



Original Article

Development of an HPLC Method for Simultaneous Quantitation of Hyperin, Quercetin and Kaempferol in the *Semen cuscutae*

Do Thi Dinh³, Nguyen Thi Minh Diep¹, Tran Thi Van Anh¹, Ha Thanh Hoa¹,
Dao Viet Hung¹, Ngo Thi Xuan Thinh¹, Nguyen Thanh Hai², Pham Quoc Tuan^{1,*}

¹Phu Tho College of Medicine and Pharmacy, 2201 Hung Vuong, Gia Cam, Viet Tri, Phu Tho, Vietnam

²VNU University of Medicine and Pharmacy, 144 Xuan Thuy, Cau Giay, Hanoi, Vietnam

³Hai Duong Central College of Pharmacy, 324 Nguyen Luong Bang, Thanh Binh, Hai Duong, Vietnam

Received 15 October 2024

Revised 22 November 2024; Accepted 25 November 2024

Abstract: In this study, a method for the simultaneous quantification of hyperin, quercetin, and kaempferol in samples of *Semen cuscutae* was developed using high-performance liquid chromatography (HPLC). The chosen chromatographic conditions were a mobile phase of methanol – 0.1% formic acid in water, running in gradient mode, with a flow rate of 0.9 ml/min, and detection wavelengths of 354, 365, and 369 nm for hyperin, kaempferol, and quercetin, respectively. The results of the quantitative analysis of 5 samples of *Semen cuscutae* purchased from Phu Tho province showed hyperin content ranging from 0.950 to 1.218 mg/g; quercetin from 0.077 to 0.118 mg/g; and kaempferol from 1.051 to 1.190 mg/g based on the dry weight of the medicinal material. This research may be suitable for the quality control of *Semen cuscutae* in the market.

Keywords: *Semen Cuscutae*, Hyperin, Quercetin, Kaempferol, HPLC.

* Corresponding author.

E-mail address: phamquoctuan@duocphutho.edu.vn

<https://doi.org/10.25073/2588-1132/vnumps.4710>

Xây dựng phương pháp định lượng đồng thời hyperin, quercetin và kaempferol trong Thỏ ty tử bằng Sắc ký lỏng hiệu năng cao

Đỗ Thị Định³, Nguyễn Thị Minh Diệp¹, Trần Thị Vân Anh¹, Hà Thanh Hòa, Đào Việt Hưng¹, Ngô Thị Xuân Thịnh¹, Nguyễn Thanh Hải², Phạm Quốc Tuấn^{1,*}

¹Trường Cao đẳng Y Dược Phú Thọ, 2201 Hùng Vương, Gia Cẩm, Việt Trì, Phú Thọ, Việt Nam

²Trường Đại học Y Dược, Đại học Quốc gia Hà Nội, 144 Xuân Thủy, Cầu Giấy, Hà Nội, Việt Nam

³Trường Cao đẳng Dược Trung ương Hải Dương,
324 Nguyễn Lương Bằng, Thanh Bình, Hải Dương, Việt Nam

Nhận ngày 15 tháng 10 năm 2024

Chỉnh sửa ngày 22 tháng 11 năm 2024; Chấp nhận đăng ngày 25 tháng 11 năm 2024

Tóm tắt: Trong nghiên cứu này, phương pháp định lượng đồng thời hyperin, quercetin và kaempferol trong các mẫu Thỏ ty tử trên hệ thống sắc ký lỏng hiệu năng cao được xây dựng. Điều kiện sắc ký được lựa chọn: dung môi pha động methanol – dung dịch 0,1% acid formic, chạy theo chương trình gradient, tốc độ dòng 0,9 ml/phút, bước sóng phát hiện lần lượt là 354, 365 và 369 nm đối với hyperin, kaempferol và quercetin. Kết quả phân tích định lượng 5 mẫu Thỏ ty tử thu mua trên thị trường tỉnh Phú Thọ cho thấy hàm lượng hyperin từ 0,950 - 1,218 mg/g; quercetin từ 0,077 - 0,118 mg/g và kaempferol từ 1,051 - 1,190 mg/g tính theo khối lượng dược liệu khô kiệt. Nghiên cứu này có thể thích hợp cho công tác kiểm tra chất lượng dược liệu Thỏ ty tử trên thị trường.

Từ khóa: Thỏ ty tử, Hyperin, Quercetin, Kaempferol, Sắc ký lỏng hiệu năng cao.

1. Mở đầu

Theo các tài liệu đã công bố, chi *Cuscuta* L. (Tơ hồng) thuộc họ Bìm bìm (Convulvolaceae) trên thế giới có khoảng 171 loài, phân bố chủ yếu ở Bắc và Nam Mỹ, một vài loài ở châu Á và châu Âu [1]. Ở Việt Nam chi *Cuscuta* có 4 loài, bao gồm *C. chinensis* (Tơ hồng Trung Quốc), *C. australis* (Tơ hồng nam), *C. japonica* (Tơ hồng Nhật), *C. pentagona* (Tơ hồng năm góc) [2].

