



Original Article

Determination of Total Flavonoids, Rutin, and Hyperin Contents in the Leaves of *Ziziphus Mauritiana* Lam. Harvested in Phu Tho

Nguyen Thi Minh Diep¹, Ha Thanh Hoa¹, Dao Viet Hung¹, Ngo Thi Xuan Thinh¹, Tran Thi Van Anh¹, Nguyen Thanh Hai², Nguyen Van Thang³, 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

³Tan Trao University, Km 6 Trung Mon, Yen Son, Tuyen Quang, Vietnam

Received 25th November 2024

Revised 5th December 2024; Accepted 23rd January 2025

Abstract: This study developed two quantitative methods. The first one was the photometric method that determined the content of total flavonoids in leaves of *Ziziphus mauritiana* Lam. and calculated based on rutin, a major compound. The regression equation of the standard sample in the concentration range of 1.0 - 150.0 µg/ml was $y = 0.0098x - 0.0096$, ($R^2 = 0.9994$); recovery from 96.48 - 99.81%. The second one was the HPLC-PDA method used for simultaneous quantification of rutin and hyperin, with chromatographic conditions including Phenomenex C18 reversed-phase column (25 × 4.6 cm, 5 µm), a mobile phase solvent system of MeCN (A) - 0.1% formic acid in water (B): isocratic 25% A, 75% B (0-25 minutes); 25-80% A, 75-20% B (25-40 minutes). The column chamber temperature was 30°C, the flow rate was 0.5 ml/min, and the sample injection volume was 10 µl. The wavelength for simultaneous detection of rutin and hyperin was 354 nm. The limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ) of rutin and hyperin were 0.05 and 0.165 µg/ml, respectively. Two developed methods were applied to quantify total flavonoids, rutin, and hyperin in several samples of the leaves of *Ziziphus mauritiana* Lam., which were collected in some districts in Phu Tho province. These methods are simple, fast, and accurate, aiming to serve the standardization of the medicinal material.

Keywords: *Ziziphus mauritiana*, Leaves, Flavonoid, Rutin, Hyperin, HPLC, UV-Vis.

* Corresponding author.

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

<https://doi.org/10.25073/2588-1132/vnumps.4728>

Xác định hàm lượng flavonoid toàn phần, rutin và hyperin trong lá cây Táo ta thu hái tại tỉnh Phú Thọ

Nguyễn Thị Minh Diệp¹, Hà Thanh Hòa¹, Đào Việt Hưng¹, Ngô Thị Xuân Thịnh¹, Trần Thị Vân Anh¹, Nguyễn Thanh Hải², Nguyễn Văn Thắng³, 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 Đại học Tân Trào, Km 6 Trung Môn, Yên Sơn, Tuyên Quang, Việt Nam

Nhận ngày 25 tháng 11 năm 2024

Chỉnh sửa ngày 5 tháng 12 năm 2024; Chấp nhận đăng ngày 23 tháng 01 năm 2025

Tóm tắt: Nghiên cứu này xây dựng 2 phương pháp định lượng: i) Phương pháp đo quang để xác định hàm lượng flavonoid toàn phần trong lá Táo ta tính theo chất chính là rutin. Phương trình hồi quy của mẫu chuẩn trong khoảng nồng độ 1,0 - 150,0 µg/ml là $y = 0,0098x - 0,0096$, ($R^2 = 0,9994$); độ thu hồi từ 96,48 - 99,81% ; và ii) Phương pháp HPLC-PDA cho định lượng đồng thời rutin và hyperin, với cột pha đảo Phenomenex C₁₈ (25 × 4,6 cm, 5 µm), hệ dung môi pha động MeCN (A)- acid formic 0,1% trong nước (B): đẳng dòng 25% A, 75% B (0-25 min); 25-80% A, 75-20% B (25-40 min). Nhiệt độ buồng cột 30 °C; tốc độ dòng 0,5 ml/min; thể tích tiêm mẫu 10 µl, bước sóng phát hiện đồng thời rutin và hyperin tại 354 nm. Giới hạn phát hiện (LOD), giới hạn định lượng (LOQ) của rutin và hyperin lần lượt là 0,05 và 0,165 µg/ml. Hai phương pháp đã xây dựng được áp dụng để định lượng flavonoid toàn phần, đồng thời rutin và hyperin trong một số mẫu lá Táo ta thu hái ở một số huyện trên địa bàn tỉnh Phú Thọ. Phương pháp thực hiện đơn giản, nhanh chóng, chính xác, hướng tới phục vụ tiêu chuẩn hóa dược liệu.

Từ khóa: Lá Táo ta, Flavonoid, Rutin, Hyperin, HPLC, UV-Vis.

