Thái Duy Thin, Vũ Đức Lợi, Đặng Thị Ngọc Thu, Nghiên cứu định lượng quercetin nguyên liệu bằng phương pháp HPLC, *Tạp chí Dược học*, 411 (2010) 43.
- [6] Bộ môn Thực vật dược, *Thực vật học*, NXB Y học (2007), 281.
- [7] Qiao, L., et al., Sonochemical Effects on 14 flavonoids common in citrus: Relation to stability. *PLoS ONE*, 9 (2014) e87766.
- [8] Buchner N., et al., Effect of thermal processing on the flavonols rutin and quercetin, *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 20 (2006) 3229.
- [9] Sarka Ramesova., et al., On the stability on the bioactive flavonoids quercetin and luteolin under oxygen-free conditions, *Anal Bioanal Chem*, 402 (2012), 975.
- [10] Ali Khoddam., et al., Review: Techniques for Analysis of Plant Phenolic Compound, *Molecules*, 18 (2013) 2328.
- [11] Kwang Jin Lee., et al., Antioxidant and Anti-Inflammatory Activity Determination of One Hundred Kinds of Pure Chemical Compounds Using Offline and Online Screening HPLC Assay, *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2015 (2015) 165457
- [12] Shuyun Shi., et al., Systematic Separation and Purification of 18 Antioxidants from Pueraria lobata Flower Using HSCCC Target-guided by DPPH-HPLC Experiment, *Separation and Purification Technology*, 89 (2012) 225.
- [13] Je-Seung Jeon., et al., Preparative Isolation of Polar Antioxidant Constituents from Abies koreana Using Centrifugal Partition Chromatography Guided by DPPH-HPLC Experiment, *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 38 (2015) 1681.
- [14] Zhisheng Xie., et al., Extraction and isolation of flavonoid glycosides from Flos Sophorae Immaturus using ultrasonic-assisted extraction followed by high-speed countercurrent chromatography, *J. Sep. Sci.*, 37 (2014) 957
- [15] Zhou X., et al., Isolation and purification of flavonoid glycosides from Trollius ledebouri using high-speed counter-current chromatography by stepwise increasing the flow-rate of the mobile phase, *Journal of Chromatogr.A*, 1092 (2005) 216.
- [16] Yuangang Z, Chunying L, Yuji F and Chunjian Z, Simultaneous determination of catechin, rutin, quercetin, kaempferol and isorhamnetin in the extract of sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) leaves by RP-HPLC-DAD, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 41 (2006) 714.
- [17] V.G.D.Souza., et al., Analytical method by HPLC-DAD allows quantification of quercetin marker in standardized extract of *Anadenanthera colubrina* var. *cebil*,

- International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, 9 (2017) 47.
- [18] Lee Fung Ang et al., HPLC Method for Simultaneous Quantitative Detection of Quercetin and Curcuminoids in Traditional Chinese Medicines, Journal of Pharmacopuncture, 17 (2014) 036.
- [19] Hồ Viết Quý, Phân tích Lí-Hóa, NXB Giáo dục Việt Nam, (2010), 479.
- [20] Đoàn Thị Ngọc Yến, Nguyễn Đức Tuấn, Định lượng đồng thời paracetamol, lorantadin và dextromethophan HBr trong chế phẩm đa thành phần bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao với đầu dò dây diod quang, Tạp chí Dược học, 441 (2013) 25.

Determination of Quercetin Aglycone in Flos *Sophorae japonicae* Extract by High Performance Liquid Chromatography

Le Huy Hoang^{1,2}, Do Thi Hai Anh¹, Do Thi Hue¹,
Tran Thi Kieu Oanh³, Nguyen Quang Huy¹

¹Faculty of Biology, VNU University of Science, 334 Nguyen Trai, Thanh Xuan, Hanoi, Vietnam

²Institute of New Technology, Academy of Military Science and Technology,
17 Hoang Sam, Cau Giay, Hanoi, Vietnam

³354 Military Hospital, Doc Ngu, Ba Dinh, Hanoi, Vietnam

Abstract: The research has established a method to directly extract and determine free quercetin (aglycone form) from Flos *Sophorae japonicae* methanol extract by using a simple HPLC method. Conducting experiment with system HPLC Agilent 1260 Infinity, reverse column ZORBAX SB-C18 (temperature 25°C), flow rate 0.5 ml/min, average pressure 30 and 35 bar, and diode array detector (DAD), we found that these parameters is suitable: $\lambda_{\max} = 370$ nm, injection volume is 20 μ l, analysis time 16 minutes, mobile phase (% volume) consists of methanol (15%), acetonitril (20%) and solvent C (65%, contains 1% acetic acid, methanol, acetonitril and H₂O, 40%, 15% and 45% respectively. After using a combination of isocratic elution and standard addition, retention time of free quercetin in Flos *Sophorae japonicae* methanol extract has found to be $8.84 \pm 0,04$ (min). Relative standard deviation (RSD) of retention time, peak area, peak height and tailing have been less than 1%, this results have indicated that the proposed method has fulfilled the validation parameters such as selectivity and precision. This study provided useful information for screening activity of quercetin by using different methods.

Keywords: Quercetin, HPLC, Flos *Sophorae japonicae*, methanol extract, *Sophora japonica* L.