

DOI: <https://doi.org/10.59294/HIUJS.KHD.2026.010>

## XÂY DỰNG QUY TRÌNH ĐỊNH LƯỢNG CHRYSIN TRONG VỎ THÂN NÚC NÁC (*Oroxylum indicum*) BẰNG SẮC KÝ LỚP MỎNG

Nguyễn Thị Quỳnh Nga, Thạch Anh Chương, Trần Thanh Ngân,  
Đào Quốc Huy, Trần Thị Vân Anh\*  
Trường Dược, Đại học Y Dược Thành phố Hồ Chí Minh

### TÓM TẮT

**Đặt vấn đề:** Núc nác (*Oroxylum indicum* L.) là dược liệu được sử dụng phổ biến ở Việt Nam do đó cần có phương pháp kiểm tra để đảm bảo chất lượng. Nghiên cứu tiến hành xây dựng quy trình định lượng chrysin, một flavonoid chính trong vỏ thân Núc nác bằng sắc ký lớp mỏng. **Mục tiêu:** Xây dựng quy trình định lượng chrysin trong vỏ thân Núc nác bằng sắc ký lớp mỏng, đánh giá quy trình và so sánh kết quả định lượng với phương pháp sắc ký lỏng cao áp. **Đối tượng và phương pháp nghiên cứu:** Vỏ thân Núc nác được thu hái và định danh. Thực hiện chiết xuất, khảo sát điều kiện sắc ký, điều kiện phát hiện, đánh giá quy trình theo hướng dẫn của ICH. So sánh kết quả định lượng với phương pháp HPLC. **Kết quả:** Quy trình định lượng chrysin trong vỏ thân Núc nác bằng sắc ký lớp mỏng được xây dựng với các thông số sau: thể tích chấm sắc ký 3  $\mu$ L, khai triển với hệ dung môi chloroform - acetone - acid formic (95:5:9), nhúng thuốc thử  $AlCl_3$  1% /MeOH, đo mật độ quang với máy TLC-Explorer ở bước sóng 366 nm. Quy trình đạt độ tuyến tính, độ lặp lại, độ đúng. **Kết luận:** Nghiên cứu cung cấp một quy trình định lượng đơn giản thành phần flavonoid của Núc nác.

**Từ khóa:** Núc nác, chrysin, định lượng, sắc ký lớp mỏng

## QUANTITATIVE ANALYSIS OF CHRYSIN IN *Oroxylum indicum* STEM BARK BY THIN-LAYER CHROMATOGRAPHY

Nguyen Thi Quynh Nga, Thach Anh Chuong, Tran Thanh Ngan,  
Dao Quoc Huy, Tran Thi Van Anh

### ABSTRACT

**Background:** *Oroxylum indicum* L. is a medicinal plant widely used in Vietnam, demanding reliable quality control methods. This study aims to establish a quantification procedure for chrysin - a principle flavonoid in *Oroxylum indicum* stem bark - using Thin-Layer Chromatography (TLC). **Objective:** To develop a TLC-based quantification procedure for chrysin in *O. indicum* stem bark, validate the method, and compare the results with HPLC method. **Materials and Methods:** *O. indicum* stem bark samples were collected and identified. The study involved extraction, optimization of chromatographic and detection conditions, and method validation according to ICH guidelines. The quantitative results were then compared with the HPLC method. **Results:** The TLC quantification procedure for chrysin in *O. indicum* stem bark was established with the following parameters: a sample application volume of 3  $\mu$ L; mobile phase consisting of chloroform - acetone - formic acid (95:5:9); derivatization with 1%  $AlCl_3$  in MeOH; and densitometric measurement using TLC-Explorer at a wavelength of 366 nm. The procedure met the requirements for linearity, repeatability, and accuracy. **Conclusion:** The study provides a simple quantitative procedure for the flavonoid constituents of *O. indicum*.

**Keywords:** *Oroxylum indicum*, chrysin, quantification, thin layer chromatography

\* Tác giả liên hệ: Trần Thị Vân Anh, Email: [ttvananh@ump.edu.vn](mailto:ttvananh@ump.edu.vn)  
(Ngày nhận bài: 10/4/2026; Ngày nhận bản sửa: 05/5/2026; Ngày duyệt đăng: 10/5/2026)

## 1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Núc nác (*Oroxylum indicum* L.) thuộc họ Bignoniaceae là cây thuốc phân bố ở các vùng Nam Á và Đông Nam Á trong đó có Việt Nam. Tại Việt Nam, vỏ thân của Núc nác được sử dụng để giảm đau, tiêu viêm, thanh nhiệt, trị viêm họng và một số bệnh khác [1]. Nhiều nghiên cứu báo cáo thành phần hoá học chính trong Núc nác là các flavonoid chiếm hàm lượng cao, trong đó, vỏ thân của Núc nác có baicalein, chrysin, oroxylin A ... [2]. Hiện nay, vấn đề đảm bảo chất lượng dược liệu luôn được quan tâm, đòi hỏi cần có những phương pháp đánh giá chất lượng của dược liệu. Chuyên luận Núc nác trong Dược Điển V chỉ áp dụng chỉ tiêu xác định hàm lượng chất chiết được mà chưa có qui trình định lượng thành phần chính [1]. Một số nghiên cứu đã xây dựng qui trình định lượng các flavonoid chính trong Núc nác bằng phương pháp sắc kí lỏng hiệu năng cao (HPLC) [3, 4]. Phương pháp HPLC có độ chính xác cao nhưng đòi hỏi phải có trang thiết bị khá đắt tiền mà không phải phòng thí nghiệm nào cũng được trang bị. Trong nghiên cứu này, qui trình định lượng hợp chất chrysin, một flavonoid chính trong Núc nác, bằng phương pháp sắc kí lớp mỏng (SKLM) được xây dựng nhằm đề xuất một quy trình đơn giản có thể được áp dụng trong vấn đề kiểm soát chất lượng dược liệu Núc nác. So với HPLC, việc định lượng bằng SKLM đơn giản hơn, không yêu cầu nhiều thiết bị phức tạp, ngoài ra, khai triển sắc ký lớp mỏng thường chỉ cần thời gian ngắn và cùng với những thuốc thử thích hợp thì kết quả dễ nhận thấy được bằng mắt thường hoặc cùng với các thiết bị hỗ trợ.