1. Mở đầu

Cây Táo ta (*Ziziphus mauritiana* Lam.) là một loại cây ăn quả mọc ở các vùng nhiệt đới và cận nhiệt đới. Được sử dụng rộng rãi trong y học cổ truyền Việt Nam, Trung Quốc, Ấn Độ. Táo ta chứa nhiều flavonoid có lợi cho sức khỏe như rutin, hyperin, quercetin, keamferol, ... có tài liệu công bố hàm lượng rutin trong lá Táo ta khô chiếm đến 1,5% [1, 2]. Rutin, quercitrin và hyperin đã được chứng minh có tác dụng chống viêm, chống khối u, chống oxi hóa, tim

mạch, tăng huyết áp, tác dụng bảo vệ gan và chống đái tháo đường, giúp bảo vệ tế bào khỏi sự tổn thương do gốc tự do và hỗ trợ quá trình tái tạo tế bào. Các nghiên cứu đã chứng minh, các bộ phận khác nhau của cây được sử dụng theo truyền thống để điều trị bệnh dị ứng, hen suyễn, trầm cảm, rối loạn phế quản, tiểu đường, gan, sỏi và loét [3-5]. Nước sắc của lá dùng làm dầu gội và lá giã nát cùng với nước cốt chanh bôi trị mụn nhọt, dịch chiết methanol từ rễ có khả năng chống tiêu chảy, dịch chiết lá cây có tác dụng chống oxi hóa [6], chống giun sán [7]. Tuy nhiên,

* Tác giả liên hệ.

Địa chỉ email: phamquoctuan@duocphutho.edu.vn

<https://doi.org/10.25073/2588-1094/vnuees.4728>

ở Việt Nam hiện nay lá Táo ta vẫn chỉ được coi là một bài thuốc dân gian, theo tra cứu có công trình của T. T. L. Vu và cs (2016) về phân lập và xác định cấu trúc của 3 flavonoid từ hạt Táo ta [8]. Hiện chưa có nghiên cứu nào về xây dựng quy trình định lượng các thành phần hóa học trong lá Táo ta. Từ thực tế trên, chúng tôi tiến hành nghiên cứu xây dựng và thẩm định phương pháp định lượng flavonoid toàn phần, rutin và hyperin trong lá Táo ta sấy khô bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao, góp phần tiêu chuẩn hóa dược liệu, từ đó đưa lá Táo ta trở thành nguồn dược liệu có tiềm năng chiết xuất nguyên liệu làm thuốc, thực phẩm bảo vệ sức khỏe.

2. Phương pháp nghiên cứu

2.1. Nguyên liệu, hóa chất, thiết bị

2.1.1. Nguyên liệu

Mẫu nghiên cứu là phần lá bánh tẻ của cây Táo ta thu hái tại Thành phố Việt Trì, và một số huyện trên địa bàn tỉnh Phú Thọ vào tháng 12/2023. Mẫu được thẩm định tên khoa học là *Ziziphus mauritiana* Lam., họ Táo ta (Rhamnaceae) bởi TS. Phạm Thanh Loan - Viện trưởng Viện Nghiên cứu Ứng dụng và Phát triển – Trường Đại học Hùng Vương (Phú Thọ). Các mẫu được thu hái, phơi sấy và lưu mẫu tại Bộ môn Dược liệu, Trường Cao đẳng Y Dược Phú Thọ. Các mẫu được xay thành bột mịn, độ ẩm < 10,0%, đựng trong túi PE, buộc kín (gọi mẫu là dược liệu).

2.1.2. Hóa chất, dung môi

Chất chuẩn: rutin ((98,0%) mua từ hãng Chengdu Biopurity Phytochemicals Ltd. (Trung Quốc); hyperin (98,0%) của hãng Chengdu Herbpurify (Trung Quốc).

Thuốc thử, hóa chất, dung môi nghiên cứu: Ethanol (EtOH), natri nitrit (NaNO_2) 5%, nhôm clorid (AlCl_3) 10%, natri hydroxyd (NaOH) 1M, nước cất (H_2O) đạt tiêu chuẩn dung môi, thuốc thử theo Dược điển Việt Nam V. Methanol (MeOH), Acetonitril (MeCN) dùng cho HPLC-

Merck, Đức; Acid formic ($\geq 88,0\%$) - Xilong Scientific Co., Ltd., Trung Quốc; Nước cất 2 lần.

2.1.3. Máy móc, thiết bị

Tủ sấy chân không LabTech (Hàn Quốc); Bể chiết siêu âm D-78224 (Đức); Hệ thống sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) CBM-20A detector, Diode Array SPD-M20A (Shimadzu, Nhật Bản); cột sắc ký phenomenex C18 ($250 \times 4,6$ mm, 5 μm); Máy UV-Vis UV 1800, dải đo 190 - 900 nm (Shimadzu, Nhật Bản). Bình định mức, bình nón, micropipet và một số dụng cụ thủy tinh cần thiết khác (Đức).

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Định lượng flavonoid toàn phần trong lá Táo ta bằng phương pháp đo quang

Điều kiện đo quang: lấy chính xác 1,0 ml dung dịch mẫu chuẩn (mẫu chứa rutin chuẩn), mẫu thử. Phản ứng tạo màu giữa rutin và các flavonoid khác bằng cách thêm vào mẫu chuẩn, mẫu thử 0,3 ml dung dịch NaNO_2 5%, sau 5 min tiếp tục với 0,3 ml dung dịch AlCl_3 10%, sau 6 min thêm 2 ml natri hydroxyd 1 M, thêm nước cất vừa đủ 10 ml. Phức màu tạo thành được đo quang trên máy quang phổ UV-Vis ở cực đại hấp thụ tại 500 nm [9-11]. Dung dịch mẫu trắng được tiến hành song song nhưng không chứa chất phân tích.

