

DEVELOPMENT AND VALIDATION OF QUALITATIVE AND QUANTITATIVE METHOD FOR RUTIN IN FLOS CAMELLIAE CHRYSANTHAE BY HIGH-PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY

NGUYEN THI HUE¹, ✉, NGUYEN THI LAN PHUONG¹,
LE THI TUYET¹, HOANG THI THOM¹

¹National Institute of Drug Quality Control

✉Corresponding author: huenguyen170696@gmail.com

Received April 27th, 2025

Accepted September 18th, 2025

Abstract: Rutin is a major active compound in Flos Camelliae chrysanthae, and could be used as the marker for identification and assay the herbal. This study developed and validated a process for qualitative and quantitative analysis of rutin using high-performance liquid chromatography (HPLC). The chromatographic conditions include: Hitachi HPLC system with DAD detector, Inertsil C18 ODS-3 reversed-phase column (5 μ m; 25 cm $\times$ 4.6 mm), flow rate of 1.0 mL/min, and sample injection volume of 10 μ L. Gradient elution was performed with a mobile phase consisting of acetonitrile and 0.1% phosphoric acid solution. The quantification method has been validated to meet the requirements for system suitability, specificity, linearity, repeatability, intermediate precision, accuracy, limits of detection (LOD) and quantification (LOQ), in accordance with ICH guidelines.

Keyword: Flos Camelliae chrysanthae, rutin, HPLC, ICH.

XÂY DỰNG VÀ THẨM ĐỊNH QUY TRÌNH ĐỊNH TÍNH, ĐỊNH LƯỢNG RUTIN TRONG DƯỢC LIỆU TRÀ HOA VÀNG BẰNG PHƯƠNG PHÁP SẮC KÝ LỎNG HIỆU NĂNG CAO

NGUYỄN THỊ HUỆ¹, ✉, NGUYỄN THỊ LAN PHƯƠNG¹,
LÊ THỊ TUYẾT¹, HOÀNG THỊ THOM¹

¹Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương

✉Tác giả liên hệ: huenguyen170696@gmail.com

Nhận bài ngày 27 tháng 4 năm 2025

Chấp nhận đăng ngày 18 tháng 9 năm 2025

Tóm tắt: Rutin là một hoạt chất chính trong dược liệu Trà hoa vàng, được dùng làm chất đánh dấu trong thử nghiệm định tính và định lượng dược liệu. Nghiên cứu này đã xây dựng và thẩm định quy trình định tính, định lượng rutin bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) với các điều kiện sắc ký bao gồm: Hệ thống HPLC Hitachi với detector DAD, cột sắc ký pha đảo Inertsil C18 ODS-3 (5 μ m; 25 cm $\times$ 4,6 mm), tốc độ dòng 1,0 mL/phút, thể tích tiêm mẫu 10 μ L. Quá trình rửa giải được thực hiện theo chương trình gradient với hệ pha động bao gồm acetonitril và dung dịch acid phosphoric 0,1%. Quy trình định lượng đã được thẩm định và đạt yêu cầu về các chỉ tiêu độ thích hợp hệ thống, độ đặc hiệu, độ tuyến tính, độ lặp lại, độ chính xác trung gian, độ đúng và giới hạn phát hiện (LOD), giới hạn định lượng (LOQ) theo hướng dẫn của ICH.

Từ khoá: Trà hoa vàng, rutin, HPLC, ICH.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Chi Chè (Camellia) thuộc họ Chè (Theaceae) từ lâu đã rất thân thuộc với người dân Việt Nam cũng như của nhiều nước trên thế giới do có nhiều tác dụng chữa bệnh và được dùng phổ biến để làm đồ uống, thực phẩm chức năng. Đã có rất nhiều nghiên cứu cả ở trong nước và trên thế giới về chi Camellia, kết quả cho thấy phần lớn các loài trong chi này chứa các thành phần chủ yếu là flavonoid, triterpenoid và một số hợp chất polyphenolic khác.

Trong chi Camellia, Trà hoa vàng được coi là loại quý hiếm, phân bố chủ yếu ở miền Nam Trung Quốc và miền Bắc Việt Nam. Với nhiều tác dụng sinh học quan trọng như hạ huyết áp, hạ đường huyết, giảm cholesterol máu, chống ung thư, tăng cường hệ miễn dịch và kéo dài tuổi thọ ... đồng thời cũng là loài cây mang nhiều giá trị kinh tế cao nên cây Trà hoa vàng đã và đang được khai thác cạn kiệt và có nguy cơ bị tuyệt chủng trong tự nhiên nên hiện tại nhiều đơn vị trong nước đã tiến hành nghiên cứu và nhân giống loại cây này.

