

# การทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ปริมาณ Quercitrin ในสารสกัดน้ำพลูควาดด้วย วิธีโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

สุนันทา ศรีโสภณ สมจิตร์ เนียมสกุล สรวุฒ จันทร์โคตรแก้ว ศักดิ์วิชัย อ่อนทอง กรวิชัย สมคิด  
และ ศิริวรรณ ชัยสมบุรณ์พันธ์

สถาบันวิจัยสมุนไพร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ถนนพหลุ 11000

**บทคัดย่อ** พลูควาด (*Houttuynia cordata* Thunb.) ใช้ประโยชน์ในยาไทยพื้นบ้านและตำรับยาแผนโบราณที่ขึ้นทะเบียนในประเทศไทยโดยสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา ในต่างประเทศใช้รักษาอาการไข้ ไอ อาการอักเสบ และขับปัสสาวะ เป็นต้น มีรายงานว่าพลูควาดสามารถต้านเชื้อไวรัส ต้านเชื้อจุลินทรีย์ เสริมภูมิคุ้มกัน ต้านอักเสบ ตำรับยาจีนที่มีพลูควาดเป็นส่วนประกอบหลักมีรายงานว่าใช้เพื่อบรรเทาอาการอักเสบในระหว่างการแพร่ระบาดของ COVID-19 กลุ่มสารที่พบมากในพลูควาดคือ phenolics ซึ่ง quercitrin เป็นองค์ประกอบหลัก และไม่พบว่ามีวิธีมาตรฐานในการควบคุมคุณภาพทางเคมีสำหรับสารสกัดพลูควาด การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ปริมาณ quercitrin ในสารสกัดน้ำพลูควาดด้วยโครมาโทกราฟีแบบของเหลวสมรรถนะสูง วัตถุประสงค์ที่ คือ ZORBAX Extend-C18 Rapid Resolution HD 2.1×50 mm, 1.8 μm อุนทุมิ 30 องศาเซลเซียส วัตถุประสงค์ที่ คือ สารละลายผสมระบบ gradient ของ 0.2% v/v phosphoric acid ในน้ำและเมทานอล อัตราการไหล 0.4 มิลลิลิตรต่อนาที วัดที่ความยาวคลื่น 350 นาโนเมตร เตรียมสารละลายตัวอย่างโดย reflux ในเมทานอล 30 นาที ผลพบว่าวิธีนี้มีความจำเพาะ มีความเป็นเส้นตรงในช่วงความเข้มข้น 0.04-0.24 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ ( $r^2$ ) เท่ากับ 0.99997 ร้อยละการคืนกลับ (%recovery) เท่ากับร้อยละ 99.76-103.16 HORRAT ของ repeatability และ intermediate precision < 2 ชัดจำกัดในการตรวจวัดเชิงปริมาณ (LOQ) เท่ากับร้อยละ 0.1 โดยน้ำหนัก วิธีที่พัฒนาขึ้นมีความแม่นยำและความเที่ยง สามารถนำไปใช้ตรวจวิเคราะห์ปริมาณ quercitrin เพื่อควบคุมคุณภาพของสารสกัดน้ำพลูควาดเดี่ยวที่มีการจำหน่ายในเชิงพาณิชย์ได้

**คำสำคัญ:** การทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์, Quercitrin, สารสกัดน้ำพลูควาด, UHPLC

Corresponding author E-mail : sununta.s@dmsc.mail.go.th

Received: 29 March 2023

Revised: 15 August 2023

Accepted: 23 August 2023

## บทนำ

พุลูความีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Houttuynia cordata* Thunb. จัดอยู่ในวงศ์ Saururaceae มีชื่อท้องถิ่นอื่น ๆ ได้แก่ ผักคาวตอง ผักก้านตอง ผักเข้าตอง ผักคาวทอง พลุแก เป็นต้น พุลูควาเป็นพืชล้มลุกอายุหลายปี พบได้ตามพื้นที่เปิดโล่งที่ชื้นและ อยู่สูงเกินกว่า 1,000 เมตรจากระดับน้ำทะเลปานกลาง มีเขตการกระจายพันธุ์ตั้งแต่ประเทศเนปาลจนถึงเอเชียตะวันออกเฉียงและเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ในประเทศไทยพบมากตามภูเขาสูงบริเวณภาคเหนือและภาคตะวันออกเฉียงเหนือ<sup>(1,2)</sup> ใช้เป็นอาหารรับประทานคู่กับน้ำพริกหรือลาบ ประโยชน์ทางยาใช้เป็นยาแผนโบราณและยาพื้นบ้าน ได้แก่ ยาแก้กามโรคทำให้น้ำเหลืองแห้ง แก้โรคผิวหนัง แก้พิษฝี แก้ริดสีดวง และใช้ในสูตรตำรับยาแผนโบราณหลายตำรับที่กระทรวงสาธารณสุขรับขึ้นทะเบียน ในต่างประเทศ เช่น จีน เกาหลี ญี่ปุ่น และอินเดีย รวมถึงภูมิภาคอินโดจีน มีการนำพุลูควาทั้งต้นไปใช้กับอาการผิดปกติที่เกิดขึ้นกับร่างกาย เช่น ไข้ ไอ อาการอักเสบ ขับปัสสาวะ เป็นต้น<sup>(2)</sup> ดังแสดงในภาพที่ 1

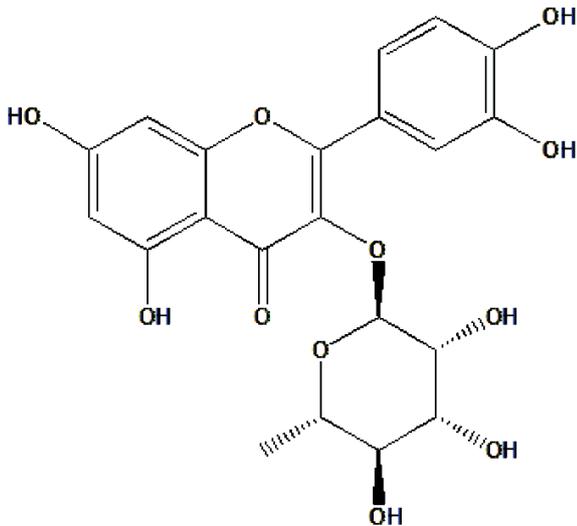


ภาพที่ 1 พุลูควา (ส่วนเหนือดิน)