## 2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1. Đối tượng nghiên cứu

Vỏ thân của cây Núc nác (*Oroxylum indicum* L.) thu hái tại vườn Dược liệu, Trường Dược, Đại Học Y Dược Thành phố Hồ Chí Minh (Tp.HCM) vào tháng 3/2025, đảm bảo đúng định danh cây thuốc. Mẫu vỏ thân được phơi, sấy khô và xay nhỏ.

### 2.2. Dung môi, hóa chất, trang thiết bị

#### 2.2.1. Nguyên liệu

Chuẩn chrysin, oroxylin A, baicalein chiết từ Núc nác (có độ tinh khiết 100.0% được xác định bằng HPLC-PDA) được cung cấp bởi Bộ môn Dược liệu, Trường Dược, Đại học Y Dược Tp.HCM.

#### 2.2.2. Dung môi, hoá chất

Ethanol 96% (Việt Nam), *n*-hexan, cloroform (CHCl<sub>3</sub>), methanol (MeOH), acetone (Fisher - Hoa Kỳ), formic acid (Xilong - Trung Quốc).

#### 2.2.3. Trang thiết bị

Đèn UV 254 nm và 365 nm Viber Lourmat CN-15 (Đức), thiết bị TLC Explorer (Merck, Đức), cân phân tích có độ nhạy 0.1 mg Satorious (Đức), bể siêu âm Sonorex RK - 1028H (Đức), micropipette 200 - 1000 µL Gilson (Pháp), micropipette 200 µL Wilson (Nhật), Eppendorf 1.5 mL Biologix (Mỹ), bản SKLM Silica gel F254 (Merck, Đức), mao quản chia vạch chính xác.

### 2.3. Phương pháp nghiên cứu

#### 2.3.1. Thu thập và chiết xuất mẫu vỏ thân của Núc nác

*Thu thập và chuẩn bị mẫu Núc nác:* Vỏ thân của cây Núc nác (*Oroxylum indicum* L.) 4 năm tuổi thu hái tại vườn Dược liệu, Trường Dược, Đại học Y Dược Thành phố Hồ Chí Minh. Mẫu vỏ thân dày 0.8 cm sau khi được thu thập được rửa sạch và sấy trong tủ sấy ở nhiệt độ 60°C cho đến khi hàm ẩm < 13%. Mẫu sau khi sấy đem xay nhỏ, rây thành bột nửa mịn (qua rây 355) dùng để chiết xuất. Mẫu được xác định hàm ẩm để tính toán kết quả.

*Chiết xuất mẫu thử:* Quy trình chiết mẫu thử được kế thừa từ nghiên cứu xây dựng qui trình định lượng baicalein, oroxylin A, chrysin trong vỏ thân Núc nác bằng phương pháp HPLC-PDA [3]. Cân chính xác khoảng 100 mg mẫu bột vỏ thân Núc nác cho vào ống nghiệm ly tâm (10 mL), thêm 5 mL EtOH 50%, siêu âm ở 40°C trong 30 phút. Sau đó ly tâm với tốc độ 4500 vòng/phút trong vòng 5

phút, chuyển toàn bộ dịch vào bình định mức 10 mL. Thêm 5 mL EtOH 50% vào phần cặn còn lại và tiến hành chiết lần hai với quy trình như trên. Dung dịch lần hai được gộp với dịch lần một vào bình định mức 10 mL và bổ sung cho đủ thể tích bằng EtOH 50%. Mẫu lọc qua màng lọc milipore 0.22  $\mu\text{m}$  thu được dung dịch mẫu thử dùng cho phân tích HPLC [3].

**Chuẩn bị mẫu chuẩn:** Mẫu chuẩn chrysin: Cân chính xác 5 mg chrysin, cho vào bình định mức 5 mL, thêm khoảng 2 mL MeOH, siêu âm đến khi tan hoàn toàn, bổ sung MeOH đến 5 mL thu được dung dịch chuẩn chrysin có nồng độ 1 mg/mL, dùng dung dịch chuẩn gốc này để pha loãng thành các nồng độ cần thiết.

### 2.3.2. Khảo sát điều kiện sắc ký

Tiến hành chấm mẫu thử và mẫu chuẩn chrysin nồng độ 100  $\mu\text{g/mL}$  lên cùng một bản sắc ký. Khai triển bản sắc ký với các hệ dung môi khác nhau. Phát hiện vết dưới đèn UV 254 nm và 365 nm. Lựa chọn hệ dung môi cho các vết tròn, gọn và tách nhau rõ.

### 2.3.3. Khảo sát điều kiện phát hiện

**Khảo sát thể tích chấm sắc ký và điều kiện phát hiện với thuốc thử  $\text{AlCl}_3$ :** Tiến hành chấm bản sắc ký gồm mẫu thử và mẫu chuẩn chrysin nồng độ 100  $\mu\text{g/mL}$ . Mỗi bản mỏng khảo sát một thể tích vết chấm khác nhau lần lượt là 1  $\mu\text{L}$ , 2  $\mu\text{L}$ , 3  $\mu\text{L}$ , 4  $\mu\text{L}$  (trường hợp thể tích chấm  $\geq 2\mu\text{L}$ , chia mỗi lần chấm 1  $\mu\text{L}$ ), khai triển với hệ dung môi đã khảo sát. Sau khai triển, để khô hoàn toàn dung môi.

- Điều kiện không dùng thuốc thử: Phát hiện vết dưới đèn UV 254 nm và 366 nm, xác định diện tích pic của các vết bằng máy TLC Explorer.

- Điều kiện có dùng thuốc thử  $\text{AlCl}_3$  1% trong MeOH: Nhúng bản mỏng với thuốc thử  $\text{AlCl}_3$  1% trong MeOH, để khô. Phát hiện vết dưới đèn UV 366 nm và xác định diện tích pic của các vết bằng máy TLC Explorer.

So sánh sắc ký đồ thu được từ bản mỏng không dùng và có dùng thuốc thử, xác định điều kiện thích hợp để phát hiện chrysin trong mẫu thử và mẫu chuẩn ở các thể tích chấm sắc ký khác nhau.