Tuy nhiên, hiện tại Dược điển Việt Nam chưa có chuyên luận riêng cho dược liệu Trà hoa vàng [5] nên vấn đề quản lý và đảm bảo chất lượng của dược liệu này vẫn chưa được thực hiện chặt chẽ.

Rutin là một hoạt chất chính thuộc nhóm flavonoid trong dược liệu Trà hoa vàng có tác dụng chống oxy hóa và chống viêm tốt. Dựa vào trang thiết bị hiện có và tham khảo một số phương pháp nghiên cứu rutin trong dược liệu đã được công bố [5, 7], chúng tôi tiến hành xây dựng và thẩm định quy trình định tính, định lượng rutin trong dược liệu Trà hoa vàng bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao nhằm tăng cường công tác kiểm tra và quản lý chất lượng dược liệu Trà hoa vàng. Việc thẩm định quy trình định lượng được thực hiện theo hướng dẫn của ICH Q2 (R1) – 2005 [6] nhằm chứng minh phương pháp đã xây dựng đảm bảo độ chính xác và tin cậy.

2. THỰC NGHIỆM

2.1. Thiết bị, dụng cụ, hoá chất, chất chuẩn

2.1.1. Thiết bị, dụng cụ

- Máy sắc ký lỏng Hitachi với detector DAD
- Cân phân tích Mettler Toledo AB – 204S ($d = 0,1$ mg)
- Cân phân tích Mettler Toledo GmbH MS105 ($d = 0,01$ mg)

- Cột phân tích sắc ký: Inertsil C18 ODS-3 ($5\ \mu\text{m}$; $25\ \text{cm} \times 4,6\ \text{mm}$)

- Các dụng cụ thủy tinh cần thiết cho quá trình thực nghiệm.

2.1.2. Hoá chất, dung môi, chất chuẩn

- *Chất chuẩn*: Rutin ($\text{C}_{27}\text{H}_{30}\text{O}_{16}$); SKS: QT152050417; Hàm lượng: 88,2% $\text{C}_{27}\text{H}_{30}\text{O}_{16}$ tính trên chế phẩm nguyên trạng; Xuất xứ: Viện Kiểm nghiệm thuốc TPHCM.

- *Dung môi, hoá chất*: Methanol (HPLC; Merck); Acetonitril (HPLC; Merck); Acid phosphoric (PA; Scharlau); Nước RO (VKNTTW).

2.2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Đối tượng nghiên cứu

Mẫu thử: Trà Hoa Vàng (đã nghiền thành bột và qua rây có cỡ mắt rây $0,355\ \text{mm}$; Độ ẩm: 5,3%); Ngày SX: 10/12/2022; Nơi SX: Công ty cổ phần kinh doanh lâm sản Đập Thanh.

2.2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.2.1. Điều kiện phân tích

Tham khảo các tài liệu [2, 5, 7] và qua khảo sát các hệ pha động, chương trình chạy khác nhau, nghiên cứu chọn điều kiện sắc ký phù hợp như sau:

- *Điều kiện sắc ký*: Cột Inertsil C18 ODS-3 ($250 \times 4,6\ \text{mm}$; $5\ \mu\text{m}$); Detector UV ở bước sóng $257\ \text{nm}$; Tốc độ dòng: $1,0\ \text{mL/phút}$; Thể tích tiêm: $10\ \mu\text{L}$; Pha động: Acetonitril (A) – Dung dịch acid phosphoric $0,1\%$ (B).

Chương trình dung môi:

Thời gian (phút)	%A (tt/tt)	%B (tt/tt)
0 → 22	18	82
22 → 22,1	18 → 40	82 → 60
22,1 → 30	40	60
30 → 30,1	40 → 18	60 → 82
30,1 → 35	18	82

2.2.2.2. Chuẩn bị dung dịch thử và dung dịch chuẩn

- *Dung dịch thử*: Cân chính xác khoảng $0,5\ \text{g}$ bột dược liệu (qua rây có cỡ mắt rây $0,355\ \text{mm}$) vào bình định mức $25\ \text{mL}$, thêm $20\ \text{mL}$ methanol, lắc siêu âm $30\ \text{phút}$, để nguội, bổ sung methanol vừa đủ đến vạch, lắc đều. Lọc qua màng lọc $0,45\ \mu\text{m}$.

- **Dung dịch chuẩn:** Hòa tan rutin chuẩn trong methanol để được dung dịch chuẩn có nồng độ chính xác khoảng 0,03 mg/mL.

2.2.3. Tiến hành

Tiêm riêng biệt 10 μ L mỗi dung dịch chuẩn và dung dịch thử. Tiến hành sắc ký theo điều kiện đã nêu, ghi lại thời gian lưu, diện tích của pic rutin trên sắc ký đồ của dung dịch thử và dung dịch chuẩn.