ในช่วงปี พ.ศ. 2563 เป็นต้นมา ทั่วโลกประสบกับปัญหาด้านสาธารณสุขจากการแพร่ระบาดของ SARS-CoV-2 ซึ่งเป็นไวรัสชนิดใหม่ในขณะนั้นทำให้เกิดการเสียชีวิตของประชากรเป็นจำนวนมาก เพื่อการป้องกัน รักษา และยับยั้งเชื้อชนิดนี้ จึงมีการศึกษาวิจัยหลายแขนง รวมถึงมีความสนใจในงานวิจัยด้านสมุนไพรเพิ่มมากขึ้น พุลูควาจึงเป็นสมุนไพรที่หลายประเทศให้ความสำคัญ เนื่องจากมีการใช้ในยาตำรับพื้นบ้านทั้งในไทยและต่างประเทศมานานและมีฤทธิ์ต้านไวรัส เช่น herpes simplex virus (HSV)<sup>(3)</sup> และ influenza virus H1N1<sup>(4)</sup> ต้านเชื้อจุลชีพ เช่น *Staphylococcus aureus*, *Fusobacterium nucleatum*, *Streptococcus mutans* และ *Candida albicans*<sup>(5)</sup> และเสริมภูมิคุ้มกัน<sup>(6)</sup> โดยเฉพาะอย่างยิ่งสารออกฤทธิ์ในสารสกัดพุลูควาสามารถยับยั้ง RdRp enzyme ของ SARS-CoV-2 ได้<sup>(7)</sup> นอกจากนี้สารสกัดพุลูควายังช่วยฟื้นฟูความเสียหายที่เกิดขึ้นกับ aortic endothelial ในระหว่างกระบวนการการเกิดภาวะไขมันในเลือดสูง<sup>(8)</sup> มีฤทธิ์ต้านการอักเสบทั้งในหลอดทดลองและในสัตว์ทดลองได้<sup>(9,10)</sup> การศึกษาในไต้หวัน พบว่ายาตำรับของจีน Zheng-Yi-Fang มีลักษณะเป็นถุงชา ขนาดบรรจุ 4 กรัมต่อถุง ประกอบด้วยพุลูควาเป็นส่วนประกอบหลักในตำรับ มีปริมาณเท่ากับ 20% และสมุนไพรอื่นอีก 10 ชนิด ยาตำรับนี้มีผลในการบรรเทาอาการจมูกอักเสบจากการแพ้ (allergic rhinitis) ที่เกิดขึ้นระหว่างการระบาดของ COVID-19<sup>(11)</sup>

พุลูความีองค์ประกอบทางเคมีหลายชนิด เช่น สารกลุ่ม phenolics ได้แก่ p-hydroxybenzoic acid, vanillic acid, syringic acid, p-coumaric acid และ ferulic acid<sup>(12)</sup> สารกลุ่ม flavonoids ได้แก่ chlorogenic acid, neochlorogenic acid, cryptochlorogenic acid, rutin, hyperin, hyperoside, isoquercitrin, quercitrin และ quercetin<sup>(12,13)</sup> และสารกลุ่ม alkaloids ได้แก่ norcepharadione, 4,5-dioxodehydroasimilobine, cepharadione B, aristololactam B II, aristololactam A II, sauristolactam, piperolactam A, splendidine และ aristololactam<sup>(14)</sup> เป็นต้น จากรายงานการวิจัย

การประเมินคุณภาพของพลาควาจำนวน 35 ตัวอย่าง ด้วยวิธี HPLC-DAD พบว่า quercitrin เป็นองค์ประกอบหลัก โดยมีปริมาณ 0.002-0.550%<sup>(15)</sup> ดังแสดงในภาพที่ 2



ภาพที่ 2 โครงสร้างทางเคมีของ Quercitrin<sup>(15)</sup>

สาร quercitrin มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา เช่น ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ต้านอักเสบ ฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ ฤทธิ์ปรับภูมิคุ้มกันของร่างกาย ฤทธิ์แก้ปวด ฤทธิ์สมานแผล และฤทธิ์คลายกล้ามเนื้อ เป็นต้น ซึ่งมีรายงานการศึกษาวิจัยที่นำ quercitrin มาใช้กับโรคต่างๆ ได้แก่ โรคกระดูกที่เกิดจากความผิดปกติของกระบวนการเมตาบอลิก (bone metabolic diseases) เช่น โรคกระดูกพรุน (osteoporosis) โรคกระดูกข้ออ่อนเสื่อม (osteoarthritis) เป็นต้น โรคที่เกี่ยวข้องกับระบบทางเดินอาหารและลำไส้ (gastrointestinal diseases) เช่น แผลในทางเดินอาหาร (gastric ulcer) การอักเสบของลำไส้ (inflammatory bowel diseases) เป็นต้น โรคทางระบบประสาท (neuropathy) เช่น การเสื่อมของระบบประสาท (neurodegenerative diseases) หลอดเลือดสมองอุดตัน (ischemic stroke) อาการวิตกกังวลและซึมเศร้า (anxiety and depressive disorder) อาการหูหนวกจากระบบประสาท (nerve deafness) เป็นต้น โรคทางด้านระบบภูมิคุ้มกัน (immune diseases) เช่น โรคสะเก็ดเงิน (psoriasis) โรคภูมิแพ้ตัวเอง (systemic lupus erythematosus) อาการไวต่อการสัมผัส (contact hypersensitivity) เป็นต้น ภาวะ

หลอดเลือดแข็ง (atherosclerosis) โรคเบาหวาน (diabetes mellitus) มะเร็ง (cancer) การบาดเจ็บของตับ (liver injury) และการกระตุ้นการเติบโตของเส้นผม<sup>(16)</sup>

การวิเคราะห์ quercitrin ในสมุนไพร มีการศึกษาเพื่อตรวจสอบองค์ประกอบของสารในพลาควาเท่านั้น ไม่ได้เป็นการศึกษาเพื่อการวิเคราะห์ปริมาณของ quercitrin ในพลาควา โดยใช้ HPLC และ UPLC ทั้งนี้ การศึกษาองค์ประกอบในสารสกัดจากชาพลาควาที่ได้จากส่วนลำต้นและใบด้วย HPLC ตรวจพบ quercitrin ที่ retention time 29 นาที ใช้เวลาวิเคราะห์ 50 นาที<sup>(12)</sup> การประเมินคุณภาพของพลาควาในประเทศจีนจากแหล่งปลูกหลายแห่ง โดยการวิเคราะห์ phenolics จำนวน 16 ชนิด ในพลาควาด้วย HPLC-DAD พบ quercitrin ที่ retention time 44 นาที ใช้เวลาวิเคราะห์ 80 นาที<sup>(15)</sup> การวิเคราะห์สาร จำนวน 7 ชนิดของพลาควาในประเทศเกาหลีจากแหล่งปลูกหลายแห่งด้วย UHPLC-PDA โดยใช้ column ต่างชนิดกัน ตรวจพบ quercitrin ที่ retention time ต่างกัน ตั้งแต่ 8-14 นาที<sup>(17)</sup> เมื่อเปรียบเทียบผลการศึกษาระหว่าง HPLC และ UPLC พบว่าการตรวจหา quercitrin ด้วยวิธี UHPLC สามารถทำได้รวดเร็วกว่า HPLC

สมุนไพรพลาควาเป็นสมุนไพรที่ภาคเอกชนให้ความสนใจและมีการผลิตออกสู่ตลาดเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง เนื่องจากมีสรรพคุณต่อร่างกายหลายประการ โดยเฉพาะอย่างยิ่งด้านการบำรุงสุขภาพและเสริมภูมิคุ้มกัน จากการสืบค้นข้อมูลผลิตภัณฑ์ที่ได้รับการอนุญาตจากเว็บไซต์ของสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา กระทรวงสาธารณสุข<sup>(18)</sup> พบว่ามีผลิตภัณฑ์เกี่ยวกับพลาควาหลายชนิดทั้งแบบเดี่ยวและผสมมากกว่า 200 รายการ โดยพลาควาที่ระบุในฉลากของผลิตภัณฑ์ส่วนใหญ่ระบุเป็นสารสกัดพลาควา แต่ยังไม่พบว่ามีวิธีการควบคุมคุณภาพทางเคมีที่เป็นมาตรฐานสำหรับตรวจปริมาณสารสำคัญในสารสกัดน้ำพลาควา ผู้วิจัยจึงพัฒนาวิธีวิเคราะห์เพื่อตรวจปริมาณ quercitrin ซึ่งเป็นสารสำคัญในสารสกัดน้ำพลาควาด้วยวิธี UHPLC ซึ่งเป็นวิธีที่รวดเร็วกว่า HPLC การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นใหม่