**Đánh giá sự ảnh hưởng của thời gian đến điều kiện phát hiện với thuốc thử  $\text{AlCl}_3$ :** Thời gian phản ứng với thuốc thử có thể ảnh hưởng mật độ quang đo được, vì vậy tiến hành khảo sát thời gian tối ưu sau khi phun thuốc thử để ghi nhận tín hiệu rõ nhất.

Tiến hành chấm lặp lại mẫu chuẩn chrysin nồng độ 100  $\mu\text{g/mL}$  thành 3 vết trên cùng một bản mỏng. Khai triển với hệ dung môi đã khảo sát ở trên Sau khi khai triển, để khô bản sắc ký. Nhúng bản mỏng với thuốc thử  $\text{AlCl}_3$  1% trong MeOH, để khô. Phát hiện dưới đèn UV 366 nm, xác định diện tích pic của các vết bằng máy TLC Explorer tại các thời điểm 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30 phút. Tính diện tích pic trung bình của ở từng thời điểm. Xác định thời gian các vết chrysin cho diện tích pic cực đại là thời gian cần thiết để phản ứng xảy ra hoàn toàn.

### 2.3.4. Thẩm định quy trình định lượng

Theo hướng dẫn của ICH Q2(R2) 2022 [5] về xác nhận phương pháp phân tích 06 chỉ tiêu: tính đặc hiệu, độ chính xác hay độ lặp lại, độ chính xác trung gian hay độ lặp lại liên ngày, độ đúng, tính tuyến tính, giới hạn phát hiện (LOD) và giới hạn định lượng (LOQ).

#### Tính đặc hiệu

**Yêu cầu:** Mẫu thử sau khai triển xuất hiện vết có  $R_f$  và màu sắc tương đương với vết chuẩn chrysin dưới UV 366 nm. Vết tách độc lập không lẫn các vết khác.

**Tiến hành:** Chấm mẫu thử, mẫu chuẩn chrysin, một vết mẫu thử thêm chuẩn. Khai triển và phát hiện theo điều kiện đã chọn. Đo diện tích pic bằng máy TLC Explorer ở UV 366 nm.

**Tính tuyến tính:** Chấm sắc ký gồm mẫu chuẩn chrysin thành 6 vết với các nồng độ 150; 125; 100; 75; 50; 25  $\mu\text{g/mL}$ , khai triển và phát hiện theo điều kiện đã chọn. Đo diện tích pic bằng máy TLC Explorer

ở UV 366 nm. Sử dụng phân tích hồi quy tuyến tính (Data Analysis - Regression) của Excel để tính hệ số tương quan tuyến tính  $R^2$  và phương trình tuyến tính từ kết quả diện tích pic đo được.

*Giới hạn phát hiện (LOD) và giới hạn định lượng (LOQ)*

*Yêu cầu:*

- LOD có tỷ lệ đáp ứng nhiễu S/N là 3/1.
  - LOQ có tỷ lệ đáp ứng nhiễu S/N là 10/1.
- $S/N = 2H/h$  với H: Chiều cao pic và h: Nhiễu đường nền.

*Tiến hành:* Pha loãng mẫu chuẩn chrysin (C) thành các nồng độ thấp khác nhau.

Tiến hành chấm sắc ký, khai triển và phát hiện theo điều kiện đã chọn. Đo diện tích pic bằng máy TLC Explorer ở UV 366 nm. Thực hiện cho đến khi tìm được LOD.

*Độ chính xác*

- Độ lặp lại trên một mẫu: Chấm mẫu chuẩn chrysin nồng độ 100  $\mu\text{g/mL}$  và một mẫu thử được chấm thành 6 vết trên 1 bản mỏng.

- Độ lặp lại trên các mẫu khác nhau: Chấm mẫu chuẩn chrysin nồng độ 100  $\mu\text{g/mL}$ , và 6 mẫu thử (chiết xuất 6 lần khác nhau) chấm thành 6 vết.

Khai triển và phát hiện theo điều kiện đã chọn. Đo diện tích pic bằng máy TLC Explorer ở UV 366 nm. Từ kết quả diện tích pic, tính nồng độ chrysin có trong dịch thử, quy về hàm lượng chrysin có trong 100 mg dược liệu. Sử dụng phân tích thống kê mô tả (Data analysis - Descriptive Statistics) của Excel để tìm độ lệch chuẩn (SD) và trung bình (Mean), tính được  $RSD (\%) = 100 \times SD/\text{Mean}$ .

*Độ chính xác trung gian:* Chiết 6 mẫu thử khác nhau, khác với các mẫu thử định độ lặp lại, thực hiện bởi kiểm nghiệm viên khác, không trùng với ngày thử định độ lặp lại. Thực hiện và tính toán như độ lặp lại trên các mẫu khác nhau (mục 2.3.5). Sử dụng phép kiểm t - test độc lập để so sánh kết quả hàm lượng chrysin định lượng được liên ngày.

*Độ đúng:* Lấy trung bình hàm lượng chrysin định lượng được trong các mẫu thử độ lặp lại ở mục 2.3.4.4 và 2.3.4.5 làm hàm lượng chrysin có trong dược liệu. Thực hiện chiết mẫu thử cùng với chuẩn ở các mức nồng độ: thêm 80% chuẩn, thêm 100% chuẩn, thêm 120% chuẩn so với lượng chất có trong 100 mg dược liệu. Lượng chuẩn thêm vào quy đổi từ thể tích dung dịch chuẩn C nồng độ 100  $\mu\text{g/mL}$ . Mỗi mức thêm chuẩn thực hiện 3 mẫu. Tiến hành chấm sắc ký, khai triển và phát hiện theo điều kiện đã chọn. Từ kết quả diện tích pic, tính nồng độ chrysin có trong các dịch đo, tính được lượng chuẩn chrysin tìm thấy. Tính tỷ lệ thu hồi của phương pháp. Tính RSD của tỷ lệ thu hồi.