Tối ưu hóa quy trình chiết xuất flavonoid:

Chiết xuất bằng phương pháp siêu âm. Khảo sát nồng độ dung môi chiết xuất (40, 60, 80, 100 % MeOH), thời gian chiết xuất (30, 60, 120, 180 min), nhiệt độ chiết (40, 50, 60 °C), số lần chiết xuất. Dựa trên cơ sở độ hấp thụ quang của các mẫu thu được tại các điểm khảo sát từ đó lựa chọn điều kiện chiết xuất tối ưu cho phương pháp phân tích.

Xây dựng đường chuẩn: từ dung dịch chuẩn rutin 1000 $\mu\text{g/ml}$, chuẩn bị dãy dung dịch có nồng độ 1, 5, 10, 50, 100 và 150 $\mu\text{g/ml}$ rutin trong MeOH 80%.

- Thẩm định phương pháp phân tích theo hướng dẫn của ICH và AOAC [12, 13].

- Hàm lượng flavonoid toàn phần trong lá Táo ta được tính theo công thức:

$$\text{Hàm lượng (\%)} = \frac{C \times V}{10 \times m \times (100 - B)}$$

Trong đó:

- C: là nồng độ của flavonoid có trong dung dịch mẫu thử được tính từ đường chuẩn của rutin ($\mu\text{g/ml}$);

- V: là thể tích dung môi chiết (ml);

- m: là khối lượng mẫu thử (g);

- B: là độ ẩm của mẫu thử (%).

2.2.2. Định lượng đồng thời rutin và hyperin trong mẫu lá Táo ta bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao

- Tìm điều kiện phát hiện đồng thời rutin và hyperin có trong dịch chiết lá Táo ta trên hệ thống HPLC-PDA tại bước sóng cho độ hấp thụ cực đại, khảo sát hệ dung môi, chương trình chạy, tốc độ dòng, nhiệt độ buồng cột. Thăm định phương pháp phân tích thực hiện theo hướng dẫn của ICH và AOAC [12-13].

- *Tối ưu hóa điều kiện chiết xuất*: khảo sát tương tự như mục 2.2.1. Từ đó lựa chọn được điều kiện chiết xuất tối ưu dựa trên Spic của rutin và hyperin thu được.

- *Chuẩn bị dung dịch chuẩn*: cân và pha chất chuẩn rutin và hyperin trong MeOH 80% để thu được dung dịch có nồng độ 1000 $\mu\text{g/ml}$.

Chuẩn bị dung dịch thử: cân bột dược liệu lá Táo ta, cho vào bình nón có nút mài, thêm chính xác lượng dung môi chiết, đậy nắp, cân khối lượng bình hoặc đánh dấu vạch mức, cài đặt nhiệt độ, thời gian và tiến hành chiết siêu âm. Để nguội, cân lại bình và bổ sung dung môi đã hao hụt. Lọc dịch chiết qua màng lọc 0,45 μm , thu được dung dịch mẫu thử để phân tích.

- Xây dựng đường chuẩn rutin và hyperin: từ dung dịch chuẩn gốc nồng độ 1000 $\mu\text{g/ml}$ chuẩn bị dãy dung dịch có nồng độ tương ứng: 1, 5, 10, 25, 50, 100, 150 $\mu\text{g/ml}$.

- Xác định LOD, LOQ dựa trên tỉn hiệu nhiễu đường nền (S/N) = 3 (LOD) và 10 (LOQ).

- Xác định độ chính xác và chính xác trung gian: thực hiện 6 lần định lượng mẫu lá Táo ta trong ngày và 6 lần ngày kế tiếp. Tính toán RSD và so sánh với khoảng cho phép của AOAC.

- Độ đúng (độ thu hồi) của phương pháp: thực hiện trên nền mẫu dược liệu (dịch chiết) đã định lượng để biết trước nồng độ. Cho thêm chất

phân tích rutin và hyperin vào nền mẫu dược liệu sao cho nồng độ chất phân tích thêm vào bằng khoảng 50%, 100 và 150% so với nồng độ của rutin và hyperin trong dược liệu (tương ứng gọi là mức 1, mức 2 và mức 3).

Tính toán hiệu suất thu hồi, so sánh với hướng dẫn của AOAC.

Cách tính kết quả: Hàm lượng rutin và hyperin trong mẫu lá cây Táo ta được tính theo công thức.

$$\text{Hàm lượng (\%)} = \frac{C \times V}{10^2 \times m \times (100 - B)}$$

Trong đó:

- C: nồng độ của rutin, hyperin có trong dung dịch mẫu thử được tính từ đường chuẩn tương ứng ($\mu\text{g/ml}$);

- V: là thể tích dung môi chiết (ml);

- m: là khối lượng mẫu thử (g);

- B: là độ ẩm của mẫu thử (%).

2.2.3. Áp dụng phương pháp đã xây dựng để định lượng flavonoid toàn phần, rutin và hyperin trong lá Táo ta

Các mẫu lá Táo ta thu hái tại một số địa điểm trên địa bàn tỉnh Phú Thọ ở cùng một thời điểm, được phơi sấy, bảo quản trong cùng điều kiện với mẫu nghiên cứu. Tiến hành phân tích xác định hàm lượng flavonoid toàn phần, rutin và hyperin bằng các quy trình đã xây dựng ở trên.