ในห้องปฏิบัติการ เพื่อให้มั่นใจว่าวิธีที่พัฒนาขึ้นนี้มีความถูกต้อง นำเชื่อถือ และสามารถใช้เป็นวิธีมาตรฐานสำหรับควบคุมคุณภาพสารสกัดน้ำพลูควาดได้

## วัสดุและวิธีการ

### การเตรียมสารสกัดน้ำพลูควาด

สมุนไพรพลูควาดเก็บตัวอย่างจากแหล่งปลูกในจังหวัดจันทบุรีและเชียงใหม่ โดยเจ้าหน้าที่สถาบันวิจัยสมุนไพรและได้รับการระบุชื่อวิทยาศาสตร์ตามหลักอนุกรมวิธานพืชจากห้องปฏิบัติการพิพิธภัณฑ์พืช สถาบันวิจัยสมุนไพร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ หมายเลข Herbarium specimen DMSC 5320 นำสมุนไพรพลูควาดส่วนเหนือดินมาตัดแยก ล้าง หั่น และตากให้แห้ง จากนั้นนำไปอบในตู้อบร้อนที่อุณหภูมิ 45–50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 32 ชั่วโมง นำมาบดเป็นผงและผ่านร่อนเบอร์ 180 เก็บตัวอย่างที่ได้ในขวดแก้วสีขาปิดสนิท ปิดฉลากระบุชื่อ แหล่งที่มา และหมายเลขตัวอย่าง

ซึ่งตัวอย่างผงพลูควาดแห้ง 500 กรัม ใส่ลงในขวดแก้วก้นกลมขนาด 4 ลิตร เติมน้ำกลั่น 3.5 ลิตร สกัดด้วยวิธี reflux แล้วกรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 4 สกัดซ้ำจำนวน 2 ครั้ง ทำให้สารสกัดน้ำพลูควาดเข้มข้นด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศและทำให้แห้งด้วยวิธีระเหิดด้วยความเย็น (freeze drying) เก็บสารสกัดน้ำพลูควาดในขวดสีขาปิดสนิทที่อุณหภูมิ 2–8 องศาเซลเซียส ปิดฉลากระบุชื่อ แหล่งที่มา วิธีเตรียม และหมายเลขตัวอย่างสารสกัดน้ำพลูควาด

### สารมาตรฐาน

quercitrin ความบริสุทธิ์ 99.9% และ 98.6% (Chengdu Biopurify Phytochemicals Ltd., China, Lot. PRF21120302 และ PRF22062201)

### สารเคมี

เมทานอล (HPLC grade), น้ำ (ultra purified water) และ phosphoric acid (AR grade)

### เครื่องมือและอุปกรณ์

เครื่อง UHPLC (ultra high performance liquid chromatography) รุ่น 1290 Infinity II (Agilent Technologies®, Germany) ประกอบด้วย 1290 flexible pump, 1290 vialsampler, ICC (integrated column compartment) และ 1290 DAD FS (diode array detector fixed slit), guard column ชนิด ZORBAX Extend-C18 ขนาด 2.1×5 มิลลิเมตร ขนาดอนุภาค 1.8 ไมโครเมตร column ชนิด ZORBAX Extend-C18 Rapid Resolution HD ขนาด 2.1×50 มิลลิเมตร ขนาดอนุภาค 1.8 ไมโครเมตร (Agilent®, USA), เครื่องชั่งความละเอียด 0.1–0.01 มิลลิกรัม (Mettler Toledo®, Switzerland), เครื่องระเหยสุญญากาศ (Eyela®, USA), ตู้อบร้อน (Mettmert®, Germany), อ่างน้ำร้อน (Contherm scientific Ltd., New Zealand), sonicator (Ney®, Ultra sonikTM, USA), freeze dryer (Labconco®, USA), PVDF syringe membrane filter ขนาด 0.22 ไมโครเมตร, กระดาษกรองเบอร์ 4 และ software Chemdraw version 8.0

### วิธีวิเคราะห์

สารละลายตัวอย่าง เตรียมโดยซึ่งผงสารสกัดน้ำพลูควาด 500 มิลลิกรัม เติมน้ำเมทานอล 20 มิลลิลิตร นำไป reflux ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที กรองผ่านกระดาษกรองเบอร์ 4 จากนั้นปรับปริมาตรด้วยเมทานอลจนครบ 50 มิลลิลิตร กรองสารละลายที่ได้ผ่าน PVDF syringe membrane filter ขนาด 0.22 ไมโครเมตร

สารละลายมาตรฐาน เตรียม stock standard solution โดยซึ่ง quercitrin 20 มิลลิกรัม ละลายและปรับปริมาตรด้วยเมทานอลจนครบ 50 มิลลิลิตร แล้วเตรียม 6 ระดับความเข้มข้น เพื่อสร้างกราฟมาตรฐาน (calibration curve) โดย pipet stock standard solution จำนวน 1, 2, 3, 4, 5 และ 6 มิลลิลิตร ตามลำดับ เจือจางและปรับปริมาตรด้วยเมทานอลจนครบ 10 มิลลิลิตร กรองสารละลายที่ได้ผ่าน PVDF membrane filter ขนาด 0.22 ไมโครเมตร

ระบบโครมาโทกราฟี ภูมิภาคคงที่ คือ column ชนิด ZORBAX Extend-C18 Rapid Resolution HD ขนาด 2.1×50 มิลลิเมตร, ขนาดอนุภาค 1.8 ไมโครเมตร อนุภาค column เท่ากับ 30 องศาเซลเซียส

ภูมิภาคเคลื่อนที่ คือ ระบบ gradient ของ 0.2%v/v phosphoric acid ในน้ำ และเมทานอล ดังแสดงในตารางที่ 1 อัตราการไหลเท่ากับ 0.4 มิลลิลิตรต่อนาที ตรวจวัดด้วย DAD (diode array detector) ที่ความยาวคลื่น 350 นาโนเมตร

ตารางที่ 1 ระบบของภูมิภาคเคลื่อนที่แบบ gradient

Time (min)	0.2%v/v Phosphoric acid ในน้ำ (%)	Methanol (%)
0	75	25
0.5	60	40
3	55	45
4	75	25
6	75	25

วิธีวิเคราะห์นี้เป็นวิธีที่พัฒนาขึ้นในห้องปฏิบัติการ โดยก่อนการนำไปตรวจสอบความถูกต้องของวิธีได้ทำการตรวจสอบพารามิเตอร์ต่างๆ จากผลการวิเคราะห์โครมาโทแกรมของสารละลายตัวอย่างด้วยโปรแกรม control panel for OpenLAB software version 2.3 (Agilent Technologies®, Germany) พบว่าผ่านเกณฑ์ของวิธีวิเคราะห์ที่เหมาะสม<sup>(19)</sup> คือ resolution > 2, tailing factor < 2, theoretical plate number > 2000 และ symmetry factor < 1.5

#### การทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์

##### ความจำเพาะ (specificity)

วิเคราะห์สารละลายมาตรฐานและสารละลายตัวอย่างสารสกัดน้ำพลูควาดด้วยเครื่อง UHPLC รุ่น 1290 Infinity II แล้วเปรียบเทียบผลของ UV spectrum ที่ได้

##### ความเป็นเส้นตรง (linearity)

วิเคราะห์สารละลายมาตรฐาน 6 ระดับความเข้มข้นที่ 0.04, 0.08, 0.12, 0.16, 0.20 และ 0.24 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ความเข้มข้นละ 3 ครั้ง ทำซ้ำ 3 วัน

สร้างกราฟมาตรฐานของ quercitrin ระหว่างความเข้มข้น (แกน x) กับ peak area (แกน y) ของแต่ละวันของการวิเคราะห์ พิจารณาความเป็นเส้นตรงของช่วงที่ทำการทดสอบจากค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ

(coefficient of determination,  $r^2$ ) และ residual plot โดยเกณฑ์การยอมรับความเป็นเส้นตรง คือ  $r^2 > 0.999$  และ residual plot ที่ได้จากผลต่างของความเข้มข้นสังเกตและค่าความเข้มข้นประมาณ (y-residual) ของทุกระดับความเข้มข้นมีการกระจายตัวรอบๆ ค่าศูนย์<sup>(20)</sup>

##### ความแม่นยำ (accuracy)

unspiked sample คือ ตัวอย่างสารสกัดน้ำพลูควาดที่มีปริมาณ quercitrin น้อยที่สุดเมื่อเทียบกับตัวอย่างสารสกัดน้ำพลูควาดอื่นในการศึกษา

การหาความเข้มข้นของ quercitrin ใน unspiked sample ทำโดยเตรียมสารละลาย unspiked sample จำนวน 10 ซ้ำ แล้วนำไปวิเคราะห์ด้วย UHPLC ซ้ำละ 3 ครั้ง

การหาความเข้มข้นของ target value ทำโดยเตรียมสารละลายตัวอย่างสารสกัดน้ำพลูควาดที่ไม่ใช่ unspiked sample จำนวน 10 ซ้ำ นำไปวิเคราะห์ด้วย UHPLC ซ้ำละ 2 ครั้ง และคำนวณความเข้มข้นเฉลี่ย

การประมาณค่าความเข้มข้นของ spiked sample 3 ระดับความเข้มข้น (ต่ำ กลาง สูง) โดยคำนวณที่ร้อยละ 50, 100 และ 150 ของความเข้มข้น target value ได้ความเข้มข้นเท่ากับ 0.05, 0.08 และ 0.15 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

การวิเคราะห์ spiked sample ทั้ง 3 ระดับความเข้มข้น

ระดับความเข้มข้นต่ำ ทำโดยซิ่ง unspiked sample 500 มิลลิกรัม จำนวน 7 ซ้ำ เติมสารละลายมาตรฐาน quercitrin ความเข้มข้น 1.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 2 มิลลิลิตร

ระดับความเข้มข้นกลาง ทำโดยซิ่ง unspiked sample 500 มิลลิกรัม จำนวน 7 ซ้ำ เติมสารละลายมาตรฐาน quercitrin ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 2 มิลลิลิตร

ระดับความเข้มข้นสูง ทำโดยซิ่ง unspiked sample 500 มิลลิกรัม 7 ซ้ำ เติมสารละลายมาตรฐาน quercitrin ความเข้มข้น 3.6 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 2 มิลลิลิตร

จากนั้นเติมเมทานอล ปริมาตร 18 มิลลิลิตร ลงใน unspiked sample ที่เติมสารละลายมาตรฐานแต่ละระดับความเข้มข้นไว้แล้ว นำไป reflux ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที แล้วกรองผ่านกระดาษกรองเบอร์ 4 และปรับปริมาตรด้วยเมทานอลจนครบ 50 มิลลิลิตร ซึ่งจะได้ความเข้มข้นสุดท้ายของความเข้มข้นในระดับ ต่ำ กลาง สูง เท่ากับ 0.05, 0.08 และ 0.15 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ กรองสารละลายที่ได้ผ่าน PVDF syringe membrane filter ขนาด 0.22 ไมโครเมตร นำไปวิเคราะห์ด้วย UHPLC ซ้ำ 2 ครั้งต่อตัวอย่าง (duplicate)

คำนวณความเข้มข้นของ quercitrin จากกราฟมาตรฐาน และคำนวณร้อยละการคืนกลับ (%recovery) เกณฑ์การยอมรับความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ อยู่ในช่วงร้อยละ 95–105<sup>(20)</sup>

$$\frac{(C_1 - C_2)}{C_3} \times 100$$

$C_1$  คือ ความเข้มข้นที่วัดได้ของสารใน spiked sample

$C_2$  คือ ความเข้มข้นที่วัดได้ของสารใน unspiked sample

$C_3$  คือ ความเข้มข้นของ added analyte

### ความเที่ยง (precision)

repeatability วิเคราะห์สารละลายตัวอย่างสารสกัดน้ำพลูควาดที่เติมสารมาตรฐาน quercitrin 3 ระดับความเข้มข้น ซึ่งสารละลายที่นำไปวิเคราะห์มีความเข้มข้นสุดท้ายของ quercitrin เท่ากับ 0.05, 0.08 และ 0.15 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยสารละลายนี้เตรียมขึ้นในขั้นตอนของการทดสอบความแม่นยำ ระดับความเข้มข้นละ 7 ซ้ำ ฉีด UHPLC ซ้ำ 2 ครั้งต่อตัวอย่าง ทำการวิเคราะห์ภายในวันเดียวกันด้วยนักวิเคราะห์ 1 คน คำนวณร้อยละของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD)

intermediate precision วิเคราะห์สารละลายตัวอย่างสารสกัดน้ำพลูควาดที่เติมสารมาตรฐาน quercitrin 3 ระดับความเข้มข้น โดยสารละลายที่นำไปวิเคราะห์มีความเข้มข้นสุดท้ายของ quercitrin เท่ากับ 0.05, 0.08 และ 0.15 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ระดับความเข้มข้นละ 7 ซ้ำ ฉีด UHPLC ซ้ำละ 2 ครั้ง วิเคราะห์ด้วยนักวิเคราะห์ 2 คน ต่างวันกัน คำนวณร้อยละของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD)

ประเมินค่า Horwitz's equation และ HORRAT ของ repeatability และ intermediate precision เกณฑ์การยอมรับคือ HORRAT < 2<sup>(21)</sup>