Thỏ ty tử (*Semen Cuscutae*) là vị thuốc cổ truyền, nguồn gốc của nó là hạt lấy từ quả chín đã phơi, sấy khô của Dây tơ hồng (loài *C. chinensis* hoặc *C. australis*) [3]. Ngoài ra, hạt

của loài *C. japonica* cũng được sử dụng làm thuốc, gọi là đại Thỏ ty tử [4], nhưng dược liệu này không có mặt trong chuyên luận Dược điển Việt Nam và Trung Quốc [3, 5]. Theo Y học cổ truyền, Thỏ ty tử dùng để chữa bệnh liệt dương, di tinh, đau lưng, mỏi gối, tai ù, mắt mờ, sốt khát nước, dùng lâu đẹp nhân sắc [4].

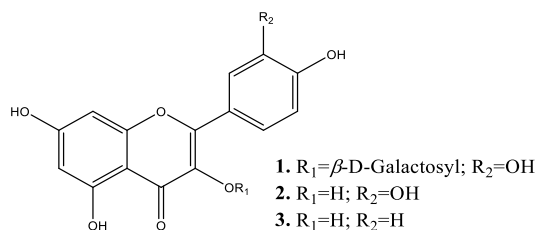
Các nghiên cứu đã công bố cho thấy thành phần hóa học của Thỏ ty tử gồm các nhóm chất chính như flavonoid, lignan, dẫn xuất của acid quinic,... [6-10]. Trong đó một số flavonoid như hyperin, quercetin,... có nhiều tác dụng sinh học hữu ích. Ở nghiên cứu trước, chúng tôi đã xây dựng được phương pháp định lượng flavonoid

* Tác giả liên hệ.

Địa chỉ email: phamquoctuan@duocphutho.edu.vn

<https://doi.org/10.25073/2588-1132/vnumps.4710>

toàn phần trong Thỏ ty tử tính theo hyperin [11]. Nghiên cứu này, chúng tôi xây dựng phương pháp định lượng đồng thời một số flavonoid chính trong Thỏ ty tử, gồm hyperin, kaempferol và quercetin bằng hệ thống sắc ký lỏng hiệu năng cao, sử dụng cột sắc ký Phenomenex C18 (250 × 4,6 mm, 5 μm) với đầu dò PDA.



Hình 1. Cấu trúc hóa học của 1-3.

2. Nguyên liệu, thiết bị và phương pháp nghiên cứu

2.1. Nguyên liệu, thiết bị

2.1.1. Đối tượng nghiên cứu

05 mẫu dược liệu nghiên cứu (SC1-SC5) được mua ở các địa điểm khác nhau trên địa bàn tỉnh Phú Thọ và được định tính theo Dược điển Việt Nam V chính xác là Thỏ ty tử (*Semen Cuscutae*). Mẫu sử dụng xây dựng phương pháp là mẫu SC1.

2.1.2. Hóa chất, dung môi và chất chuẩn

Các dung môi, hóa chất gồm: methanol (MeOH) được mua của hãng Merck KGaA (Đức), dùng cho HPLC; acid formic ($\geq 88,0\%$) được cung cấp bởi hãng Xilong Scientific (Trung Quốc). Chất chuẩn: hyperin (**1**) (98,0%) của hãng Chengdu Herbpurify (Trung Quốc); quercetin (**2**) (90,87%) của Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương; kaempferol (**3**) (98,0%) của hãng Biopurify (Trung Quốc).

2.1.3. Thiết bị

Hệ thống sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) CBM-20A detector, Diode Array SPD-M20A, Shimadzu (Nhật Bản); cột sắc ký Phenomenex C18 (250 × 4,6 mm, 5 μm); cân phân tích AUW220D (Shimadzu, Nhật Bản); bể chiết siêu âm D-78224 (Đức),...

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Khảo sát bước sóng tối ưu

Phổ UV-Vis của ba chất (**1-3**) được xác định và lựa chọn bước sóng cực đại (λ_{max}) để phân tích.

2.2.2. Khảo sát điều kiện sắc ký

Khảo sát về thành phần và tỷ lệ pha động [MeCN (A) : dung dịch acid formic trong nước 0,1% (B)] và tốc độ dòng để lựa chọn điều kiện sắc ký thích hợp.

2.2.3. Khảo sát phương pháp xử lý mẫu

Cân 1,0 được liệu, chiết siêu âm với hệ dung môi MeOH : H₂O với tỷ lệ, thời gian, nhiệt độ, số lần chiết khác nhau. Từ kết quả khảo sát, lựa chọn được điều kiện chiết xuất tối ưu cho cả 3 chất (**1-3**).

2.2.4. Chuẩn bị các dung dịch chuẩn và thử

Dung dịch chuẩn: hòa tan các chất chuẩn trong MeOH 75% để được dung dịch hỗn hợp các chất có nồng độ: chất **1**, **3** chính xác khoảng 2,5, 5,0 10, 25, 50, 75,0 μg/ml; chất **2** chính xác khoảng 1, 1,5, 2,0, 2,5, 5,0, 10,0 μg/ml.