Kiểm tra khả năng thích hợp của hệ thống sắc ký: Tiến hành sắc ký với dung dịch chuẩn, phép thử chỉ có giá trị khi: Độ lệch chuẩn tương đối của thời gian lưu và diện tích pic rutin trong 6 lần tiêm lặp lại không lớn hơn 2,0%.

2.2.4. Kết quả

Hàm lượng (%) rutin ($C_{27}H_{30}O_{16}$), tính theo được liệu khô kiệt được tính theo công thức sau:

$$X(\%) = \frac{S_T}{S_C} \times C_C \times 25 \times \frac{1}{1000} \times \frac{100}{m_T} \times \frac{100}{(100 - b)}$$

Trong đó:

S_T, S_C : Diện tích pic rutin trên sắc ký đồ của dung dịch thử và dung dịch chuẩn tương ứng.

C_C : Nồng độ của rutin trong dung dịch chuẩn (mg/mL).

m_T : Khối lượng cân mẫu thử (g).

b : Độ ẩm của mẫu thử (%).

2.3. Thẩm định phương pháp

Thẩm định phương pháp phân tích được thực hiện theo ICH [6], bao gồm các chỉ tiêu:

2.3.1. Thẩm định độ đặc hiệu

* **Yêu cầu:**

- Sắc ký đồ dung dịch mẫu thử phải cho pic có thời gian lưu tương ứng với thời gian lưu của pic rutin thu được trên sắc ký đồ mẫu chuẩn.

- Sắc ký đồ mẫu dung môi không có pic tại thời gian lưu tương ứng với thời gian lưu của pic rutin. Nếu có, đáp ứng pic phải $\leq 1,0\%$ so với đáp ứng pic của mẫu chuẩn.

- Kết quả chồng phổ UV của pic rutin trên sắc ký đồ mẫu chuẩn và mẫu thử cho hệ số chồng phổ (similarity) phải $\geq 0,9$.

- Độ tinh khiết của pic rutin trên sắc ký đồ mẫu thử phải $\geq 0,9$.

2.3.2. Độ thích hợp của hệ thống

* **Yêu cầu:** Giá trị RSD của thời gian lưu $\leq 1,0\%$ và diện tích pic phải $\leq 2,0\%$.

2.3.3. Độ tuyến tính

* **Yêu cầu:** Hệ số tương quan tuyến tính (r) phải $\geq 0,998$; % Hệ số chặn tại nồng độ $100\% < 2\%$.

Công thức tính:

$$\% Y = \frac{\text{Hệ số chặn}}{\text{Diện tích pic chuẩn } 100\%} \times 100$$

2.3.4. Độ đúng

* **Yêu cầu:** Tỷ lệ thu hồi từ 95% đến 105% ở mỗi mức nồng độ; RSD tỷ lệ thu hồi $\leq 2,0\%$ ở mỗi mức nồng độ.

2.3.5. Khoảng xác định

Được suy ra từ kết quả độ đúng (từ giá trị nhỏ nhất đến giá trị lớn nhất của độ đúng).

2.3.6. Độ chính xác

2.3.6.1. Độ lặp lại

* **Yêu cầu:** Giá trị RSD (%) kết quả định lượng hàm lượng rutin có trong các mẫu $\leq 2,0\%$.

2.3.6.2. Độ chính xác trung gian

* **Yêu cầu:** Giá trị RSD (%) kết quả định lượng của mỗi kiểm nghiệm viên ($n = 6$) $\leq 2,0\%$ và của cả hai kiểm nghiệm viên ($n = 12$) phải $\leq 3,0\%$.

2.3.7. Giới hạn phát hiện (LOD), giới hạn định lượng (LOQ)

* **Thực nghiệm:**

- Từ dung dịch chuẩn rutin có nồng độ 50% so với nồng độ định lượng được chuẩn bị trong phần thẩm định Độ tuyến tính, tiến hành pha loãng lần lượt 2,5; 5; 10 và 20 lần bằng dung môi pha mẫu. Xây dựng đường chuẩn biểu diễn sự phụ thuộc giữa diện tích pic rutin và nồng độ rutin có trong mẫu, xác định độ dốc của đường chuẩn và độ lệch chuẩn của đáp ứng.