### ขีดจำกัดการวัดเชิงปริมาณ (limit of quantitation, LOQ)

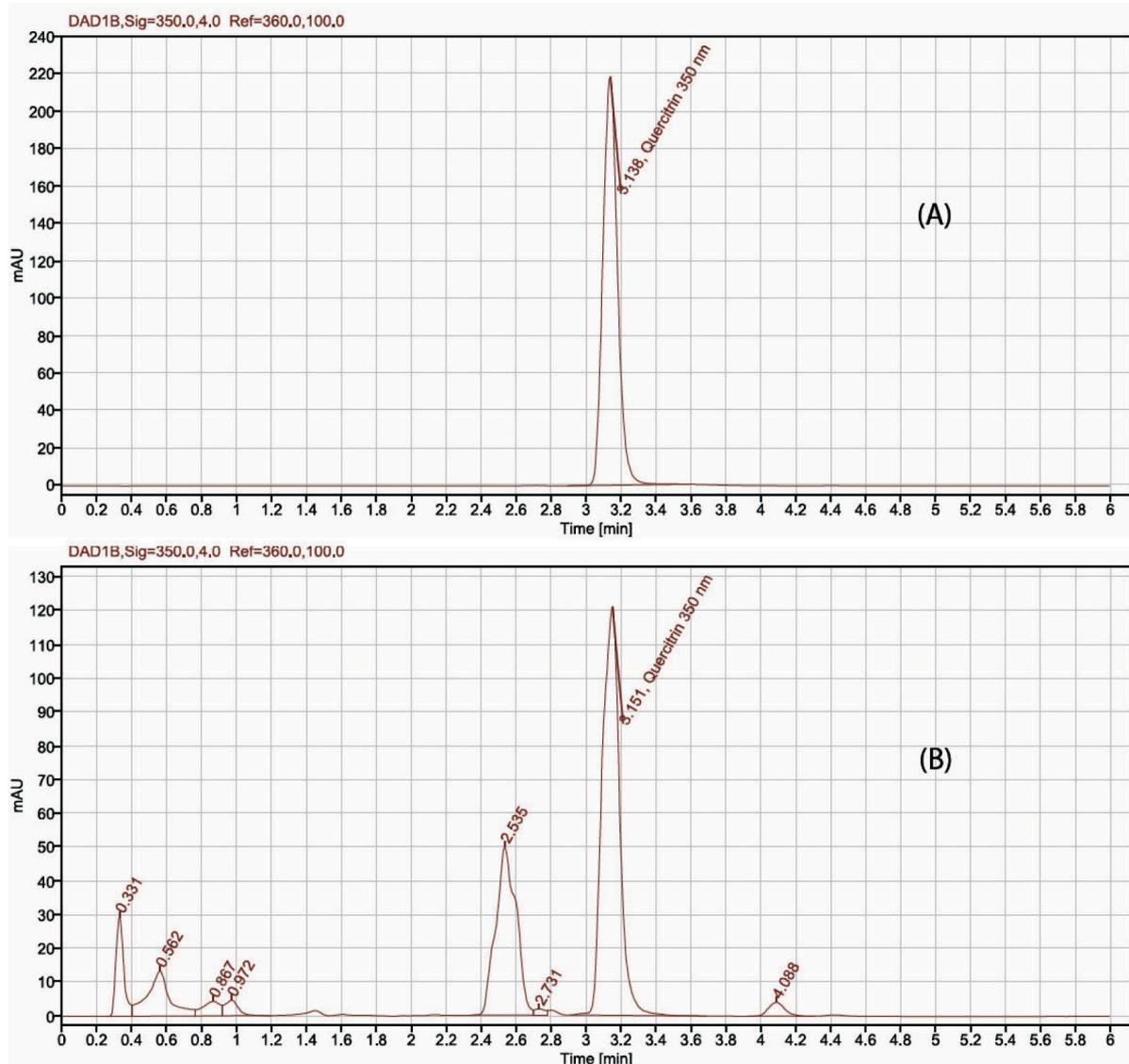
วิเคราะห์สารละลายตัวอย่างสารสกัดน้ำพลูควาดที่เติมสารมาตรฐาน quercitrin โดยที่ความเข้มข้นสุดท้ายมี quercitrin เท่ากับ 0.01 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จำนวน 10 ซ้ำ แล้ววิเคราะห์ด้วย UHPLC ซ้ำ 2 ครั้งต่อตัวอย่าง คำนวณความเข้มข้นของ quercitrin ในสารละลายตัวอย่างข้างต้น จากกราฟมาตรฐานยืนยัน LOQ ด้วยการประเมินค่าความแม่นยำจาก %recovery และประเมินค่าความเที่ยงด้วย %RSD

## ผล

## วิธีวิเคราะห์

ผลการวิเคราะห์สารละลายตัวอย่างสารสกัดพลูควา พบ quercitrin ที่ retention time เท่ากับ 3.151 นาที

โดย resolution, tailing factor, theoretical plate และ symmetry factor มีค่าเท่ากับ 2.7412, 1.0600, 5351 และ 1.1918 ตามลำดับ ซึ่งผ่านเกณฑ์ความเหมาะสมสำหรับวิธีวิเคราะห์ ดังแสดงในภาพที่ 3



ภาพที่ 3 โครมาโทแกรมของ (A) สารละลายมาตรฐาน quercitrin ความเข้มข้น 0.16 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ (B) สารละลายตัวอย่างสารสกัดน้ำพลูควา ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

## การทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์

## ความจำเพาะ (specificity)

เมื่อเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์ของสารละลายมาตรฐานและสารละลายสารสกัดน้ำพลูควา ดังแสดงใน

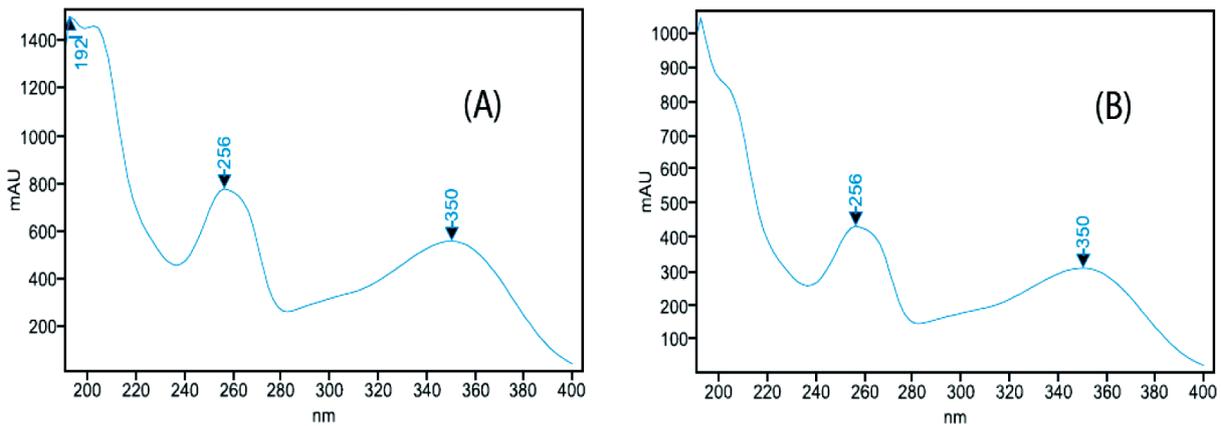
ภาพที่ 3 พบว่า retention time ของสารละลายมาตรฐาน quercitrin ปรากฏที่ 3.138 นาที และ quercitrin ในตัวอย่างสารละลายตัวอย่างสารสกัดน้ำพลูควา ปรากฏที่ 3.151 นาที และ ผลการวิเคราะห์ UV spectrum