Lượng chuẩn tìm thấy = [lượng chrysin có trong dịch đo] - [lượng chrysin có trong dược liệu]

$$\text{Tỷ lệ thu hồi} = \frac{\text{Lượng chuẩn thêm vào}}{\text{Lượng chuẩn tìm thấy}} \times 100\%$$

### 2.3.5. So sánh kết quả định lượng bằng sắc ký lớp mỏng và sắc ký lỏng hiệu năng cao

Dùng các mẫu thử đã định lượng bằng SKLM để triển khai định lượng bằng HPLC - PDA theo điều kiện sau: Sử dụng cột Hibar C18 (250  $\times$  4.6 mm; 5 mm), pha động là hỗn hợp acid trifloroacetic 0.05% (A) và acetonitril (B) theo chương trình dung môi: 35 - 60% B (21 phút); 60 - 80% B (1 phút); 80% B (13 phút), tốc độ dòng 1.2 mL/phút và phát hiện ở bước sóng 270 nm [3].

Từ kết quả diện tích pic, tính được nồng độ chrysin có trong dịch thử, quy về hàm lượng chrysin có trong 100 mg dược liệu.

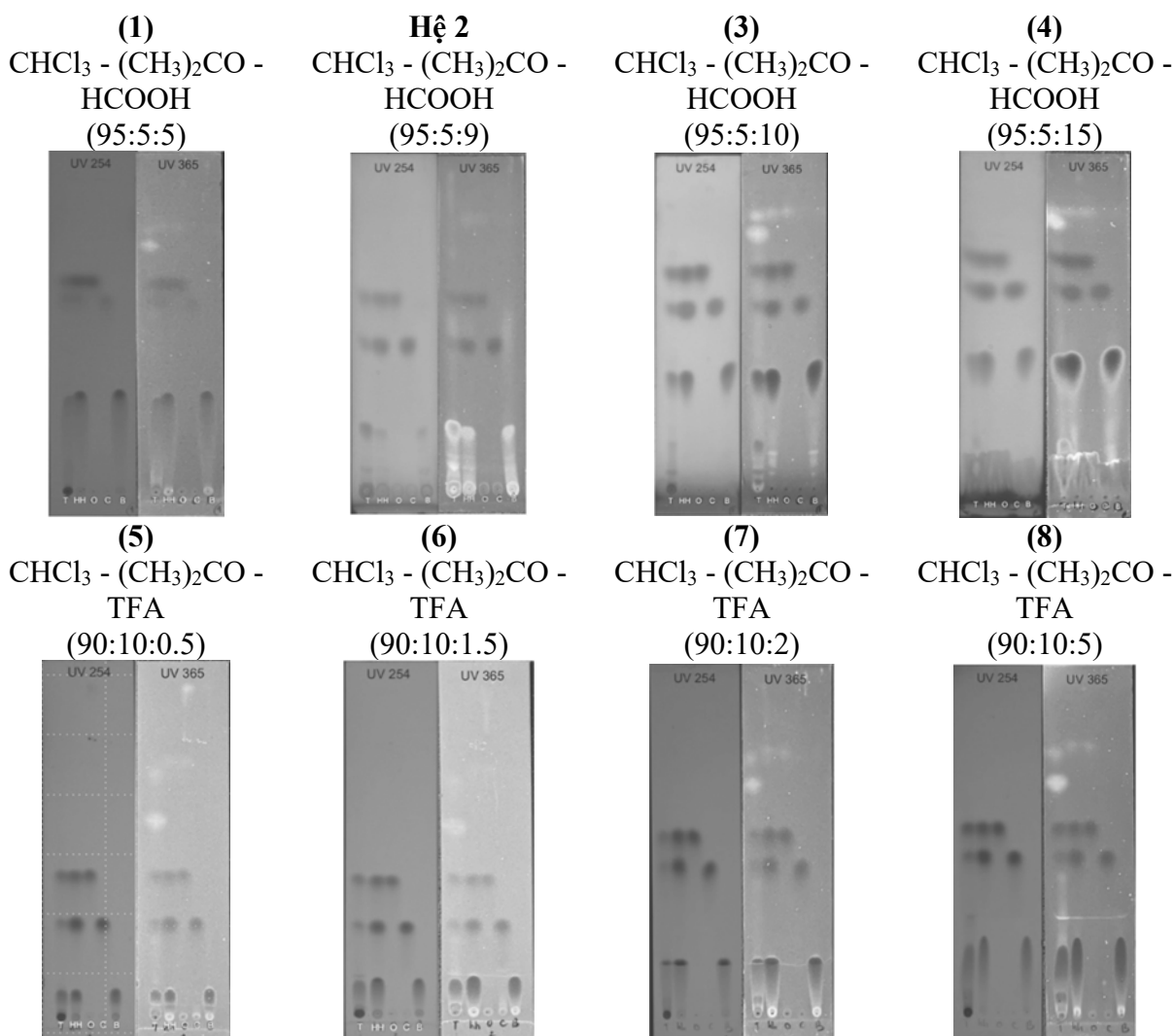
## 3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

### 3.1. Xây dựng quy trình định lượng

#### 3.1.1. Khảo sát hệ dung môi sắc ký

Sau khi khảo sát các hệ dung môi khác nhau, hệ dung môi với 2 thành phần cơ bản là chloroform và aceton được lựa chọn do có khả năng phân tách hai thành phần chính là oroxylin A (O) và chrysin