3. Kết quả và bàn luận

3.1. Định lượng flavonoid toàn phần trong mẫu lá Táo ta bằng phương pháp đo quang

3.1.1. Lựa chọn bước sóng phân tích

Tiến hành phản ứng tạo màu theo điều kiện đo quang mục 2.2.1, quét phổ UV-Vis mẫu chuẩn. Kết quả cho thấy dung dịch mẫu chuẩn có cực đại hấp thụ tại bước sóng 500 nm. Bước sóng này được lựa chọn cho phương pháp phân tích.

3.1.2. Quy trình chiết xuất tối ưu

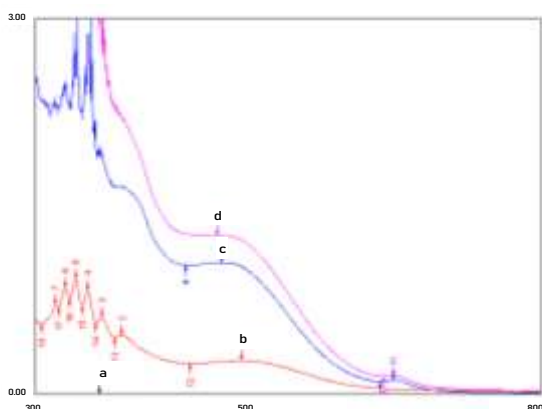
Sau khi tiến hành khảo sát theo mục 2.2.1. kết quả thu được quy trình chiết suất tối ưu như sau: Cân chính xác khoảng 1,00 gam bột dược liệu lá Táo ta đã được xác định độ ẩm, thêm 50 ml MeOH 80%, siêu âm trong 2 giờ tại nhiệt độ

50 °C, để nguội, lọc và chuyển vào bình định mức 100 ml, tráng bã dược liệu 2 lần, mỗi lần 10 ml và cuối cùng thêm dung môi chiết tới vạch, lắc đều. Hút chính xác 1,0 ml dịch lọc trên tiến hành phản ứng tạo màu theo điều kiện đo quang mục 2.2.1, từ đó xác định hàm lượng flavonoid toàn phần có trong mẫu thử.

3.1.3. Thẩm định phương pháp phân tích

Độ đặc hiệu

Tiến hành thực hiện phản ứng của mẫu trắng, mẫu chuẩn rutin (50 µg/ml), mẫu thử và mẫu thử thêm chuẩn rutin, trong điều kiện đo quang (Mục 2.2.1). Kết quả, trên phổ đồ mẫu trắng không có cực đại hấp thụ nào trong dải bước sóng UV-Vis, trong khi đó mẫu chuẩn, mẫu thử và mẫu thử thêm chuẩn đều cho cực đại hấp thụ tại 500 nm. Như vậy, phương pháp phân tích có độ đặc hiệu cao. Phổ hấp thụ Hình 1.



Hình 1. Phổ hấp thụ UV-Vis sau phản ứng tạo màu của mẫu trắng (a), mẫu chuẩn rutin (b), mẫu thử (c), mẫu thử thêm chuẩn rutin (d).

Khoảng tuyến tính, hệ số tương quan, độ lặp lại, độ chính xác của phương pháp

Phương trình đường chuẩn: $y = 0,0098x - 0,0096$, ($R^2 = 0,9994$), độ lặp lại: hàm lượng flavonoid bằng $0,772 \pm 0,04$ %, RSD: 0,48 %; độ thu hồi đạt từ 96,48 - 99,81 % (RSD: 1,74-1,91 %). Như vậy, phương pháp đã xây dựng đảm bảo độ lặp lại, độ chính xác để định lượng

flavonoid toàn phần trong mẫu lá Táo ta bằng phương pháp đo quang theo hướng dẫn của AOAC [12].

3.2. Định lượng đồng thời rutin và hyperin trong mẫu lá Táo ta bằng phương pháp HPLC-PDA

3.2.1. Điều kiện sắc ký

Lựa chọn bước sóng phát hiện

Pha dung dịch chất chuẩn rutin và hyperin có nồng độ 50 µg/ml, tiến hành quét phổ UV. Kết quả ghi lại phổ của rutin và hyperin đều có cực đại hấp thụ ở 354 nm, và bước sóng này được lựa chọn cho phương pháp phân tích.

Lựa chọn hệ dung môi, tốc độ dòng, nhiệt độ buồng cột, thể tích tiêm mẫu

Kết quả khảo sát điều kiện sắc ký phát hiện và định lượng đồng thời rutin và hyperin trong mẫu lá Táo ta như sau: hệ dung môi pha động MeCN (A) - acid formic 0,1% trong nước (B): Đăng dòng 25% A, 75% B (0-25 min); 25-80% A, 75-20% B (25-40 min). Nhiệt độ buồng cột 30 °C; tốc độ dòng 0,5 ml/min; thể tích tiêm mẫu 10 µl. Sắc ký đồ mẫu rutin, hyperin chuẩn thu được cho các pic cân đối, tách hoàn toàn các pic tạp có trong mẫu thử, chỉ số tinh khiết pic đạt yêu cầu (hệ số purity đều bằng 1.000000).