Dung dịch thử: cân chính xác khoảng 1,0 g bột (mịn) dược liệu, chiết theo điều kiện tối ưu ở mục 2.2.3. Lọc qua màng lọc 0,45 μm trước khi chạy sắc ký.

Mẫu trắng: MeOH 75%.

2.2.5. Thẩm định phương pháp

Thẩm định phương pháp phân tích theo hướng dẫn của ICH, AOAC [7, 8].

2.2.6. Xử lý số liệu thống kê

Mỗi mẫu nghiên cứu được làm lặp lại 3 lần. Kết quả được xử lý thống kê bằng phần mềm Microsoft Excel 2019.

3. Kết quả nghiên cứu

3.1. Lựa chọn điều kiện sắc ký

3.1.1. Lựa chọn bước sóng phát hiện

Quét phổ UV của từng dung dịch chuẩn hyperin (**1**), quercetin (**2**) và kaempferol (**3**) ở dải bước sóng tử ngoại. Kết quả phổ UV có cực đại

hấp thụ ở các bước sóng: 354 nm đối với chất **1**; 369 nm với chất **2**; và 365 nm với chất **3**. Để tránh sai số của phương pháp, lựa chọn các bước sóng trên để phân tích đồng thời các chất trên trong Thô ty tử.

3.1.2. Kết quả lựa lựa chọn pha động, tốc độ dòng, nhiệt độ cột, thể tích tiêm mẫu

Khảo sát và lựa chọn được điều kiện sắc ký tối ưu như sau:

- Cột sắc ký phenomenex C18 (250 × 4,6 mm, 5 μm);

- Pha động: MeOH (A): dung dịch acid formic trong nước 0,1% chạy theo chế độ gradient: 0-15 min: 15 → 20% (A), 75→80% (B); (15-30 min): 20-50% (A), 80-50% (B); (30-50 min): 50% A, 50% B.

- Tốc độ dòng: 0,9 ml/min;

- Nhiệt độ cột: 30 °C;

- Thể tích tiêm mẫu: 10μl;

- Bước sóng hấp thụ của **1**, **2**, **3** lần lượt tại: 354, 369, 365 nm.

Trên sắc ký đồ ở điều kiện phân tích lựa chọn cho thấy các chất **1-3** tách khỏi nhau và tách khỏi các chất trong dược liệu. Mặt khác, các pic **1-3** cân đối, gọn, thời gian lưu (t_R) lần lượt là khoảng 18,8, 27,7 và 30,6 min (Hình 2). Điều này là phù hợp cho phương pháp phân tích.

3.2. Kết quả khảo sát xử lý mẫu

3.2.1. Khảo sát ảnh hưởng của nồng độ dung môi đối với hiệu suất chiết

Cân chính xác khoảng 1,0 g bột dược liệu, cho vào bình nón có nút mài, thêm chính xác 50 ml các dung môi MeOH 100%, 75%, 50%, 25%. Cân bình nón. Chiết siêu âm ở nhiệt độ 55 °C/60 min. Lọc, cân lại bình nón và bổ sung dung môi bốc hơi. Kết quả, với MeOH 75% cho Spic của hyperin (**1**) cao nhất. Tuy nhiên đối với quercetin (**2**), kaempferol (**3**) cho Spic tăng dần, cao nhất ở MeOH 100%. Chúng tôi lựa chọn 2 nồng độ MeOH 75%, 100% nghiên cứu tiếp.

3.2.2. Khảo sát ảnh hưởng của thời gian chiết đối với hiệu suất chiết

Chiết xuất như mục 3.2.1 với dung môi là MeOH 75%, 100%, thời gian chiết là 45, 60, 90,

120 min. Ở cả 2 nồng độ, Spic của cả 3 chất tăng dần từ thời điểm 45 đến 90 min. Ở thời điểm 120 min, Spic của cả 3 chất đều không tăng có ý nghĩa thống kê so với thời điểm 90 min. Mặt khác, tại thời điểm 90 min, Spic của chất **2-3** khi chiết bằng MeOH 75% và 100% là như nhau có ý nghĩa thống kê. Do đó điều kiện chiết xuất: dung môi là MeOH 75%, thời gian chiết 90 min được lựa chọn cho các khảo sát tiếp theo.

3.2.3. Khảo sát ảnh hưởng của nhiệt độ chiết đối với hiệu suất chiết

Chiết xuất như mục 3.2.1 với dung môi là MeOH 75%, thời gian chiết: 90 min, nhiệt độ chiết: 45, 50, 55, 60 °C. Kết quả, khi nhiệt độ chiết tăng từ 45-55 °C thì Spic của cả 3 chất đều tăng, tuy nhiên đến nhiệt độ 60 °C thì Spic của cả 3 chất không lớn hơn có ý nghĩa thống kê với điều kiện nhiệt độ 55 °C.

3.2.4. Khảo sát ảnh hưởng của số lần chiết đối với hiệu suất chiết

- Chiết 1 lần: chiết xuất dược liệu như mục 3.2.3, lọc, rửa bã dược liệu bằng MeOH 75% 3 lần, mỗi lần 10 ml. Gộp các dịch lọc, cô quay chân không thu được cặn. Hòa tan cặn với MeOH 75% đến vạch 50 ml trong bình định mức, thu được dịch chiết lần 1.