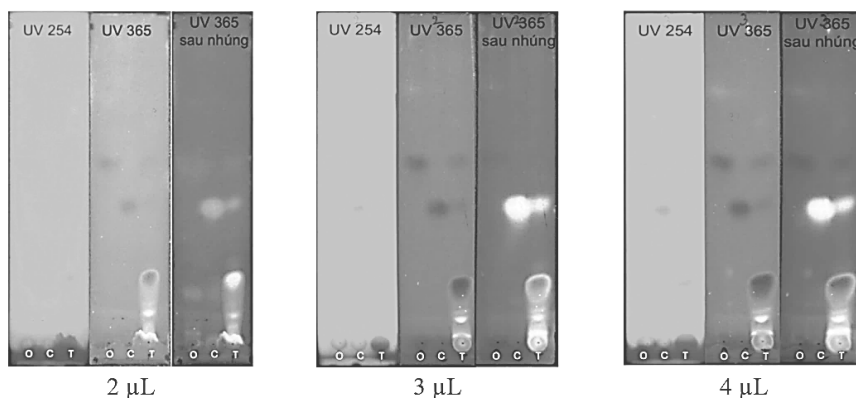
(C). Để các vết gọn, khảo sát acid thêm vào hệ. Kết quả khảo sát trình bày ở Hình 1. Hai acid khảo sát là acid trifluoroacetic (TFA) và acid formic (HCOOH), kết quả cho thấy acid formic cho các vết Oroxylin A (O) và chrysin (C) gọn không bị kéo vệt trong khi sử dụng acid trifluoroacetic các vết kéo vệt nhiều hơn. Acid formic được lựa chọn và khảo sát hàm lượng acid formic bổ sung vào hệ. Việc tăng lượng acid formic từ 0.05% (hệ 1) - 0.08% (hệ 2) - 0.09% (hệ 3) - 0.13% (hệ 4) cho thấy các vết O và C không có sự thay đổi đáng kể tuy nhiên lượng acid tăng nhiều làm hệ phân cực hơn, sắc kí không ổn định. Vì thế hệ dung môi (2) cloroform - acetone - acid formic (95:5:9) được lựa chọn do sắc kí đồ cho các vết tách nhau rõ, tròn, gọn với lượng acid phù hợp với hệ sắc kí.



**Hình 1.** Kết quả khảo sát hệ dung môi sắc kí phân tích  
 Ghi chú: T (dịch chiết Núc nác), HH (hỗn hợp chuẩn Baicalein+Chrysin+Oroxylin A),  
 O: Oroxylin A, C: Chrysin

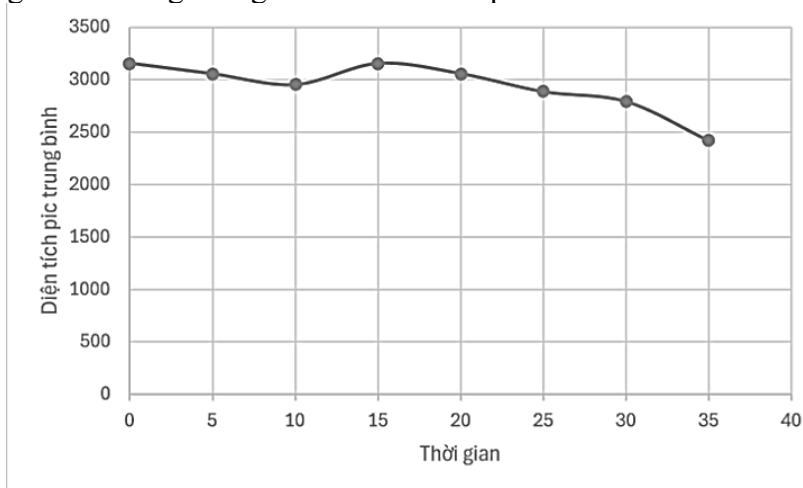
### 3.1.2. Khảo sát điều kiện phát hiện

**Khảo sát thể tích chấm sắc kí và điều kiện phát hiện:** Kết quả khảo sát thể tích chấm sắc kí trình bày ở Hình 2. Vết C và O trên bản sắc kí không phun thuốc thử và quan sát dưới UV 365 nm rất mờ không phù hợp định lượng. Sau khi phun thuốc thử  $\text{AlCl}_3$  1%/ MeOH, vết C phát quang rõ dưới đèn UV 365 nm, vết O không có hiện tượng phát quang nên việc ghi nhận mật độ quang rất thấp. Vì thế khảo sát định lượng chỉ tiến hành trên vết chrysin (C). Đo mật độ quang của vết chrysin trong dịch chiết Núc nác với thể tích chấm 2  $\mu\text{L}$ , 3  $\mu\text{L}$  và 4  $\mu\text{L}$  cho thấy diện tích pic tỉ lệ thuận với thể tích chấm, thể tích 3  $\mu\text{L}$  có mật độ phù hợp cho việc phát hiện. Do vậy chọn thể tích chấm sắc kí là 3  $\mu\text{L}$  và phát hiện sau khi phun thuốc thử  $\text{AlCl}_3$ .



**Hình 2.** Kết quả khảo sát thể tích chấm sắc kí  
Ghi chú: T (dịch chiết Núc nác), O: Oroxylin A, C: Chrysin

Khảo sát sự ảnh hưởng của thời gian đến điều kiện phát hiện với thuốc thử  $AlCl_3$ : Thực hiện đo mật độ quang ngay sau khi nhúng thuốc thử (sấy khô ngay lập tức) và các thời điểm sau 5, 10, 15, 20, 25, 30 và 35 phút. Kết quả cho thấy diện tích pic thay đổi không đáng kể sau các thời gian phản ứng khác nhau, thậm chí có giảm khi tăng thời gian nhiều hơn 20 phút.



**Hình 3.** Biểu đồ diện tích pic Chrysin theo thời gian sau khi nhúng thuốc thử

Như vậy, chọn đo mật độ quang ngay khi nhúng thuốc thử.

Sau quá trình khảo sát, điều kiện sắc kí được lựa chọn như sau: Chấm sắc ký với thể tích mỗi vết là 3 µL (chấm 3 lần, mỗi lần 1 µL), khai triển với hệ dung môi: cloroform - acetone - acid formic (95:5:9), bản mỏng sau khai triển phun thuốc thử  $AlCl_3$  1% trong MeOH, để khô, đo mật độ quang ngay.