- Xác định giới hạn phát hiện, giới hạn định lượng của chất cần phân tích theo công thức sau:

$$3,3 \times \sigma$$

$$\text{Giới hạn phát hiện: LOD} = \frac{S}{S}$$

$$S$$

$$10 \times \sigma$$

$$\text{Giới hạn định lượng: LOQ} = \frac{S}{S}$$

$$S$$

Trong đó:

σ : độ lệch chuẩn của đáp ứng (sử dụng độ lệch chuẩn của số dư)

S: là độ dốc của đường chuẩn

- Tiến hành sắc ký các dung dịch mẫu thử ở nồng độ LOQ, xác định độ lặp lại của diện tích pic để chứng minh tính phù hợp của các giá trị LOD, LOQ tính được.

- Từ LOD, LOQ xác định được giới hạn phát hiện và giới hạn định lượng có trong mẫu theo công thức sau:

$$\text{Giới hạn phát hiện/mẫu} = \text{LOD} \times 25/0,5$$

$$\text{Giới hạn định lượng/mẫu} = \text{LOQ} \times 25/0,5$$

Trong đó:

LOD: nồng độ phát hiện được xác định ở trên ($\mu\text{g/mL}$)

LOQ: nồng độ định lượng được xác định ở trên ($\mu\text{g/mL}$)

25: thể tích pha loãng mẫu thử (mL)

0,5: khối lượng cân mẫu thử (g)

* *Yêu cầu*: RSD diện tích pic của các lần tiêm dung dịch mẫu thử ở nồng độ LOQ $\leq 10,0\%$.

3. KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN

3.1. Độ đặc hiệu

* *Thực nghiệm*:

- Dung môi pha mẫu: Methanol.

- Chuẩn bị mẫu thử: Cân 0,5001 g mẫu thử vào bình định mức 25 mL, thêm 20 mL methanol, lắc siêu âm 30 phút, để nguội, bổ sung methanol vừa đủ đến vạch, lắc đều. Lọc qua màng lọc 0,45 μm .

- Chuẩn bị mẫu chuẩn gốc: Cân 15,38 mg rutin chuẩn vào bình định mức 25 mL, hòa tan và vừa đủ bằng methanol.

→ Chuẩn bị mẫu chuẩn: Hút chính xác 3,0 mL dung dịch chuẩn gốc vào bình định mức 50 mL, thêm methanol vừa đủ đến vạch, lắc đều.

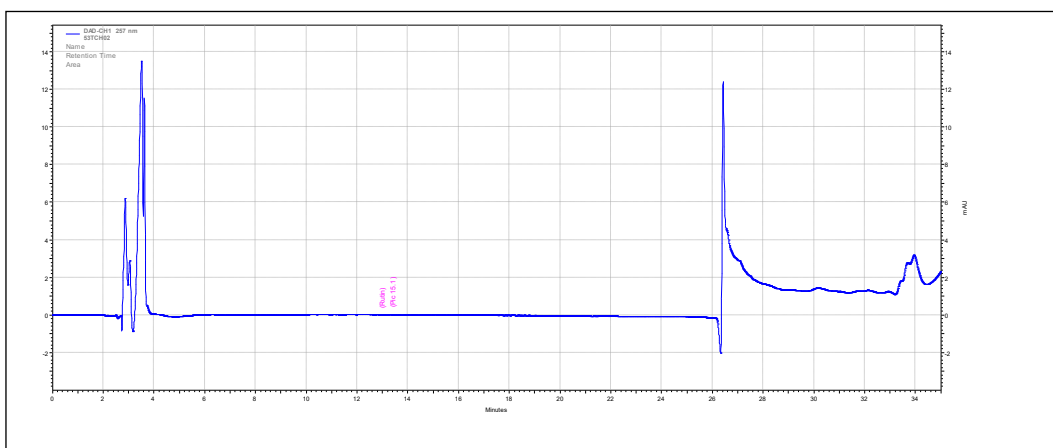
* *Kết quả*:

- Thời gian lưu của pic trên sắc ký đồ của các dung dịch mẫu chuẩn và mẫu thử:

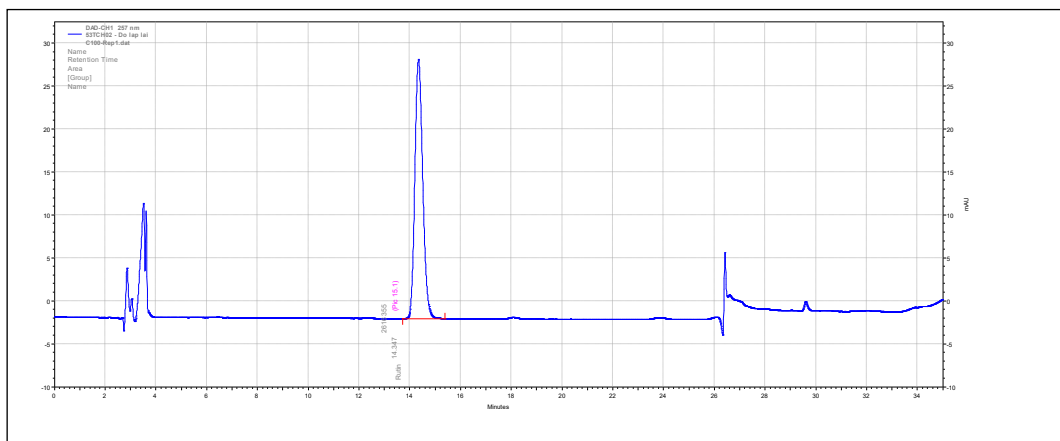
Pic	Mẫu dung môi	Mẫu chuẩn	Mẫu thử
Rutin	-	14,347 (phút)	14,287 (phút)