- Chiết lần 2 lần: Chiết lần 1, được dịch lọc lần 1. Bã dược liệu tiếp tục chiết như chiết lần 1, rửa bã, được dịch lọc lần 2. Gộp hai dịch lọc, cô và hòa tan cặn trong MeOH 75% đến vạch 50 ml được dịch chiết lần 2.

Tương tự thu được dịch chiết lần 3, 4.

Song song, khảo sát ảnh hưởng của quá trình cô đến hàm lượng của 3 chất bằng cách chia dịch chiết lần 1 thành 2 phần, một phần cô cách thủy, sau đó hòa tan cặn trong MeOH 75% đến thể tích ban đầu, phần còn lại làm mẫu so sánh.

Tiến hành chạy sắc ký, đo Spic của các dịch chiết lần 1 đến lần 4. Kết quả, Spic của chất **1-2** sau lần chiết 2 thì không tăng nữa ($p>0,05$); chất **3** sau lần chiết 3 thì Spic cũng không tăng ($p>0,05$). Mặt khác, Spic của phần cô cách thủy không có sự thay đổi có ý nghĩa thống kê so với mẫu so sánh (không cô).

Qua quá trình khảo sát xử lý mẫu, điều kiện chiết xuất được lựa chọn như sau:

- Dung môi chiết: MeOH 75%;
- Thời gian chiết: 90 min;
- Nhiệt độ chiết: 55 °C;
- Số lần chiết: 3 lần.

3.3. Thẩm định phương pháp định lượng

3.3.1. Tính thích hợp của hệ thống

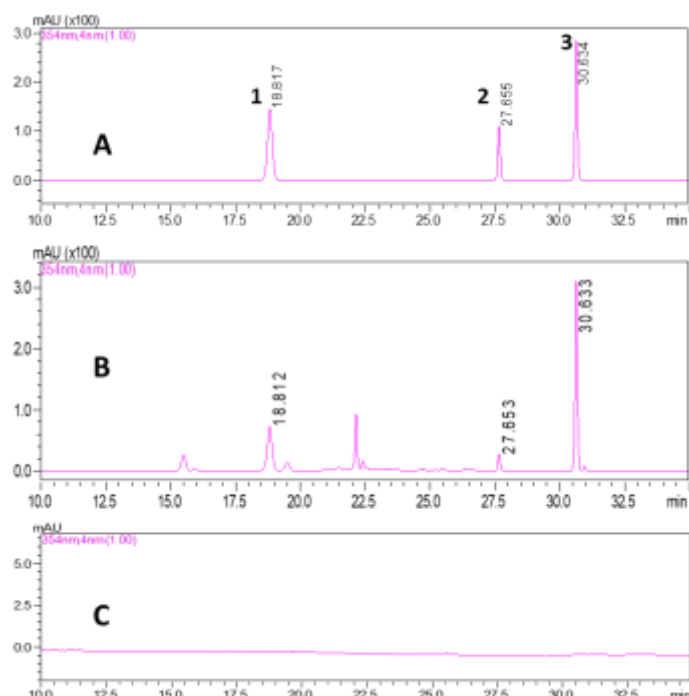
Tiêm lặp lại 6 lần mỗi lần 10 µl dung dịch hỗn hợp chất chuẩn (10 µg/ml đối với các chất 1,

3; 5 µg/ml đối với chất 2) và chạy sắc ký theo điều kiện đã khảo sát ở mục 3.1.2. Kết quả thực nghiệm thu được ở Bảng 1.

Số liệu phân tích thống kê ở Bảng 1 cho thấy độ lệch chuẩn tương đối (RSD) của t_R và S_{pic} đối với các chất 1-3 nhỏ hơn < 2%. Mặt khác, trên sắc ký đồ (Hình 2A) độ phân giải (R_s) của pic của các chất 1-3 đối với các pic gần nhất bên cạnh $\geq 1,8$. Do đó, hệ thống sắc ký có tính tương thích phù hợp định lượng đồng thời ba chất 1 - 3.

Bảng 1. Kết quả khảo sát tính thích hợp hệ thống

Số lần phân tích	Hyperin (1)		Quercetin (2)		Kaempferol (2)	
	t_R (min)	S_{pic} (mAU.s)	t_R (min)	S_{pic} (mAU.s)	t_R (min)	S_{pic} (mAU.s)
1	18,834	228963	27,656	271380	30,672	431579
2	18,824	227789	27,700	270072	30,631	440034
3	18,856	228841	27,678	270962	30,701	437192
4	18,872	228647	27,693	270931	30,617	438310
5	18,843	229361	27,632	269931	30,607	436172
6	17,993	228392	27,612	269832	30,662	441926
Trung bình (TB) \pm SD	18,70 \pm 0,35	228666 \pm 538	27,66 \pm 0,03	270518 \pm 652	30,65 \pm 0,04	437536 \pm 3566
RSD (%)	1,86	0,24	0,13	0,24	0,12	0,82