ของ quercitrin peak ทั้งในสารละลายมาตรฐานและสารละลายตัวอย่างสารสกัดน้ำพุลูควา ดังแสดงในภาพที่ 4 พบว่าวิธีนี้เป็นวิธีที่มีความจำเพาะ

peak area (แกน y) พบว่ามีความเป็นเส้นตรงในช่วงความเข้มข้น 0.04–0.24 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยผลการวิเคราะห์ทั้ง 3 วัน มีค่าสัมประสิทธิ์การตัดล้นใจ ( $r^2$ ) เท่ากับ 0.99997 ดังแสดงในภาพที่ 5

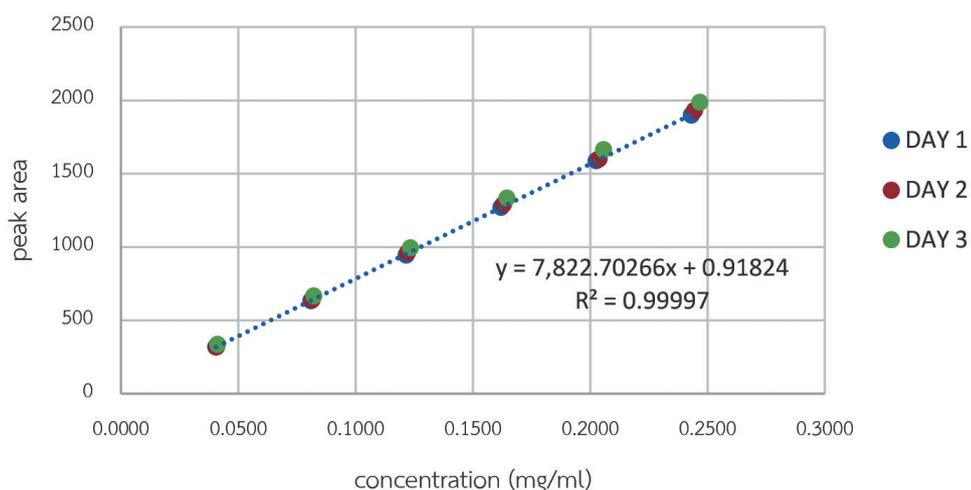
**ความเป็นเส้นตรง (linearity)**

เมื่อทำการวิเคราะห์สารละลายมาตรฐาน และสร้างกราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้น (แกน x) กับ



ภาพที่ 4 UV spectrum ของ quercitrin peak จากการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง UHPLC  
 (A) สารละลายมาตรฐาน quercitrin ความเข้มข้น 0.16 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ  
 (B) สารละลายตัวอย่างสารสกัดน้ำพุลูควา ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

**Calibration curve of quercitrin**



ภาพที่ 5 กราฟมาตรฐานของ quercitrin ที่ความเข้มข้น 0.04–0.24 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (n = 3)

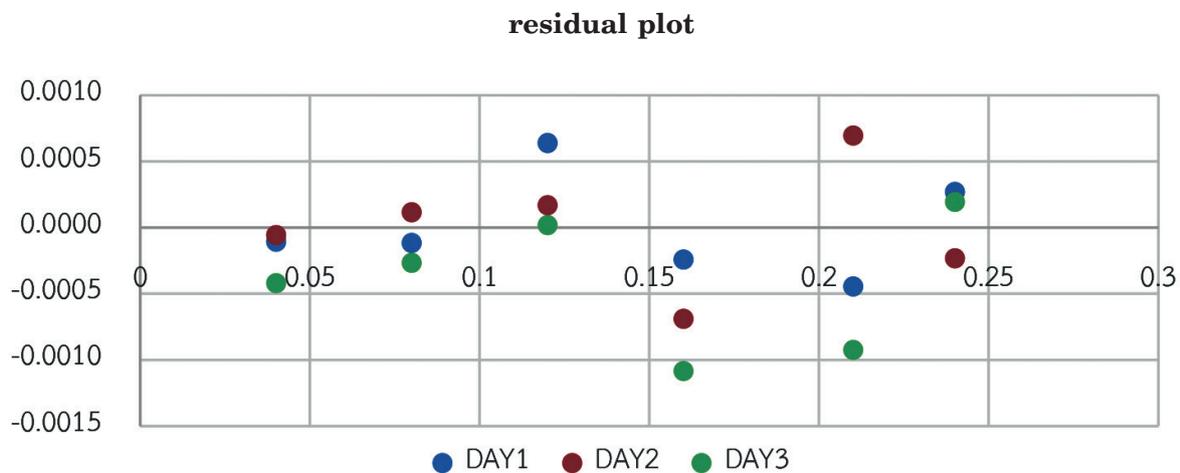
เมื่อวิเคราะห์ต่างวันกัน จำนวน 3 วัน พบว่า y-residual ของ quercitrin ที่ความเข้มข้นแต่ละระดับ มีการกระจายรอบๆ ค่าศูนย์ ดังแสดงในภาพที่ 6

#### ความแม่นยำ (accuracy)

ความเข้มข้นของ quercitrin ที่เติมลงใน unspiked sample ที่ค่าประมาณร้อยละ 50, 100 และ 150 ของ target value เท่ากับ 0.05, 0.08 และ 0.15

มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ โดยความเข้มข้นเฉลี่ยของ target value เมื่อวิเคราะห์สารละลายตัวอย่างสารสกัดน้ำพูลูควา จำนวน 10 ซ้ำ พบว่าเท่ากับ 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ผลการทดสอบความแม่นยำที่ 3 ระดับความเข้มข้น พบว่าร้อยละของการคืนกลับอยู่ในช่วงร้อยละ  $103.16 \pm 0.68$ ,  $100.58 \pm 0.51$  และ  $99.76 \pm 0.62$  ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 2



ภาพที่ 6 residual plot ของ quercitrin ที่ความเข้มข้น 0.04–0.24 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (n = 3)

#### ความเที่ยง (precision)

repeatability ผลการทดสอบความเที่ยงที่ 3 ระดับความเข้มข้น มีค่า %RSD เท่ากับ 0.61, 0.61 และ 0.60 ตามลำดับ และ HORRAT เท่ากับ 0.23, 0.24 และ 0.23 ตามลำดับ

intermediate precision ผลการทดสอบความเที่ยงที่ 3 ระดับความเข้มข้น มีค่า %RSD เท่ากับ 1.69, 2.63 และ 1.10 ตามลำดับ และ HORRAT

เท่ากับ 0.65, 1.01 และ 0.42 ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 2

#### ขีดจำกัดการวัดเชิงปริมาณ (limit of quantitation, LOQ)

การทดสอบขีดจำกัดการวัดเชิงปริมาณ พบว่า LOQ เท่ากับร้อยละ 0.1 โดยน้ำหนัก โดย %recovery เท่ากับร้อยละ  $100.18 \pm 1.24$  และ %RSD เท่ากับ 0.93

ตารางที่ 2 การทดสอบความแม่นยำ (accuracy) และความเที่ยง (precision) ของวิธีวิเคราะห์