- Phổ UV của pic rutin trên sắc ký đồ của mẫu thử và mẫu chuẩn giống nhau. Kết quả chồng phổ cho hệ số tương đồng của rutin là 0,9902.

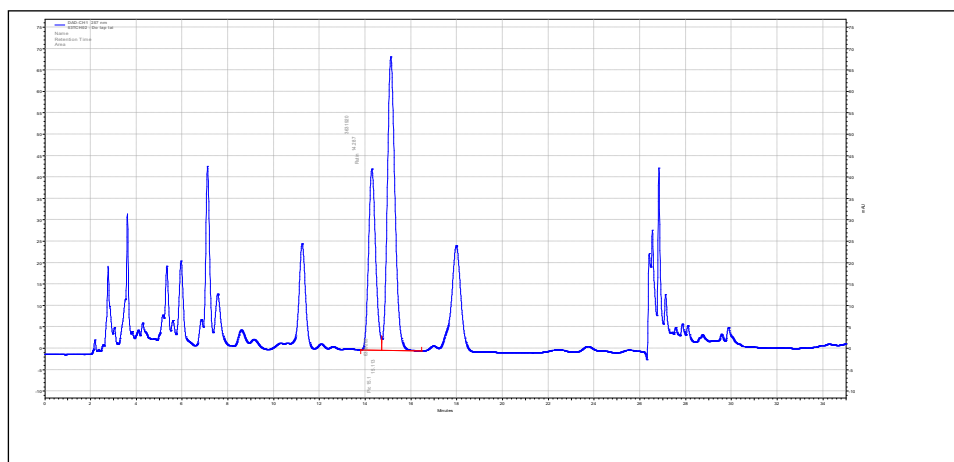
- Độ tinh khiết của pic rutin trên sắc ký đồ mẫu thử là 0,9722.



Hình 1. Sắc ký đồ của dung môi pha mẫu



Hình 2. Sắc ký đồ của dung dịch chuẩn rutin



Hình 3. Sắc ký đồ của dung dịch thử

* Kết luận: Phép thử đạt yêu cầu về độ đặc hiệu.

3.2. ĐỘ THÍCH HỢP CỦA HỆ THỐNG

* Thực nghiệm: Tiêm vào hệ thống sắc ký 6 lần dung dịch chuẩn được chuẩn bị trong phần thẩm định độ đặc hiệu.

* Kết quả:

Bảng 3.1. Kết quả khảo sát độ thích hợp của hệ thống

STT	Thời gian lưu (phút)	Diện tích (mAu.s)	Số đĩa lý thuyết
1	14,347	2616355	9966
2	14,360	2614820	9981
3	14,353	2596342	10032
4	14,347	2612007	10088
5	14,333	2592859	10090
6	14,313	2605847	10097
TB	14,338	2606372	10042
% RSD	0,13	0,38	

* Kết luận: Độ thích hợp của hệ thống đạt yêu cầu.

3.3. Độ tuyến tính

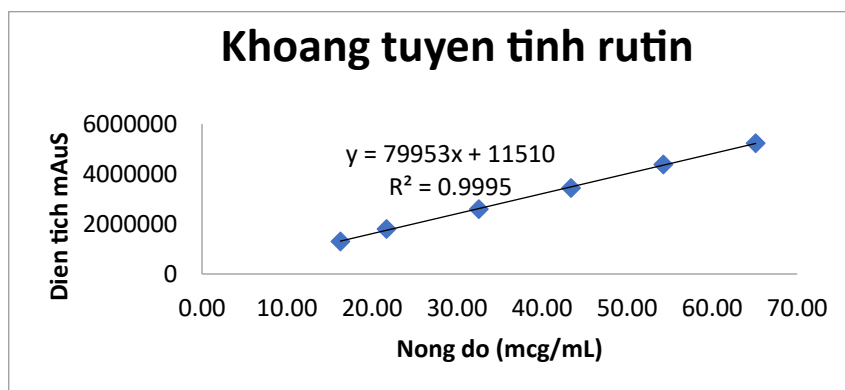
* **Thực nghiệm:** Từ dung dịch chuẩn gốc được chuẩn bị trong phần thẩm định độ đặc hiệu, tiến hành pha một dãy các dung dịch chuẩn trong methanol để được các dung dịch có nồng độ rutin lần lượt bằng 50, 70, 100, 120, 170 và 200% so với nồng độ định

lượng.