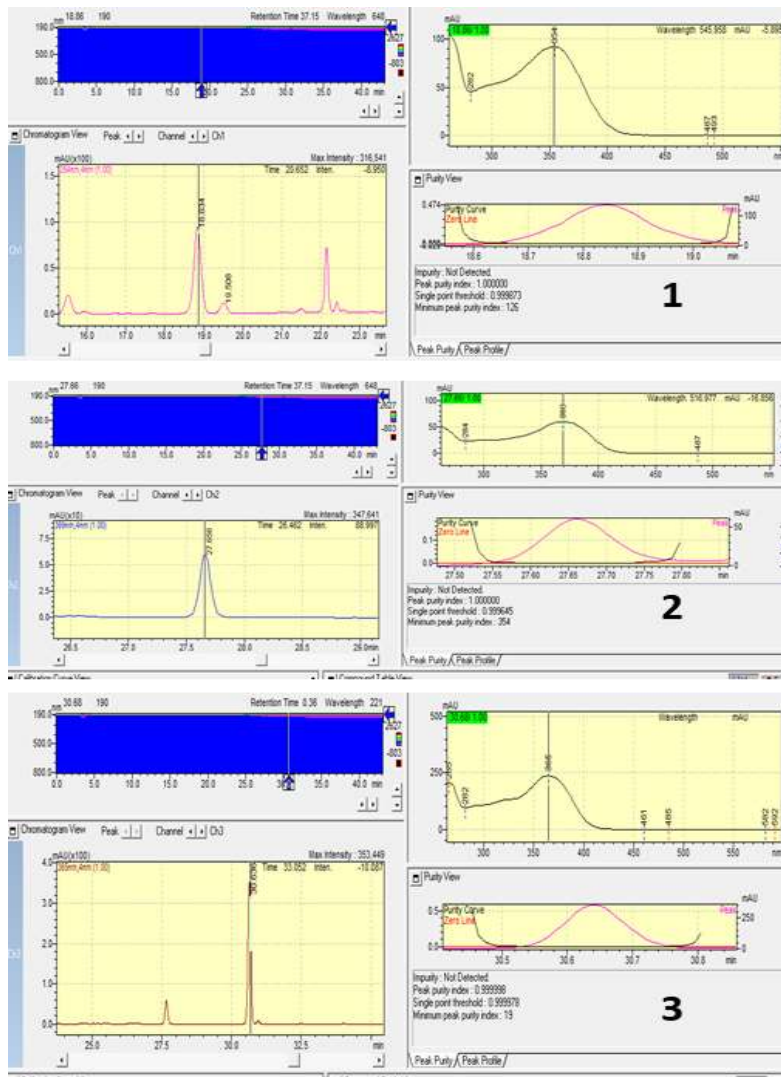


Hình 2. Sắc ký đồ HPLC của dung dịch hỗn hợp chất chuẩn (A), dung dịch thử (B), mẫu trắng (C).

3.3.2. Độ đặc hiệu của phương pháp

Kết quả khảo sát thu được sắc ký đồ ở Hình 2 cho thấy: mẫu trắng không có pic tạp tại thời gian lưu của các chất **1-3**; hình dạng phổ UV tương đồng của pic chất **1-3** trên sắc ký đồ của

dung dịch chuẩn, dung dịch thử. Độ tinh khiết của các pic dung dịch chuẩn, dung dịch thử bằng 100% (Hình 3). Từ đó có thể kết luận rằng phương pháp xây dựng có độ đặc hiệu và chọn lọc cao, thích hợp để định lượng đồng thời các chất **1-3** trong Thỏ ty tử.



Hình 3. Độ tinh khiết của các pic chất **1-3**.

3.3.3. Khoảng tuyến tính, giới hạn phát hiện, giới hạn định lượng

Tiến hành sắc ký 6 dung dịch hỗn hợp chất chuẩn **1-3** đã chuẩn bị ở mục 2.2.4 theo điều kiện lựa chọn ở trên. Từ kết quả thí nghiệm và xử lý số liệu thống kê ở Bảng 2 cho thấy trong khoảng

nồng độ khảo sát của chất **1** và **2** có sự tuyến tính giữa S_{pic} và nồng độ, với hệ số tương quan chặt (R^2 của ba chất đều $\geq 0,9981$).

LOD, LOQ của chất **1** được xác định lần lượt là 0,02 và 0,07 $\mu\text{g/ml}$; đối với chất **2** là 0,04 và 0,14 $\mu\text{g/ml}$; đối với chất **3** là 0,01 và 0,04 $\mu\text{g/ml}$.