Unspiked sample (%w/w)	Level/ Added analyte (%w/w)	Spiked sample (%w/w)	Accuracy* (n = 14)			Precision*					
			%Recovery	Mean±SD	Analyst 1	Analyst 2	%RSD	HORRAT	%RSD	HORRAT	
		0.5371	102.99		0.5371	0.5208					
		0.5355	102.64		0.5355	0.5203					
		0.5371	102.98		0.5371	0.5186					
	Low/0.4811	0.5375	103.07	103.16±0.68	0.5375	0.5222	0.61	0.23	1.69		0.65
		0.5358	102.71		0.5358	0.5229					
		0.5374	103.05		0.5374	0.5217					
		0.5451	104.65		0.5451	0.5227					
		0.8734	101.26		0.8734	0.8166					
		0.8650	100.23		0.8650	0.8173					
		0.8626	99.94		0.8626	0.8198					
0.0416	Mid/0.8214	0.8729	101.20	100.58±0.51	0.8729	0.8239	0.61	0.24	2.63		1.01
		0.8646	100.19		0.8646	0.8150					
		0.8692	100.75		0.8692	0.8248					
		0.8672	100.51		0.8672	0.8190					
		1.4997	99.78		1.4997	1.4743					
		1.5026	99.98		1.5026	1.4730					
		1.5066	100.25		1.5066	1.4712					
	High/1.4613	1.5129	100.68	99.76±0.62	1.5129	1.4738	0.60	0.23	1.10		0.42
		1.4924	99.28		1.4924	1.4851					
		1.4951	99.47		1.4951	1.4632					
		1.4861	98.85		1.4861	1.4630					

\*เกณฑ์การยอมรับ<sup>(21)</sup>: recovery = 95-105%; repeatability as %RSD < 2, HORRAT < 2; intermeditated precision as %RSD < 3, HORRAT < 4

## วิจารณ์

การวิเคราะห์ปริมาณ quercitrin ในสารสกัดน้ำพลูควาดด้วยวิธี UHPLC เป็นวิธีที่พัฒนาขึ้นในห้องปฏิบัติการเตรียมตัวอย่างสารละลายสารสกัดน้ำพลูควาดใช้วิธี reflux เนื่องจากเมื่อเปรียบเทียบการเตรียมด้วยการหมัก การ sonicate และการ reflux พบว่าการ reflux ทำให้ได้สารละลายตัวอย่างที่มีปริมาณ quercitrin มากที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับอีก 2 วิธี ที่กล่าวข้างต้น ตัวทำละลายที่ใช้ คือ เมทานอล เนื่องจากสาร quercitrin สามารถละลายในเมทานอลได้ดี เมื่อได้วิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาแล้วจำเป็นต้องมีการทดสอบความถูกต้องของวิธี เพื่อให้มั่นใจว่าผลวิเคราะห์ที่ได้จากวิธีที่พัฒนาขึ้นใหม่นี้มีความถูกต้องและน่าเชื่อถือ วิธีวิเคราะห์นี้ใช้วัฏภาคคงที่ คือ column ZORBAX Extend-C18 Rapid Resolution HD ขนาด 2.1×50 มิลลิเมตร ขนาดอนุภาค 1.8 ไมโครเมตร ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส วัฏภาคเคลื่อนที่ คือ 0.2%v/v phosphoric acid ในน้ำและเมทานอล ซึ่งใช้ระบบ gradient อัตราการไหลเท่ากับ 0.4 มิลลิลิตรต่อนาที ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 350 นาโนเมตร วิธีนี้เป็นวิธีที่มีระบบการแยกเหมาะสม เนื่องจาก resolution > 2, tailing factor < 2, theoretical plate number > 2000 และ symmetry factor < 1.5 ซึ่งผ่านเกณฑ์ตาม CDER<sup>(19)</sup> จากการทดสอบความถูกต้องของวิธีแสดงให้เห็นว่าเป็นวิธีที่สามารถนำมาใช้ได้ เนื่องจากมีความเป็นเส้นตรงในช่วงความเข้มข้น 0.04-0.24 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ค่าสัมประสิทธิ์การตัดลิ้นใจเท่ากับ 0.99997 ร้อยละการคืนกลับของการวิเคราะห์ quercitrin ที่ความเข้มข้น 3 ระดับของค่าเป้าหมายเท่ากับร้อยละ 103.16±0.68, 100.58±0.51 และ 99.76±0.62 ตามลำดับ และค่า HORRAT ของ repeatability และ intermediate precision น้อยกว่า 2 ซึ่งอยู่ในเกณฑ์การยอมรับตาม AOAC guideline<sup>(21)</sup> ขีดจำกัดในการตรวจวัดเชิงปริมาณของวิธีนี้เท่ากับร้อยละ 0.1 โดยน้ำหนัก นอกจากนี้วิธีวิเคราะห์นี้จะมีประสิทธิภาพแล้ว ยังสามารถเพิ่มประสิทธิผลในการปฏิบัติงานได้ เนื่องจากใช้ระยะเวลาการวิเคราะห์ต่อการฉีด 1 ครั้ง เท่ากับ 6 นาที ในขณะที่

การศึกษาคือใช้เวลาในการวิเคราะห์ด้วย HPLC ประมาณ 40-80 นาที<sup>(12,15)</sup> และใช้เวลาการวิเคราะห์ด้วย UPLC เท่ากับ 14 นาที<sup>(17)</sup> ซึ่งเป็นผลมาจากการปรับชนิดของวัฏภาคเคลื่อนที่ ระบบ gradient ชนิดของคอลัมน์ อุณหภูมิของคอลัมน์ และอัตราการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่ ทำให้สามารถวิเคราะห์จำนวนตัวอย่างได้มากขึ้น ในระยะเวลาที่เท่ากันและใช้สารเคมีในการวิเคราะห์น้อยลง ซึ่งเป็นข้อดีในการลดจำนวนของเสียเคมีที่จะออกสู่สิ่งแวดล้อมได้

## สรุป

วิธีการวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นนี้สามารถตรวจปริมาณ quercitrin ในสารสกัดน้ำพลูควาดได้อย่างถูกต้องเที่ยงตรง รวดเร็ว และมีประสิทธิภาพ ซึ่งมีประโยชน์ในการนำไปใช้ควบคุมคุณภาพของสารสกัดน้ำพลูควาดในเชิงพาณิชย์ได้

## กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ในการสนับสนุนครุภัณฑ์สำหรับการศึกษา และขอขอบคุณเจ้าหน้าที่สถาบันวิจัยสมุนไพรทุกท่านที่ให้ความช่วยเหลือในการทำงานวิจัยเป็นอย่างดี

## เอกสารอ้างอิง

1. Larsen K. Saururaceae. In: Flora of Thailand vol. 7 part 2. Bangkok: The Forest Herbarium, Royal Forest Department; 2000. p. 344-346.
2. สถาบันวิจัยสมุนไพร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์. สมุนไพรน้ำ 1: ผักคาวตอง ฉบับปรับปรุงเพิ่มเติม พ.ศ. 2553. กรุงเทพฯ: โรงพิมพ์สำนักงานพระพุทธศาสนาแห่งชาติ; 2553.
3. Li JJ, Chen GD, Fan HX, Hu D, Zhou ZQ, Lan KH, et al. Houttuynoid M, an anti-HSV active houttuynoid from *Houttuynia cordata* featuring a bis-houttuynin chain tethered to a flavonoid core. *J Nat Prod* 2017; 80(11): 3010-3.