3.2.2. Điều kiện chiết xuất rutin và hyperin trong mẫu lá Táo ta

Sau khi tiến hành (Mục 2.2.2). Kết quả thu được điều kiện chiết xuất suất rutin và hyperin tối ưu trong mẫu lá Táo ta như sau: dung môi chiết MeOH 80%; tỷ lệ dược liệu/dung môi: 1/40 (g/ml); chiết siêu âm trong 2 giờ; nhiệt độ chiết xuất ở 50 °C; số lần chiết xuất: 1 lần (chiết 2 lần hàm lượng cả 2 chất không khác có ý nghĩa thống kê so với chiết 1 lần).

3.2.3. Thẩm định quy trình phân tích

Tính tương thích hệ thống

Tiêm vào hệ thống sắc ký 6 lần lặp lại dung dịch hỗn hợp chuẩn rutin và hyperin có nồng độ là 50 µg/ml. Tiến hành sắc ký ở điều kiện đã khảo sát, kết quả ghi lại ở Bảng 1.

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

Chất phân tích	t_R (min)		S_{pic} (mAu.s)	
	M ± SD	RSD (%)	M ± SD	RSD (%)
Rutin	16,414 ± 0,03	0,19	2023527 ± 2187	0,11
Hyperin	20,424 ± 0,03	0,13	1507026 ± 1936	0,14

Từ kết quả ở Bảng 1 cho thấy độ lệch chuẩn tương đối (RSD) của t_R và S_{pic} của rutin và hyperin đều < 2%. Như vậy, hệ thống phù hợp cho việc xác định hàm lượng rutin và hyperin có trong dược liệu lá Táo ta bằng phương pháp đã xây dựng.

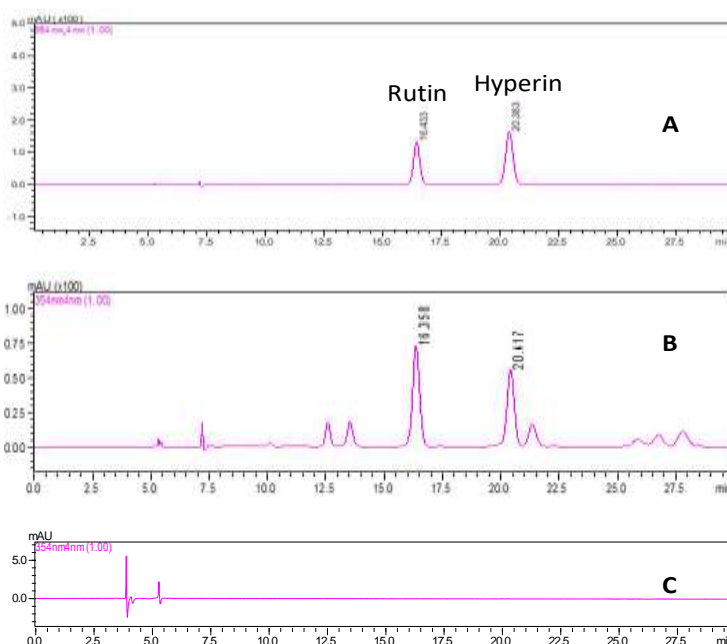
Độ đặc hiệu

Tiến hành sắc ký trong cùng điều kiện các mẫu thử, mẫu chuẩn rutin, hyperin (nồng độ 50 µg/ml), và mẫu trắng (MeOH 80%). Kết quả cho thấy (Hình 2), trên sắc ký đồ của mẫu trắng không có pic tạp tại thời gian lưu của các pic chất chuẩn; pic của rutin và hyperin trên sắc ký đồ

mẫu chuẩn, mẫu thử có hình dạng phổ UV của các pic tương đồng và cùng thời gian lưu ($p>0,05$). Như vậy, phương pháp đã xây dựng đáp ứng được yêu cầu về độ đặc hiệu.

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

Chuẩn bị dãy dung dịch chuẩn có nồng độ 1, 5, 10, 25, 50, 100 và 150 µg/ml của rutin và hyperin từ dung dịch chuẩn gốc có nồng độ 1000, 500 và 100 µg/ml. Kết quả khoảng tuyến tính (phương trình đường chuẩn, hệ số tương quan R^2), giá trị LOD, LOQ được trình bày trong Bảng 2.



Hình 2. Sắc ký đồ HPLC của mẫu chuẩn rutin và hyperin (A), mẫu thử (B), mẫu trắng (C).

Bảng 2. Kết quả phương trình đường chuẩn, hệ số tương quan tuyến tính, LOD, LOQ của phương pháp

Chất phân tích	Phương trình đường chuẩn	R^2	LOD (µg/ml)	LOQ (µg/ml)
Rutin	$y = 42268x + 27642$	0,9998	0,055	0,165
Hyperin	$y = 29330x + 40004$	0,9992	0,060	0,172

Phương trình hồi quy tuyến tính, hệ số tương quan (R^2), đồ thị đường chuẩn được tính toán, vẽ bằng phần mềm Microsoft Excel 2019. Từ kết quả thực nghiệm cho thấy trong khoảng nồng độ khảo sát của rutin và hyperin có sự tương quan tuyến tính với diện tích pic tương ứng, giá trị ($R^2 > 0,999$).