Bảng 2. Kết quả phương trình tuyến tính, LOD, LOQ của 1-3

STT	Hyperin (1)		Quercetin (2)		Kaempferol (3)	
	Nồng độ (µg/ml)	S _{pic} (mAu.s)	Nồng độ (µg/ml)	S _{pic} (mAu.s)	Nồng độ (µg/ml)	S _{pic} (mAu.s)
1	2,5	70045	1,0	52768	2,5	174944
2	5,0	129369	1,5	76754	5,0	309349
3	10,0	228963	2,0	102390	10,0	436579
4	25,0	480880	2,5	129610	25,0	1020579
5	50,0	919979	5,0	269020	50,0	1983736
6	75,0	1284895	10,0	542759	75,0	3076424
Phương trình hồi quy	16780 X + 50579		54766 X - 5257,9		39551 X + 62796	
Hệ số tương quan (R ²)	0,9981		0,9999		0,9986	
LOD (µg/ml)	0,02		0,04		0,01	
LOQ (µg/ml)	0,07		0,14		0,04	

3.3.4. Độ lặp lại và độ chính xác trung gian

Phân tích mẫu Thỏ ty tử (SC1) theo điều kiện xử lý mẫu và phân tích đã xây dựng; thực hiện trong ngày và ngày kế tiếp mỗi ngày 06 mẫu, khác người thực hiện. Độ lặp lại được xác định dựa vào kết quả đánh giá ngày thử nghiệm thứ nhất, độ chính xác trung gian dựa vào kết quả

thực hiện ngày kế tiếp. Kết quả thu được thể hiện ở Bảng 3.

Độ lệch chuẩn tương đối (RSD) của kết quả phân tích Thỏ ty tử ở điều kiện trong ngày, khác ngày, trong ngày và khác ngày (n=12) đối với chất 1, 3 < 3,7%; chất 2 < 5,3%, đáp ứng được giới hạn theo quy định của AOAC [8].

Bảng 3. Kết quả xác định độ lặp lại và độ chính xác trung gian

Số TT	Hàm lượng phân tích trong ngày (mg/g)			Hàm lượng phân tích khác ngày (mg/g)		
	Hyperin (1)	Quercetin (2)	Kaempferol (3)	Hyperin (1)	Quercetin (2)	Kaempferol (3)
1	0,887	0,074	0,964	0,88	0,073	0,97
2	0,893	0,070	0,978	0,892	0,068	0,988
3	0,914	0,060	0,976	0,901	0,07	0,967
4	0,858	0,069	0,964	0,84	0,069	0,961
5	0,908	0,072	0,973	0,911	0,072	0,977
6	0,886	0,065	0,945	0,875	0,065	0,958
$\bar{M} \pm SD$ (mg/g)	0,891±0,020	0,0687±0,03	0,9667±0,012	0,883±0,025	0,070±0,003	0,969±0,011
RSD (%)	2,22	3,87	1,26	2,82	4,16	1,14
Hyperin (1): \bar{M} = 0,887 mg/g, RSD= 2,46%; Quercetin (2): \bar{M} = 0,069 mg/g, RSD= 3,87%; Kaempferol (3): \bar{M} = 0,968 mg/g, RSD= 1,16% (n=12).						

3.3.5. Độ đúng

Hiệu suất thu hồi được xác định bằng phương pháp thêm chuẩn vào mẫu thử với 3 mức nồng độ khoảng 50%, 100%, 150% so với nồng độ các chất 1-3 trong mẫu thử. Kết quả chỉ ra

rằng hiệu suất thu hồi trung bình của cả 3 chất ở 3 mức nồng độ thêm vào khác nhau đều nằm trong khoảng 95,0-105,0%. Do đó, phương pháp có độ đúng đạt yêu cầu theo quy định của AOAC về hiệu suất thu hồi [8].

Bảng 4. Kết quả đánh giá hiệu suất thu hồi

Số TT	Hyperin (1)			Quercetin (2)			Kaempferol (2)		
	Hàm lượng thêm vào ($\mu\text{g/ml}$)	Hàm lượng tìm thấy ($\mu\text{g/ml}$)	Hiệu suất thu hồi (%)	Hàm lượng thêm vào ($\mu\text{g/ml}$)	Hàm lượng tìm thấy ($\mu\text{g/ml}$)	Hiệu suất thu hồi (%)	Hàm lượng thêm vào ($\mu\text{g/ml}$)	Hàm lượng tìm thấy ($\mu\text{g/ml}$)	Hiệu suất thu hồi (%)
1	0	17,04	-	0	1,37	-	0	18,81	-
2	8	25,29	103,16	0,75	2,10	96,96	8	26,87	100,77
	8	25,05	100,06	0,75	2,09	96,15	8	26,96	101,94
	8	24,81	97,07	0,75	2,14	102,33	8	26,35	94,29
	Hiệu suất thu hồi trung bình: 100,09%; RSD: 3,02%			Hiệu suất thu hồi trung bình: 98,48%; RSD: 3,41%			Hiệu suất thu hồi trung bình: 99,00%; RSD: 4,16%		
3	16	33,75	104,45	1,5	2,84	98,14	16	34,31	96,85
	16	33,42	102,37	1,5	2,84	98,30	16	34,64	98,91
	16	33,97	105,79	1,5	2,83	97,19	16	35,32	103,22
	Hiệu suất thu hồi trung bình: 104,21%; RSD: 1,65%			Hiệu suất thu hồi trung bình: 97,88%; RSD: 0,61%			Hiệu suất thu hồi trung bình: 99,66%; RSD: 3,26%		
4	24	40,41	97,39	2,25	3,74	105,50	24	43,60	103,29
	24	41,07	100,12	2,25	3,59	98,71	24	43,55	103,10
	24	40,92	99,50	2,25	3,57	97,74	24	43,67	1,035971
Hiệu suất thu hồi trung bình: 99,00%; RSD: 1,44%			Hiệu suất thu hồi trung bình: 100,70%; RSD: 4,20%			Hiệu suất thu hồi trung bình: 102,63%; RSD: 1,39%			