4. Ling LJ, Lu Y, Zhang YY, Zhu HY, Tu P, Li H, et al. Flavonoids from *Houttuynia cordata* attenuate H1N1-induced acute lung injury in mice via inhibition of influenza virus and Toll-like receptor signalling. *Phytomedicine* 2020; 67: 153150.
5. Sekita Y, Murakami K, Yumoto H, Amoh T, Fujiwara N, Ogata S, et al. Preventive effects of *Houttuynia cordata* extract for oral infectious diseases. *Biomed Res Int* 2016; 2016: 2581876. (8 pages).
6. Garg CK, Sahu NP, Maiti MK, Shamna N, Deo AD, Sardar P. Dietary *Houttuynia cordata* leaf extract and meal enhances the immunity and expression of immune genes in *Labeo rohita* (Hamilton, 1822). *Aquac Res* 2021; 52(1): 381-94.
7. Gurung AB, Ali MA, Lee J, Farah MA, Al-Anazi KM, Al-Hemaid F. Identification of SARS-CoV-2 inhibitors from extracts of *Houttuynia cordata* Thunb. *Saudi J Biol Sci* 2021; 28(12): 7517-27.
8. Liu X, Cao K, Lv W, Liu J, Gao J, Wang Y, et al. Aqueous extract of *Houttuynia cordata* ameliorates aortic endothelial injury during hyperlipidemia via FoxO1 and p38 MAPK pathway. *J Funct Foods* 2019; 62: 103510. (8 pages).
9. Li J and Zhao F. Anti-inflammatory functions of *Houttuynia cordata* Thunb. and its compounds: a perspective on its potential role in rheumatoid arthritis (Review). *Exp Ther Med* 2015; 10: 3-6.
10. Woranam K, Senawong G, Utaiwat S, Yunchalard S, Sattayasai J, Senawong T. Anti-inflammatory activity of the dietary supplement *Houttuynia cordata* fermentation product in RAW264.7 cells and Wistar rats. *PLoS One* 2020; 15(3): e0230645. (18 pages).
11. Chang KW, Lin TY, Fu SL, Ping YH, Chen FP, Kung YY. A *Houttuynia cordata*-based Chinese herbal formula improved symptoms of allergic rhinitis during the COVID-19 pandemic. *J Chin Med Assoc* 2022; 85(6): 717-22.
12. Tian L, Shi X, Yu L, Zhu J, Ma R, Yang X. Chemical composition and hepatoprotective effects of polyphenol-rich extract from *Houttuynia cordata* tea. *J Agric Food Chem* 2012; 60(18): 4641-8.
13. Yan L, Wei X, Ji T, Hong LC, Yan YS, Guo ZG, et al. Development of a novel method combining multi-wavelength HPLC fingerprint and quantitative analysis of multi-component by single marker for quality control of *Houttuynia cordata*. *J. Chem Pharm Res* 2014; 6(8): 347-56.
14. Wei QU, Fei-Hua WU, Juan LI, Liang JY. Alkaloids from *Houttuynia cordata* and their antiplatelet aggregation activities. *Chin J Nat Med* 2011; 9(6): 425-8.
15. Yang ZN, Sun YM, Luo SQ, Chen JW, Yu ZW, Sun M. Quality evaluation of *Houttuynia cordata* Thunb. by high performance liquid chromatography with photodiode-array detection (HPLC-DAD). *Pak J Pharm Sci* 2014; 27(2): 223-31.
16. Chen J, Li G, Sun C, Peng F, Yu L, Chen Y, et al. Chemistry, pharmacokinetics, pharmacological activities, and toxicity of Quercitrin. *Phytother Res* 2022; 36(4): 1545-75.
17. Kim HS, Lee AY, Park JY, Jo JE, Moon BC, Chun JM, et al. Simultaneous determination of seven compounds in *Houttuynia cordata* using UPLC-PDA. *Nat Prod Res* 2012; 18(3): 158-65.

18. สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา. ตรวจสอบผลิตภัณฑ์. [ออนไลน์]. [เข้าถึงเมื่อ 3 มี.ค. 2566]. เข้าถึงได้จาก: URL: [https://porta.fda.moph.go.th/FDA\\_SEARCH\\_ALL/MAIN/SEARCH\\_CENTR\\_MAIN.aspx](https://porta.fda.moph.go.th/FDA_SEARCH_ALL/MAIN/SEARCH_CENTR_MAIN.aspx).
19. Center for Drug Evaluation and Research (CDER). Reviewer guidance validation of chromatographic methods. [online]. 1994; [cited 2023 Mar 14]; [33 screens]. Available from: URL: <https://www.fda.gov/media/75643/download>.
20. ทิพวรรณ นิ่งน้อย. แนวปฏิบัติการทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ทางเคมีโดยห้องปฏิบัติการเดียว. นนทบุรี: กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข; 2549.
21. AOAC guidelines for single laboratory validation of chemical methods for dietary supplements and botanicals [online]. 2002; [cited 2023 Mar 1]; [38 screens]. Available from: URL: <https://www.farmacia.ufmg.br/wp-content/uploads/2015/06/AOAC-Guidelines-for-Single-Laboratory.pdf>.

# Method Validation of Quercitrin Content in *Houttuynia cordata* Aqueous Extract Using Ultra High Performance Liquid Chromatography

Sununta Srisopon, Somchit Niumsakul, Sarawut Chankhotkaew, Sakwichai Ontong,  
Koravit Somkid, and Siriwan Chaisomboonpan

*Medicinal Plant Research Institute, Department of Medical Sciences, Nonthaburi 11000, Thailand.*

**ABSTRACT** Heartleaf (*Houttuynia cordata* Thunb.) is used for Thai traditional medicine and preparations registered by the Thai food and drug administration. It has been used for treating various symptoms such as fever, cough, and inflammation, and as diuretic. Additionally, it was reported as antiviral, antimicrobial, immune stimulant and anti-inflammatory. From Traditional Chinese Medicine, which heartleaf, as the main ingredient for allergic rhinitis during the COVID-19 pandemic, was reported. Phenolics were found as main compounds in this plant, of which quercitrin was reported as a major ingredient. Since the quality control of heartleaf aqueous extract has not been regulated, the objective of this study was to validate the method for analysis of the content of quercitrin in heartleaf aqueous extract Using Ultra High Performance Liquid Chromatography (UHPLC). The stationary phase was ZORBAX Extend-C18 Rapid Resolution HD 2.1x50 mm, 1.8  $\mu$ m at a temperature of 30 °C. The mobile phase was a mixture of 0.2%v/v phosphoric acid in water and methanol as a gradient system. The flow rate was 0.4 mL/min. It was detected using photodiode array detector at 350 nm. The sample solution was prepared by refluxing with methanol for 30 minutes. The results showed that this method was specific. Linearity was between 0.04–0.24 mg/ml with  $r^2 = 0.99997$ . The accuracy (% recovery) was 99.76–103.16%. The HORRAT of repeatability and intermediate precision was less than 2. Limit of quantitation (LOQ) was 0.1 %w/w. The developed method was accurate and precise. Therefore, it can be used for the determination of quercitrin content as the quality control method of single heartleaf aqueous extracts which are commercially available.

**Keywords:** Method validation, Quercitrin, Heartleaf aqueous extract, UHPLC