Độ lặp lại và độ lặp lại trung gian

Độ lặp lại và độ chính xác trung gian của phương pháp được xác định khi tiến hành định

lượng rutin, hyperin (n=6) trong ngày và ngày tiếp theo trong mẫu nghiên cứu theo quy trình phân tích đã lựa chọn ở trên. Kết quả được thể hiện ở Bảng 3.

Kết quả cho thấy sau 6 lần thực nghiệm trong ngày và 6 lần trong ngày tiếp có giá trị RSD của hàm lượng rutin và hyperin lần lượt 2,3 và 1,71%; 0,97 và 1,12% (< 3,7%) đáp ứng được yêu cầu của về độ lặp lại theo AOAC [12].

Bảng 3. Kết quả độ lặp lại và độ lặp lại trung gian của phương pháp

Số TT	Độ lặp lại		Độ lặp lại trung gian	
	Rutin (%)	Hyperin (%)	Rutin (%)	Hyperin (%)
1	0,188	0,179	0,186	0,179
2	0,195	0,177	0,188	0,177
3	0,187	0,173	0,187	0,174
4	0,185	0,175	0,188	0,174
5	0,188	0,174	0,187	0,174
6	0,183	0,176	0,187	0,175
TB	0,187 ($\pm 0,004$)	0,176 ($\pm 0,002$)	0,188 ($\pm 0,003$)	0,176 ($\pm 0,002$)
RSD	2,3	0,97	1,71	1,12
n=12	TB _{Rutin} = 0,187 % ($\pm 0,003$), RSD = 1,71; TB _{Hyperin} = 0,176 ($\pm 0,002$), RSD = 1,10 %			

Độ đúng

Độ đúng của phương pháp được xác định thông qua hiệu suất thu hồi bằng cách thêm chuẩn vào dung dịch mẫu thử (nền mẫu) ở 3 mức nồng độ Mục 2.2.2. Mỗi mức nồng độ thực hiện 3 lần. Kết quả được trình bày trong Bảng 4.

Kết quả thực hiện cho thấy, hiệu suất thu hồi của rutin và hyperin đạt tương ứng từ 97,36-100,42% và 97,67-101,63% nằm trong khoảng 95-105%. Như vậy, phương pháp đạt yêu cầu về độ đúng theo hướng dẫn của AOAC [12].

Bảng 4. Kết quả trung bình độ đúng của phương pháp

Nồng độ chất phân tích thêm vào ($\mu\text{g/ml}$)	Tổng nồng độ ($\mu\text{g/ml}$)		Nồng độ tìm lại ($\mu\text{g/ml}$)		Hiệu suất thu hồi (%)	
	Rutin	Hyperin	Rutin	Hyperin	Rutin	Hyperin
0	32,80	35,25	-	-	-	-
20,0	52,89	55,58	20,084	20,33	100,42	101,63
40,0	73,33	75,33	38,945	39,47	97,36	98,67
80,0	112,19	115,92	79,391	79,76	99,23	99,70

3.3. Xác định hàm lượng flavonoid toàn phần, rutin và hyperin trong một số mẫu lá Táo thu hái trên địa bàn tỉnh Phú Thọ

Định lượng các mẫu lá Táo ta thu hái tại tỉnh Phú Thọ theo quy trình phân tích đã được xây

dựng và thẩm định ở trên. Kết quả định lượng thu được trình bày ở Bảng 5.

Kết quả cho thấy hàm lượng flavonoid toàn phần trong các mẫu lá Táo ta thu hái tại các địa điểm khác nhau trên địa bàn tỉnh Phú Thọ cho các kết quả dao động trong khoảng 4,38 đến

5,48% (43,80-54,48 mg/g). So sánh với các nghiên cứu trước đây, hàm lượng flavonoid trong các mẫu cao chiết lá Táo ta tính theo quercetin: $32,83 \pm 1,3$ mg/g cao [15], $46,94 \pm 1,55$ $\mu\text{g}/\text{mg}$ [16], trong cao chiết lá, quả, hạt lần lượt là $90,26 \pm 3,54$, $39,33 \pm 3,73$, $41,29 \pm 9,09$ mg/100 g) [17]. Các nghiên cứu trên sử dụng chất chuẩn quercetin tuy nhiên rutin hay quercetin không khác nhau do flavonoid có phản

ứng tạo màu với thuốc thử NaNO_2 5%, AlCl_3 10%, trong môi trường kiềm. Như vậy, hàm lượng flavonoid toàn phần thu được trong nghiên cứu này nằm trong khoảng dưới 43,80-54,48 mg/g bột lá Táo ta sấy khô tính theo rutin có chênh lệch tuy không nhiều so với một số mẫu nghiên cứu đã công bố, đồng thời thô nhưỡng và điều kiện thời tiết cũng ảnh hưởng tới hàm lượng của phần lớn các hoạt chất có trong dược liệu.