Hàm lượng chrysin có trong dược liệu được tính theo công thức:

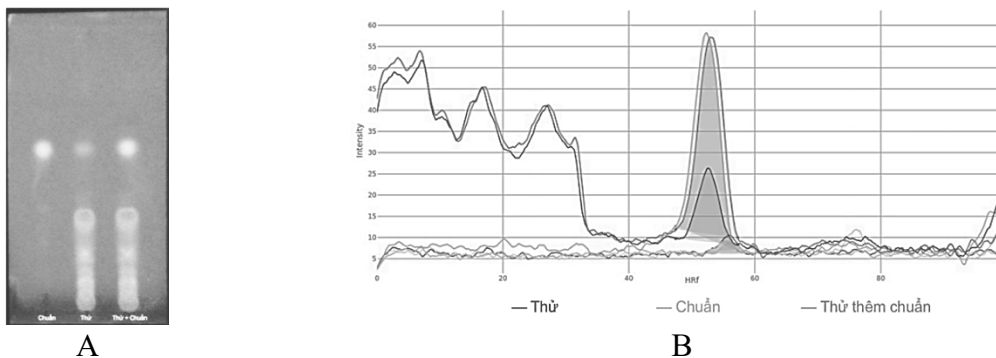
$$H (\%) = \frac{S_{thử}}{S_{chuẩn}} \times C_{chuẩn} \times \frac{100}{m(100-h)}$$

S thử: Diện tích vết chrysin trong mẫu thử, S chuẩn: Diện tích vết chrysin trong mẫu chuẩn, C chuẩn: Nồng độ mẫu chuẩn, m: Khối lượng dược liệu, h: Độ ẩm (100%)

## 3.2. Thẩm định quy trình định lượng

### 3.2.1. Độ đặc hiệu

Đánh giá tính đặc hiệu của phương pháp phân tích dựa trên pic chrysin trên sắc kí đồ (Hình 4). Sắc kí đồ chuyển đổi cho thấy, mẫu thử, mẫu chuẩn chrysin và mẫu thử thêm chuẩn chrysin có  $R_f$  tương đương. Trên sắc ký đồ, pic chrysin của mẫu chuẩn, mẫu thử, mẫu thử thêm chuẩn đều không bị lẫn các pic khác.



**Hình 4.** Kết quả thẩm định độ đặc hiệu

(A) Sắc kí đồ soi dưới UV 365 nm sau nhúng thuốc thử; (B) Sắc kí đồ chuyển đổi bằng máy TLC explorer

**3.2.2. Tính tuyến tính**

Thực hiện đo diện tích pic của chrysin ở các nồng độ khác nhau, xây dựng được phương trình tuyến tính trên 5 nồng độ (25 - 125 µg/mL). Kết quả phương trình tuyến tính như sau  $\hat{y} = 11.62x + 57.99$  ( $R = 0.9966$ ). Kết quả trình bày đường tuyến tính ở Hình 5.

Sử dụng phương pháp kiểm bình phương tối thiểu để đánh giá ý nghĩa của phương trình hồi quy và các hệ số của phương trình với độ tin cậy 95%.

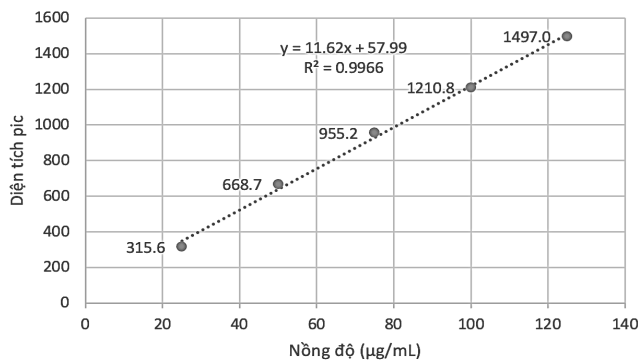
Giả sử phương trình hồi quy  $\hat{y} = ax + b = 11.62x + 57.99$  với  $R^2 = 0.996$

Significance  $F = 8.48 \times 10^{-5} < 0.05 \rightarrow$  Phương trình hồi quy tương thích.

$P\text{-value}_a = 0,00 < 0.05 \rightarrow$  Hệ số hồi quy a có ý nghĩa.

$P\text{-value}_b = 0.17 > 0.05 \rightarrow$  Hệ số hồi quy b không có ý nghĩa.

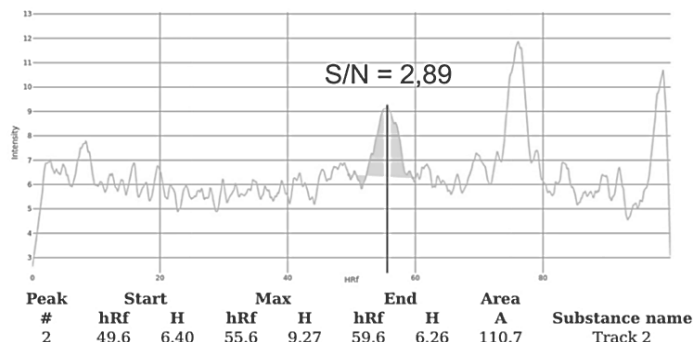
Kết quả cho phương trình hồi quy của chrysin là  $\hat{y} = 11.62x$  ( $R^2 = 0.996$ ) tuyến tính trong khoảng nồng độ từ 25 - 125 µg/mL.



**Hình 5.** Kết quả thẩm định tính tuyến tính

**3.2.3. Giới hạn phát hiện (LOD) và giới hạn định lượng (LOQ)**

LOD được xác định tại nồng độ 6.25 µg/mL, tín hiệu và nhiễu nền trình bày dưới Hình 6. LOQ được xác định tại nồng độ 20.625 µg/mL.



**Hình 6.** Kết quả xác định LOD

### 3.2.4. Độ chính xác

Độ lặp lại trên một mẫu: Kết quả định lượng 6 lần trên một mẫu trình bày trong Bảng 1. RSD của hàm lượng định lượng được là 2.94%.

**Bảng 1.** Bảng kết quả thẩm định độ lặp lại trên một mẫu

Mẫu	Rf	Diện tích pic	Hàm lượng ( $\mu\text{g}/100\text{ mg}$ )
T lần 1	0.58	951.2	37.74
T lần 2	0.58	998.5	39.62
T lần 3	0.58	991.5	39.34
T lần 4	0.58	954.2	37.86
T lần 5	0.59	924.3	36.67
T lần 6	0.59	948.2	37.62
		<b>Trung bình</b>	<b>38.14</b>

Độ lặp lại trên các mẫu khác nhau: Thực hiện chiết 1 mẫu 6 lần khác nhau và phân tích. Hàm lượng trung bình của các mẫu T<sub>1</sub> - T<sub>6</sub> là 39.88  $\mu\text{g}/100\text{ mg}$ , RSD của hàm lượng định lượng được là 5.55%.