3.4. Định lượng một số mẫu Thỏ ty tử thu mua trên thị trường tỉnh Phú Thọ

Các mẫu Thỏ ty tử thu mua trên thị trường tỉnh Phú Thọ được xác định hàm lượng các chất

1-3 theo quy trình phân tích đã xây dựng và thẩm định ở trên. Kết quả nghiên cứu được trình bày ở ở Bảng 5.

Bảng 5. Kết quả định lượng các chất 1-3 trong các mẫu Thỏ ty tử

Số TT	Mẫu dược liệu	Độ ẩm (%)	Hàm lượng tính theo khối lượng dược liệu sấy khô (TB \pm SD, mg/g)		
			Hyperin (1)	Quercetin (2)	Kaempferol (3)
1	SC1	8,93	0,950 \pm 0,011	0,077 \pm 0,001	1,070 \pm 0,009
2	SC2	8,48	1,057 \pm 0,017	0,087 \pm 0,001	1,190 \pm 0,008
3	SC3	9,06	1,150 \pm 0,009	0,109 \pm 0,004	1,051 \pm 0,004
4	SC4	8,46	1,173 \pm 0,019	0,118 \pm 0,005	1,160 \pm 0,006
5	SC5	8,75	1,218 \pm 0,020	0,086 \pm 0,001	1,188 \pm 0,006

4. Bàn luận

Dữ liệu ở Bảng 5 cho thấy hàm lượng quercetin (2) thấp nhất trong 3 chất (0,077 - 0,118 mg/g); hàm lượng hyperin (1) và kaempferol (3) gần tương đương nhau, và 4/5

mẫu dược liệu thu mua trên thị trường tỉnh Phú Thọ đạt yêu cầu về hàm lượng hyperin theo ĐDVN V (hyperin không ít hơn 0,1%) [3].

Phương pháp định lượng đồng thời 3 chất (1-3) cho thời gian lưu ngắn, độ đặc hiệu cao, hệ số phân giải của các pic >1,5, đáp ứng yêu cầu định

lượng hyperin của chuyên luận Thổ ty tử trong ĐĐVN V [3]. Mặt khác, hệ dung môi pha động là MeOH: dung dịch acid formic 0,1% rẽ tiền, ít ảnh hưởng đến cột, dễ triển khai áp dụng so với phương pháp định lượng hyperin trong Thổ ty tử của ChP 2020 sử dụng hệ dung môi là dung dịch acid phosphoric 0, 1% - acetonitril [5]. Ngoài ra, việc xử lý mẫu bằng phương pháp chiết siêu âm khá đơn giản, thuận tiện khi áp dụng vào thực tiễn so với một số nghiên cứu sử dụng phương pháp chiết hồi lưu [3, 12].

Trên thế giới có nhiều công trình nghiên cứu định lượng đồng thời hyperin và các flavonoid khác trong Thổ ty tử. Theo nghiên cứu của S. Ang et al., hàm lượng hyperin, quercetin trong *C. chinensis* lần lượt là 0,284% và 0,09%, hàm lượng hyperin của các mẫu nghiên cứu đều thấp hơn nhiều mẫu nghiên cứu của Trung Quốc [12]. Nghiên cứu của X.H. He et al., so sánh thành phần hóa học 2 lô *C. australis* và 8 lô *C. chinensis* bằng phương pháp HPLC-DA-MS chỉ ra flavonoid chính trong *C. chinensis* là hyperin, trong khi đó *C. australis* chiếm ưu thế là kaempferol và astragalín. Tiếp tục khảo sát hàm lượng của 6 flavonoid (dẫn xuất quercetin: hyperin; quercetin-3-*O*-galactosid-7-*O*-glucosid, quercetin-3-*O*-apiosyl-(1 →2)-galactosid; isorhamnetin-3-*O*-glucosid; kaempferol và dẫn xuất: astragalín) trên 27 mẫu Thổ ty tử (gồm loài *C. chinensis*, *C. australis* và hỗn hợp 2 loài) bằng HPLC-UV, thấy rằng flavonoid chính trong 2 loài Thổ ty tử này có sự khác nhau có ý nghĩa, đó là *C. chinensis* không chứa kaempferol, astragalín. Hàm lượng trung bình của hyperin trong *C. chinensis* là 0,18%; hàm lượng trung bình của hyperin, astragalín, kaempferol trong *C. australis*, hỗn hợp *C. australis* và *C. chinensis* lần lượt là 0,25%, 0,19%, 0,43%; 0,17%, 0,19%, 0,40% [6].