Bảng 5. Kết quả xác định hàm lượng các chất trong các mẫu lá Táo ta (tính theo dược liệu đã sấy khô)

Số TT	Mẫu lá Táo ta	Flavonoid toàn phần (%)	Rutin (%)	Hyperin (%)
1	LTT.01.PT/2024 (Việt Trì)	$4,38 \pm 0,20$	0,189	0,171
2	LTT.02.PT/2024 (Lâm Thao)	$4,47 \pm 0,25$	0,181	0,192
3	LTT.03.PT/2024 (Yên Lập)	$4,66 \pm 0,24$	0,278	0,169
4	LTT.04.PT/2024 (Cẩm Khê)	$5,48 \pm 0,42$	0,200	0,160
5	LTT.05.PT/2024 (Tam Nông)	$4,35 \pm 0,10$	0,193	0,187

Hàm lượng rutin và hyperin định lượng được trong các mẫu lá Táo ta thu hái tương ứng 0,181 - 0,278 % (1,81 - 2,78 mg/g) và 0,16 - 0,19 % (1,60 - 1,92 mg/g), kết quả này cho thấy hàm lượng rutin cao hơn ($1226,51 \pm 225,88$ $\mu\text{g}/\text{g}$), trong khi đó hyperin lại thấp hơn ($3290,1 \pm 396,82$ $\mu\text{g}/\text{g}$) so với các mẫu lá táo được công bố trong nghiên cứu của Y. Yahia và cs [17]. Hàm lượng rutin trong lá Táo ta tuy có thấp hơn trong hoa Hòe (6-30%) [18], tương đương ở mức thấp và trung bình trong toàn cây hoặc lá và hoa Tam giác mạch (0,43-8,56%) [9, 18]. Cao hơn hàm lượng rutin trong dịch chiết lá của cây Cải mù tạt (*Brassica nigra*) [19],... Đối với hyperin có hàm lượng tương đương ở mức thấp so với hyperin có trong một số dược liệu phổ biến khác như Thỏ ty tử (>0,1%) [14], cây Ban âu (*Hypericum perforatum*) (0,461 - 1,257%) [20] và một số loài thuộc chi Ngũ gia bì (*Acanthopanax*) (0,05- 2,04 mg/g) [21]. Z. Wei và cs (2021) đã công bố hyperin có hàm lượng bằng 0,0665 mg/g trong cây Bạch đầu ông (*Vernonia cinerea*) [22]. Ngoài ra, những nghiên cứu về xác định hàm lượng rutin và hyperin trong lá Táo ta (*Z. mauritiana*) chưa nhiều, do vậy so sánh với các dược liệu đã được sử dụng làm thuốc hoặc trong các thực phẩm bảo vệ sức khỏe cho thấy trong lá Táo ta đã xác định có hàm

lượng flavonoid toàn phần, rutin và hyperin tương đương như một loại dược liệu. Trong khi đó ở Việt Nam lá Táo chưa có nghiên cứu chuẩn hóa đầy đủ để làm dược liệu mặc dù nó có ý nghĩa dược lý và đã được chứng minh về mức độ an toàn, độc tính thấp và không có khả năng gây đột biến gen [3].

Một số phương pháp HPLC đã xây dựng để định lượng hyperin trong một số loại dược liệu cụ thể như Thỏ ty tử có sử dụng thành phần pha động là acid phosphoric 0,1% (dược điển Việt Nam V và dược điển Trung Quốc). D. Wan và cs đã sử dụng pha động gồm MeOH- acid phosphoric 0,5% (45:55), pH = 3,0 [20]. Z. Wei và cs (2021) sử dụng MeOH- acid phosphoric 0,4% [22]. Hyperin được định lượng bằng cột C18 với chương trình rửa giải gradient ban đầu (MeCN: nước = 85: 15 đến 80: 20 trong 20 min), sau đó dung môi đẳng dòng (MeCN: nước = 80: 20 trong 20 min) và cuối cùng là dung môi gradient (MeCN : nước = 80 : 20 đến 65 : 35 trong 20 min), bước sóng phát hiện 210 nm [21]. Trong các nghiên cứu trước các tác giả đã sử dụng bước sóng hấp thụ tại 210 nm, đây không phải là bước sóng hấp thụ cực đại của flavonoid. Do đó, việc lựa chọn bước sóng hấp thụ cực đại 354 nm của rutin và hyperin sẽ cho kết quả định lượng chính xác hơn. Bởi vì khi định lượng hoạt

chất ở bước sóng hấp thụ cực đại thì khi thay đổi nồng độ hoạt chất sẽ tỷ lệ với tín hiệu trong sắc ký đồ HPLC do đó kết quả định lượng đảm bảo tin cậy.

Ngoài ra, một số nghiên cứu định lượng hyperin có sử dụng acid phosphoric trong chương trình rửa giải, điều này dẫn tới khả năng tách tốt, tuy nhiên có thể làm giảm tuổi thọ cột sắc ký. Trong nghiên cứu này chúng tôi đã sử dụng quy trình định lượng flavonoid toàn phần đã được nhiều nghiên cứu khẳng định và công bố [9-11]. Do đó quy trình xây dựng phù hợp để chiết xuất, dễ thực hiện, hiệu suất chiết xuất cao. Đối với phương pháp HPLC, dung môi pha động và chương trình rửa giải khá đơn giản, phổ biến và dễ thực hiện. Hai phương pháp định lượng đã xây dựng đều được đánh giá thông qua độ lặp lại và độ thu hồi cao, đảm bảo cho việc định lượng flavonoid toàn phần, rutin và hyperin trong mẫu lá Táo đạt độ tin cậy.