**Bảng 2.** Bảng kết quả thẩm định độ lặp lại trên các mẫu khác nhau

Mẫu	Khối lượng cân (mg)	Diện tích pic	Hàm lượng ( $\mu\text{g}/100\text{ mg}$ )
Chuẩn 100 ppm		2,763.2	
T <sub>1</sub>	100.0	1,037.8	37.55
T <sub>2</sub>	100.5	1,147.5	41.32
T <sub>3</sub>	100.4	1,177.0	42.43
T <sub>4</sub>	100.3	1,083.6	39.09
T <sub>5</sub>	100.1	1,030.3	37.25
T <sub>6</sub>	100.3	1,153.7	41.63
		<b>Trung bình</b>	<b>39.88</b>

### 3.2.5. Độ chính xác trung gian

Sau khi thực hiện theo mục 2.3.4.5, thu được kết quả trình bày trong Bảng 3. Hàm lượng trung bình của các mẫu T<sub>7</sub> - T<sub>12</sub> là 40.78  $\mu\text{g}/100\text{ mg}$ , RSD của hàm lượng định lượng được là 5.66%.

**Bảng 3.** Bảng kết quả thẩm định độ lặp lại liên ngày

Mẫu	Khối lượng cân (mg)	Diện tích pic	Hàm lượng ( $\mu\text{g}/100\text{ mg}$ )
Chuẩn 100 ppm		2,763.2	
T <sub>1</sub>	100	1,037.8	37.55
T <sub>2</sub>	100.5	1,147.5	41.32
T <sub>3</sub>	100.4	1,177.0	42.43
T <sub>4</sub>	100.3	1,083.6	39.09
T <sub>5</sub>	100.1	1,030.3	37.25
T <sub>6</sub>	100.3	1,153.7	41.63
		<b>Trung bình</b>	<b>39.88</b>
Chuẩn 100 ppm		3,193.7	
T <sub>7</sub>	100.2	1,397.0	43.65
T <sub>8</sub>	100.5	1,340.5	41.76
T <sub>9</sub>	100.3	1,213.6	37.89
T <sub>10</sub>	100.4	1,221.2	38.09
T <sub>11</sub>	100.1	1,341.8	41.97
T <sub>12</sub>	100.7	1,329.3	41.33
		<b>Trung bình</b>	<b>40.78</b>

Phép kiểm t - test độc lập so sánh giá trị hàm lượng chrysin định lượng được liên ngày cho kết quả hàm lượng chrysin định lượng được ở hai ngày khác nhau, bởi hai kiểm nghiệm viên khác nhau không khác nhau có ý nghĩa thống kê.

Hàm lượng chrysin trung bình ở các mẫu thử từ T<sub>1</sub> đến T<sub>12</sub> là 40.33 µg/100 mg mẫu, RSD của hàm lượng chrysin định lượng được liên ngày từ T<sub>1</sub> - T<sub>12</sub> là 5.47%.

### 3.2.6. Độ đúng

Kết quả độ đúng được trình bày ở Bảng 4.

**Bảng 4.** Bảng kết quả thẩm định độ đúng

Mức thêm chuẩn	Lượng cân mẫu (mg)	Lượng chrysin có sẵn trong mẫu (µg)	Lượng chuẩn chrysin thêm vào (µg)	Diện tích pic	Lượng chrysin tìm thấy (µg)	Tỷ lệ thu hồi (%)*	RSD của tỷ lệ thu hồi (%)
80%	100.0	40.33	32	2,665.4	72.34	100.03	4.62%
	99.8	40.25	32	2,564.8	69.61	91.75	
	99.9	40.29	32	2,575.8	69.91	92.56	
100%	100.5	40.53	40	2,473.7	82.85	105.80	
	100.0	40.33	40	2,373.9	79.61	98.20	
	100.3	40.45	40	2,420.3	81.07	101.55	
120%	100.0	40.33	48	3,029.1	88.63	100.63	
	99.9	40.29	48	2,970.2	86.91	97.12	
	100.3	40.45	48	3,065.7	89.70	102.60	

Tỷ lệ thu hồi dao động từ 91.75 - 105.80% với RSD = 4.62%. Như vậy, đánh giá kết luận thẩm định quy trình định lượng đạt theo qui định của ICH.

### 3.3. So sánh kết quả định lượng với sắc ký lỏng cao áp (HPLC)

Tiếp tục dùng 06 mẫu thử T<sub>7</sub> - T<sub>12</sub> và mẫu chuẩn chrysin nồng độ 100 µg/mL phân tích bằng HPLC - PDA theo điều kiện trong mục 2.3.5, thu được kết quả trình bày dưới Bảng 5.

**Bảng 5.** Bảng kết quả định lượng chrysin bằng HPLC - PDA

Mẫu	Lượng cân mẫu (mg)	Diện tích pic	Hàm lượng (µg/100 mg)
Chuẩn chrysin (1)		4,919.1	
Chuẩn chrysin (2)		5,004.6	
T <sub>7</sub>	100.2	2,788.4	56.08
T <sub>8</sub>	100.5	2,808.2	56.31
T <sub>9</sub>	100.3	2,854.6	57.36
T <sub>10</sub>	100.4	2,909.5	58.40
T <sub>11</sub>	100.1	2,876.4	57.91
T <sub>12</sub>	100.7	2,868.0	57.40
<b>Trung bình</b>			<b>57.25</b>

Hàm lượng chrysin trung bình ở các mẫu thử từ T<sub>7</sub> đến T<sub>12</sub> là 57.25 µg/100 mg. RSD của hàm lượng chrysin định lượng được bằng sắc ký lỏng hiệu năng cao của các mẫu T<sub>7</sub> - T<sub>12</sub> là 1.57%.

## 4. BÀN LUẬN

Quá trình khảo sát quy trình định lượng chrysin bằng sắc ký lớp mỏng cho thấy có sai số chênh lệch so với phương pháp HPLC-PDA. Do đây là phương pháp không liên tục, độ chính xác phụ thuộc nhiều vào việc chấm sắc ký và sự ổn định của phương pháp phát hiện.

Khảo sát chọn thể tích chấm là 3 µL vì cân bằng giữa khả năng phát hiện vết và giảm thiểu sai số,

mặc dù dùng mao quản chia vạch và cố định 1 uL trong mỗi lần chấm nhưng các vết chấm lan rộng không đồng đều cũng ảnh hưởng nhiều đến kết quả.