* **Kết quả:** Khảo sát sự tương quan giữa y (diện tích pic) và x (nồng độ) bằng phương pháp bình phương tối thiểu. Kết quả được thể hiện ở Bảng 3.2 và Hình 3.1.

Bảng 3.2. Kết quả khảo sát khoảng tuyến tính

% so với nồng độ định lượng	Lượng cân chuẩn (mg)	Bình định mức (mL)	Độ pha loãng	Nồng độ rutin ($\mu\text{g/mL}$)	Diện tích pic (mAu.s)
50	15,38	25	100/3	16,28	1300841
70	15,38	25	25/1	21,70	1794645
100	15,38	25	50/3	32,56	2593000
120	15,38	25	25/2	43,41	3432312
170	15,38	25	25/2,5	54,26	4377542
200	15,38	25	25/3	65,11	5225486
Hệ số góc (slope):				79953,303	
Hệ số chắn (intercept):				11510,241	
Hệ số tương quan (correl):				0,9995	
% hệ số chắn:				0,44	



Hình 3.1. Đồ thị biểu diễn mối tương quan giữa diện tích pic rutin và nồng độ

Ghi chú: Diện tích pic ở mức nồng độ 100% là trung bình của 6 lần tiêm lặp lại

STT	1	2	3	4	5	6	TB
Diện tích (mAu.s)	2617175	2601403	2586138	2590983	2577395	2584908	2593000

* **Kết luận:** Phép thử đạt yêu cầu về độ tuyến tính.

3.4. Độ đúng

* **Thực nghiệm:**

- **Chuẩn bị mẫu chuẩn:** Dùng dung dịch chuẩn trong phần thẩm định độ đặc hiệu.

- **Chuẩn bị các mẫu chuẩn thêm vào mẫu thử:**

+ Dung dịch chuẩn C80: Cân chính xác khoảng 15 mg rutin chuẩn vào bình định mức 25 mL, hòa tan và vừa đủ

bằng methanol. Hút chính xác 5,0 mL dung dịch này vào bình định mức 20 mL, vừa đủ bằng methanol, trộn đều.

+ Dung dịch chuẩn C100: Cân chính xác khoảng 10 mg rutin chuẩn vào bình định mức 50 mL, hòa tan và vừa đủ bằng methanol.

+ Dung dịch chuẩn C140: Cân chính xác khoảng 15

mg rutin chuẩn vào bình định mức 50 mL, hòa tan và vừa đủ bằng methanol.

- Chuẩn bị các mẫu thử thêm chuẩn:

+ *Mẫu thử có nồng độ khoảng 80% (Chuẩn bị 3 mẫu):* Cân chính xác khoảng 0,14 g bột dược liệu (qua rây có cỡ mắt rây 0,355 mm) vào bình định mức 25 mL, thêm chính xác 2,0 mL dung dịch chuẩn C80 và 18 mL methanol, lắc siêu âm trong 30 phút, để nguội, vừa đủ đến vạch bằng methanol, lắc đều. Lọc qua màng lọc 0,45µm.

+ *Mẫu thử có nồng độ khoảng 100% (Chuẩn bị 3 mẫu):* Cân chính xác khoảng 0,14 g bột dược liệu (qua rây có cỡ mắt rây 0,355 mm) vào bình định mức 25 mL,

thêm chính xác 2,0 mL dung dịch chuẩn C100 và 18 mL methanol, lắc siêu âm trong 30 phút, để nguội, vừa đủ đến vạch bằng methanol, lắc đều. Lọc qua màng lọc 0,45µm.

+ *Mẫu thử có nồng độ khoảng 140% (Chuẩn bị 3 mẫu):* Cân chính xác khoảng 0,14 g bột dược liệu (qua rây có cỡ mắt rây 0,355 mm) vào bình định mức 25 mL, thêm chính xác 2,5 mL dung dịch chuẩn C140 và 18 mL methanol, lắc siêu âm trong 30 phút, để nguội, vừa đủ đến vạch bằng methanol, lắc đều. Lọc qua màng lọc 0,45µm.