M. Ye et al., xác định flavonoid trong 40 mẫu Thổ ty tử bằng phương pháp RP-HPLC, kết quả cho biết hàm lượng các flavonoid phụ thuộc vào nơi thu mẫu và loài. Nhìn chung, loài *C. australis* có chứa quercetin, hyperin và kaempferol, trong khi đó loài *C. chinensis* chứa rất ít hoặc không phát hiện kaempferol [13].

Công trình nghiên cứu của chúng tôi thấy rằng hàm lượng kaempferol khá cao, tương đương với hàm lượng hyperin, do vậy gợi ý rằng tất cả các mẫu nghiên cứu của chúng tôi có thể là loài *C. australis*.

Từ những kết quả nghiên cứu của công trình này và các nghiên cứu đã công bố, là cơ sở khoa học để xác định nguồn gốc loài của Thổ ty tử trên thị trường dựa trên hàm lượng một số flavonoid chính, trong đó có hyperin, quercetin và đặc biệt là kaempferol. Nó cũng là cơ sở thực tiễn góp phần nâng cấp tiêu chuẩn Thổ ty tử phục vụ cho kiểm tra chất lượng dược liệu được tốt hơn.

5. Kết luận

Nghiên cứu này đã xây dựng được phương pháp định lượng đồng thời ba flavonoid chính trong Thổ ty tử là hyperin (1), quercetin (2) và kaempferol (3). Phương pháp có khoảng tuyến tính tốt, độ lặp lại, độ đúng và độ chính xác cao đáp ứng yêu cầu của ICH và AOAC. Đã áp dụng phương pháp xây dựng được để xác định hàm lượng một số flavonoid chính trong dược liệu Thổ ty tử thu mua trên địa bàn tỉnh Phú Thọ. Kết quả phân tích 5 mẫu cho hàm lượng hyperin từ 0,950 – 1,218 mg/g; quercetin từ 0,077 - 0,118 mg/g và kaempferol từ 1,051 – 1,190 mg/g tính theo khối lượng dược liệu khô kiệt.

Tài liệu tham khảo

- [1] Z. Y. Wu, P. H. Raven, Flora of China, Missouri Botanical Garden Press, Vol. 16, 1995.
- [2] H. H. Pham, Flora of Vietnam, Ho Chi Minh City: Tre Publishing House, Vol. 2, 2003 (in Vietnamese).
- [3] Vietnamese Ministry of Health, Vietnam, Pharmacopoeia V, Hanoi: Medical Publishing House, Vol. 2, 2017 (in Vietnamese).
- [4] T. L. Do, the Medicinal Plants and Drugs in Vietnam, Hanoi: Medical Publishing House, 2004 (in Vietnamese).
- [5] Chinese Pharmacopoeia Commission, Pharmacopoeia of the People's Republic of China, China Medical Science Press, Vol. 1A, 2020.

- [6] X. He, W. Yang, M. Ye, Q. Wang, D. Guo, Differentiation of *Cuscuta chinensis* and *Cuscuta Australis* by HPLC-DAD-MS Analysis and HPLC-UV Quantitation, *Planta Medica*, Vol. 77, No. 17, 2011, pp. 1950 -1957.
- [7] M. Ye, Y. Yan, L. Qiao, X. Ni, Studies on Chemical Constituents of *Cuscuta Chinensis*, *China Journal of Chinese Materia Medica*, Vol. 27, No. 2, 2002, pp. 115-117.
- [8] X. H. He, W. Z. Yang, A. H. Meng, W. N. He, D. A. Guo, M. Ye, Two New Lignan Glycosides from the Seeds of *Cuscuta chinensis*, *Journal of Asian Natural Products Research*, Vol. 12, No. 11, 2010, pp. 934-939.
- [9] Y. Kwon, B. Chang, C. Kim, Antioxidative Constituents from the Seeds of *Cuscuta Chinensis*, *Natural Product Sciences*, Vo. 6, 2000, pp. 135-138.
- [10] W. Li, Y. Zhang, J. Bai, Z. Xiang, J. Ding, Y. Ji, Identification of Chemical Constituents in *Cuscuta Chinensis* Using HPLC-ESI/Q-TOF MS/MS, *BioTechnology An Indian Journal*, Vol. 8, No. 4, 2013, pp. 563-567.
- [11] Q. T. Nguyen, V.H. Dao, T. X. T. Ngo, T. M. D. Nguyen, Q. T. Pham, Quantitative Analysis of Total Flavonoid Content in Crude and Salt-Processed *Semen Cuscutae* Byspectrometric Method, *Journal of Medicine and Pharmacy*, No. 6, 2020, pp. 101-105 (in Vietnamese).
- [12] S. Yang, H. Xu, B. Zhao, S. L, T. Li, X. Xu, T. Zhang, R. Lin, J. Li, X. Li, The Difference of Chemical Components and Biological Activities of the Crude Products and the Salt-Processed Product from *Semen Cuscutae*, *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2016, <http://dx.doi.org/10.1155/2016/8656740>.
- [13] M. Ye, Y. Li, Y. Yan, H. Liu, X. Ji, Determination of Flavonoids in *Semen Cuscutae* by RP-HPLC, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, Vol. 28, No. 3, 2002, pp. 621-628.