Về phương pháp phát hiện chọn cách nhúng  $AlCl_3$  sau đó quan sát dưới đèn UV 366 nm để tăng cường độ phát quang nhằm phát hiện những chênh lệch nhỏ trong nồng độ của vết đo. Baicalein có 3 nhóm hydroxyl khiến cho hợp chất phân cực và hấp phụ mạnh trên bản mỏng nên kéo thành vết dài (Hình 1), không thích hợp để triển khai định lượng bằng SKLM. Oroxylin A tuy cũng có khả năng tạo thành vết tròn, gọn, nhưng sự phát quang dưới thuốc thử không ổn định. Đây cũng là một nhược điểm của phương pháp khi không phải hợp chất nào cũng có khả năng áp dụng được.

Hiện nay có nhiều đề tài đã ứng dụng việc định lượng các hợp chất trong dược liệu bằng sắc kí lớp mỏng, tuy nhiên phương pháp sẽ đạt độ chính xác cao khi tự động hóa từ khâu chấm sắc kí tới phát hiện và ghi nhận tín hiệu (hệ thống Camag) có thể cho kết quả có RSD < 2% [6, 7]. Khả năng phân tích tốt hơn khi áp dụng các bản mỏng hiệu năng cao HPTLC [8]. Đề tài chỉ cố định được việc đồng nhất trong ghi nhận tín hiệu bằng máy TLC-Explorer, các thao tác chấm và phát hiện đều thực hiện thủ công nên có khả năng sai số mặc dù RSD < 5%. Theo hướng dẫn của AOAC, hàm lượng chất định lượng ở nồng độ 0.01% giá trị RSD của độ lặp lại có thể chấp nhận lên đến 8% [9]. Mặc dù còn những điểm cần khắc phục tuy nhiên độ lặp lại cao của phương pháp cho thấy vẫn có ý nghĩa trong thực tế. Để kết quả sát thực hơn với hàm lượng thực tế xác định bằng HPLC, chúng tôi đề xuất có thể điều chỉnh kết quả bằng cách nhân kết quả định lượng với hệ số điều chỉnh k theo thực nghiệm ( $k = 1.4$ ). Tuy nhiên cần thực hiện nhiều mẫu hơn để kết quả có tính thống kê.

Mặc dù phương pháp định lượng bằng SKLM còn có một số hạn chế, tuy nhiên phương pháp này có những ưu điểm vượt trội so với phương pháp HPLC: Phân tích được nhiều mẫu cùng một lúc trên một bản mỏng, thời gian phân tích ngắn, tiết kiệm được dung môi hoá chất, chi phí đầu tư cho qui trình định lượng cũng thấp hơn đáng kể khi so sánh với HPLC. Hiện nay trong Dược điển Việt Nam V vẫn chỉ quy định chỉ tiêu Hàm lượng chất chiết được cho dược liệu vỏ thân Núc nác [1], phương pháp định lượng bằng SKLM có độ đặc hiệu tốt hơn có thể ứng dụng trong vấn đề kiểm soát chất lượng dược liệu.

## 5. KẾT LUẬN

Nghiên cứu đã thiết lập và thẩm định quy trình định lượng chrysin có trong vỏ thân Núc nác đạt các chỉ tiêu theo hướng dẫn của ICH Q2(R2), có thể áp dụng quy trình để kiểm soát chất lượng dược liệu.

## LỜI CẢM ƠN

Nhóm xin cảm ơn công ty Merck đã hỗ trợ thiết bị TLC explorer trong quá trình nghiên cứu.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Bộ Y tế, *Dược Điển Việt Nam V, Chuyên luận Núc Nác (Vỏ thân) Cortex Oroxylin*, vol. 2. Nhà Xuất bản Y học, pp. 1285-1286, 2017.
- [2] B. Dinda, I. SilSarma, M. Dinda, and P. Rudrapaul, "Oroxylum indicum (L.) Kurz. an important Asian traditional medicine: from traditional uses to scientific data for its commercial exploitation," *J. Ethnopharmacol.*, vol. 161, pp. 255-278, 2015.
- [3] T. V. A. Trần, T. P. L. Nguyễn, T. H. L. Lê, T. N. D. Nguyễn và V. H. N. Phan, "Thiết lập chất đối chiếu baicalein và xây dựng quy trình định lượng đồng thời baicalein, oroxylin A, chrysin trong vỏ thân Núc nác bằng phương pháp HPLC-PDA." *Tạp chí Dược liệu*, tập 28, Số 1, trang 20-27. 2023.
- [4] Đ. V. Đôn, H.V. Dũng, N. T. Điệp và N. V. Long."Nghiên cứu định lượng baicalein trong núc nác (*Cortex Oroxyli*) bằng phương pháp HPLC", *Tạp chí Dược học*, số 421, trang 36-38. 2011.
- [5] Guideline I. Validation of analytical procedures Q2 (R2). ICH: Geneva. Switzerland 2022.
- [6] K. D. Trần, Q. H. Nguyễn, T. K. Phạm và V. H. Trần, "Xây dựng phương pháp và tiến hành bán định lượng rotundin trong củ một số loài bình vôi *Stephania* Lour. bằng sắc ký lớp mỏng hiệu năng

cao (HPTLC)," *Tạp chí Dược học Việt Nam*, tập 54, số 4, trang 38-42, 2014.

[7] T. M. H. Nguyễn, M. V. Vương, K. K. Hoàng, and H. L. A. Nguyễn, "Xây dựng và thẩm định phương pháp định lượng diosgenin bằng phương pháp sắc ký lớp mỏng hiệu năng cao (HPTLC)," *Tạp chí Dược học*, tập 59, số 5, trang 85-87, 2019.

[8] R. B. Patel., M. R. Patel, and B. G. Batel. "Experimental Aspects and Implementation of HPTLC," in *High-Performance Thin-Layer Chromatography (HPTLC)*. Heidelberg: Springer Berlin, pp. 41-54, 2011.

[9] AOAC International, *Official Methods of Analysis of AOAC International*. Oxford: Oxford University Press, 2023.