* Kết quả:

Bảng 3.4. Kết quả độ đúng

STT	% so với nồng độ định lượng	Lượng cân mẫu thử (g)	Lượng cân chuẩn rutin (mg)	Lượng rutin có sẵn/mẫu (µg/mL)	Lượng rutin thêm vào (µg/mL)	Diện tích pic (mAu*s)	Lượng rutin tìm lại (µg/mL)	% Thu hồi		
								% rutin tìm lại	% TB	% RSD
1.	80	0,1464	15,38	13,536	10,852	1921862	24,002	98,41	97,61	1,94
2.		0,1473	15,38	13,620	10,852	1939071	24,217	98,96		
3.		0,1412	15,38	13,056	10,852	1827135	22,819	95,45		
4.	100	0,1414	10,07	13,074	14,211	2091016	26,114	95,71	96,28	1,11
5.		0,1408	10,07	13,019	14,211	2084840	26,037	95,62		
6.		0,1405	10,07	12,991	14,211	2123981	26,526	97,52		
7.	140	0,1415	15,66	13,083	27,624	3239369	40,456	99,38	99,01	0,62
8.		0,1407	15,66	13,009	27,624	3232451	40,369	99,35		
9.		0,1412	15,66	13,056	27,624	3201881	39,988	98,30		

Khối lượng cân chuẩn: 15,38 mg

Diện tích pic chuẩn:

STT	1	2	3	4	5	6	7	TB
Diện tích (mAu.s)	2606946	2605841	2610995	2605016	2606105	2606013	2607034	2606850

* *Kết luận:* Phép thử đạt yêu cầu về độ đúng tại các mức nồng độ đã thử 80%, 100%, 140% nồng độ định lượng tương ứng với hàm lượng rutin trong mẫu là 0,19%, 0,24% và 0,34%.

3.5. Khoảng xác định

Từ kết quả độ đúng và khoảng tuyến tính suy ra khoảng xác định của phương pháp từ 23,7 µg/mL đến 40,3 µg/mL.

3.6. Độ chính xác

3.6.1. Độ lặp lại

* *Thực nghiệm:*

- *Chuẩn bị dung dịch chuẩn:* Dùng dung dịch chuẩn được chuẩn bị trong phần thẩm định độ đặc hiệu.

- *Chuẩn bị dung dịch thử:* Chuẩn bị như quy trình phân tích.

* Kết quả:

Khối lượng chuẩn: 15,38 mg

Diện tích chuẩn (lấy kết quả của tiềm độ ổn định hệ thống): 2606372 mAu.s

Bảng 3.5. Kết quả độ lặp lại

STT	Lượng cân mẫu thử (g)	Diện tích pic (mAu.s)	Hàm lượng % tính theo dược liệu khô kiệt
1	0,5001	3748331	0,247
2	0,5002	3768224	0,248
3	0,5014	3666040	0,241
4	0,5015	3719491	0,245
5	0,5006	3631920	0,239
6	0,5006	3704954	0,244
Trung bình			0,24
% RSD			1,43

* Kết luận: Phép thử đạt yêu cầu về độ lặp lại.

3.6.2. Độ chính xác trung gian

* Thực nghiệm: Tiến hành tương tự như phần độ lặp lại nhưng khác ngày, khác người thử nghiệm.

* Kết quả:

Bảng 3.6. Kết quả khảo sát độ thích hợp hệ thống – KNV 2

STT	Thời gian lưu (phút)	Diện tích (mAu.s)	Khối lượng cân chuẩn (mg)
C1	1	14,180	2606946
	2	14,160	2605841
	3	14,153	2610995
	4	14,147	2605016
	5	14,153	2606105
	6	14,147	2606013
	7	14,133	2607034
	TB	14,153	2606850
	% RSD	0,10	0,07
C2	1	14,127	2569685
			15,38
			15,5

Bảng 3.7. Kết quả khảo sát độ chính xác trung gian

Kiểm nghiệm viên 1				Kiểm nghiệm viên 2			
Ngày: 27/12/2022				Ngày: 3/1/2023			
Thiết bị phân tích: Hitachi –DAD-ELSD Lượng cân chuẩn: 15,38 mg Diện tích pic chuẩn TB: 2606372 mAu.s (Lấy kết quả từ độ lặp lại)				Thiết bị phân tích: Hitachi –DAD-ELSD Lượng cân chuẩn: 15,5 mg Diện tích pic: 2569685 mAu.s (Sử dụng kết quả đo chuẩn 2 trên)			
STT	Lượng cân mẫu thử (g)	Diện tích pic (mAu*s)	Hàm lượng % tính theo dược liệu khô kiệt	STT	Lượng cân mẫu thử (g)	Diện tích pic (mAu*s)	Hàm lượng % tính theo dược liệu khô kiệt
1	0,5001	3748331	0,247	1	0,5203	3967874	0,257
2	0,5002	3768224	0,248	2	0,5216	3987758	0,258
3	0,5014	3666040	0,241	3	0,5311	3957059	0,251
4	0,5015	3719491	0,245	4	0,5302	3964479	0,252
5	0,5006	3631920	0,239	5	0,5381	3924185	0,246
6	0,5005	3704954	0,244	6	0,5308	3978743	0,253
Trung bình (%) n = 6			0,24	Trung bình (%) n = 6			0,25
RSD (%) n = 6			1,43	RSD (%) n = 6			1,72
Kết quả định lượng trung bình: 0,25% (n = 12); % RSD = 2,36% (n = 12)							

* Kết luận: Phép thử đạt yêu cầu về độ chính xác.

3.7. Giới hạn phát hiện (LOD), giới hạn định lượng (LOQ)

3.7.1. Xác định LOD, LOQ

* *Thực nghiệm:* Từ dung dịch chuẩn rutin có nồng độ 16,28 (µg/mL) được chuẩn bị trong phần thẩm định Độ tuyến tính, tiến hành pha loãng lần lượt 2,5, 5, 10 và 20

Nồng độ rutin (µg/mL)	0,81	1,63	3,26	6,51	16,28
Diện tích pic (mAu.s)	65103	128568	260796	518350	1294266

Phân tích thống kê đường tuyến tính trên phần mềm Excel để xác định độ lệch chuẩn của số dư (= Standard Error). Theo kết quả thống kê, độ lệch chuẩn số dư (Standard Error) bằng 723,02.

Tính toán LOD, LOQ theo công thức đưa ra trong đề cương:

$LOD = (3,3 \times 723,02)/79483,84 = 0,03 \text{ (µg/mL)}$
 → Giới hạn phát hiện/mẫu: 1,5 µg/g. $LOQ = (10 \times$

lần bằng dung môi pha mẫu. Xây dựng đường chuẩn biểu diễn sự phụ thuộc giữa diện tích pic rutin và nồng độ rutin có trong mẫu, xác định độ dốc của đường chuẩn và độ lệch chuẩn của đáp ứng.

* *Kết quả:*

- Kết quả xây dựng đường chuẩn:

$723,02/79483,84 = 0,09 \text{ (µg/mL)} \rightarrow$ Giới hạn định lượng/ mẫu: 4,5 µg/g (4,5 µg trong 1 g mẫu thử) .

3.7.2. Thực nghiệm xác nhận sự phù hợp của LOQ

* *Thực nghiệm:* Chuẩn bị dung dịch mẫu thử có nồng độ khoảng 0,09 (µg/mL) tiêm vào hệ thống sắc ký. Kết quả đáp ứng pic rutin được thể hiện ở bảng 3.8

Bảng 3.8. Kết quả các giá trị đáp ứng của mẫu thử

STT	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Diện tích pic (mAu.s)	22856	27158	24789	24983	26813	25888	26223	26688	27978	28743
Trung bình diện tích pic (mAu.s) = 26211,9; % RSD = 6,5%										

* *Kết luận:* Giá trị LOD, LOQ của phép thử xác định được đạt yêu cầu.

4. KẾT LUẬN

Qua thẩm định phương pháp định tính, định lượng rutin trong dược liệu Trà hoa vàng cho thấy phương pháp có độ đặc hiệu tốt, khoảng tuyến tính xây dựng có sự tương quan tuyến tính chặt chẽ giữa diện tích pic và nồng

độ dung dịch; phương pháp xây dựng có độ lặp lại, độ chính xác, độ đúng đạt yêu cầu; phương pháp có giới hạn phát hiện là 1,5 µg/g và giới hạn định lượng là 4,5 µg/g. Như vậy phương pháp có thể áp dụng để định tính, định lượng rutin trong dược liệu Trà hoa vàng (hoa).

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Bộ Y tế https://repository.vnu.edu.vn/handle/VNU_123/99268
- Tạp chí kiểm nghiệm thuốc - Số 3.2019; Tập 17.(65)
- <https://doi.org/10.15625/vjc.2018-0029>
- Tạp chí Khoa học Nông Nghiệp Việt Nam 2017, Quy trình nhân giống in vitro cây Trà hoa vàng (Camellia sp.) – Số 12.2017; Tập 15, trang 1664-1678.
- Bộ Y tế (2017), Dược điển Việt Nam V bản bổ sung, chuyên luận Hoè.
- ICH (2005), Validation of Analytical Procedures: “Text and Methodology Q2(R1)”
- The Pharmacopocia of the People’s Republic of China, 2020 Version, Sophorae Flos.