4. Kết luận

Nghiên cứu này chúng tôi đã xây dựng thành công hai phương pháp để định lượng flavonoid toàn phần và định lượng đồng thời rutin, hyperin trong lá Táo ta. Ứng dụng phương pháp đã xây dựng, xác định hàm lượng rutin và hyperin trong 05 mẫu thu hái tại 5 huyện trên địa bàn tỉnh Phú Thọ, hàm lượng flavonoid toàn phần, rutin và hyperin tương đối ổn định, (4,38 đến 5,48% (43,80-54,48 mg/g) flavonoid tính theo rutin; (1,81 – 2,78 mg/g) rutin; (1,60 - 1,92 mg/g) hyperin. Kết quả của nghiên cứu này gợi ý cho việc tiêu chuẩn hóa dược liệu lá Táo ta, nguồn nguyên liệu dồi dào, dễ kiếm. Điều kiện phân tích và quy trình chiết suất đơn giản, dễ thực hiện, máy móc và hóa chất phổ biến, kết quả tin cậy.

Tài liệu tham khảo

- [1] V. T. Cao, H. Tran, Pharmacognosy, Hanoi: Medical Publishing House, Vol. 1, 2011 (in Vietnamese).
- [2] O. Prakash, S. Usmani, R. Singh, N. Singh, A. Gupta, A. Ved, A Panoramic View on Phytochemical, Nutritional, And Therapeutic Attributes of *Ziziphus Mauritiana* Lam.: A Comprehensive Review, *Phytotherapy Research*, Vol. 35, No. 1, 2021, pp. 63-77.
- [3] M. K. Ramar, Y. Dhayanandamoorthy, S. S. Ramachandran, R. Kandasamy, HPLC-ESI-Qq Based Standardization, Mutagenic and Genotoxic Potential of Methanol Extract of *Ziziphus mauritiana* Lam Leaves, *Journal of Ethnopharmacology*, Vol. 246, 2020, <https://doi.org/10.1016/j.jep.2019.112216>.
- [4] S. K. Marwat, M. A. Khan, M. A. Khan, U. Fazal, M. Ahmad, M. Zafar, S. Shazia, *Salvadora Persica*, *Tamarix Aphylla* and *Zizyphus Mauritiana*-Three Woody Plant Species Mentioned in Holy Quran and Ahadith and Their Ethnobotanical Uses in North Western Part (D.I. Khan) of Pakistan, *Pakistan Journal of Nutrition*, Vol. 8, No. 5, 2009, pp. 542-547.
- [5] M. K. Gupta, A. K. Bhandari, R. K. Singh, Pharmacognostical Evaluations of the Leaves of *Ziziphus Mauritiana*, *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, Vol. 3, No. 3, 2012, pp. 818-821.
- [6] K. F. Khattak, T. U. Rahman, Effect of Gamma Irradiation on the Vitamins, Phytochemicals, Antimicrobial and Antioxidant Properties of *Ziziphus Mauritiana* Lam. Leaves, *Radiation Physics and Chemistry*, Vol. 127, 2016, pp. 243-248.
- [7] M. S. Bhutta, Z. Iqbal, R. Z. Abbas, M. A. Raza, In Vitro Screening of *Ziziphus Mauritiana* and *Terminalia arjuna* for their Anthelmintic Activity, *The Journal of Animal and Plant Sciences*, Vol. 21, No. 4, 2010, pp. 781-786.
- [8] T. T. L. Vu, H. T. Le, T. Q. Tran, Isolation and Structure Elucidation of Three Flavonoids from the Seed of *Ziziphus Mauritiana* Lam., *Vietnam Journal of Science and Technology*, Vol. 54, No. 2C, pp. 409-416.
- [9] Q. T. Pham, T. M. D. Nguyen, Q. T. Nguyen, T. X. T. Ngo, V. H. Dao, Q. L. Ha, T. H. Ha, D. L. Hoang, D. H. Ngo, Quantitative Analysis of Total Flavonoids in *Fagopyrum Esculentum* by Spectrometric Method, *Journal of Medicine and Pharmacy*, Vol. 34, 2021, pp. 86-92 (in Vietnamese).
- [10] A. M. M. San, S. Thongpraditchote, P. Sithisarn, W. Gritsanapan, Total Phenolics and Total Flavonoids Contents and Hypnotic Effect in Mice of *Ziziphus mauritiana* Lam. Seed Extract, Evidence-Based Complementary and Alternative

- Medicine, 2013,
<https://doi.org/10.1155/2013/835854>.
- [11] R. Bhargava, A. K. Shukla, N. Chauhan, B. B. Vashishtha, D. G. Dhandar, Impact of Hybridity on flavonoid Spectrum of Ber (*Ziziphus mauritiana* Lam.), Environmental and Experimental Botany, Vol. 53, No. 2, pp. 135-138.
- [12] International A. Guidelines for Standard Method Performance Requirements, Appendix F, p. 2, AOAC Official Methods of Analysis. 2016.
- [13] D. W. G. Harron, Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human use: the ICH Process, In J. P. Griffin, The Textbook of Pharmaceutical Medicine (6 ed.), 2009, Blackwell Publishing Ltd.
- [14] Vietnamese Ministry of Health, Vietnamse, Pharmacopeia V, Hanoi: Medical Publishing House, Vol. 2, 2017 (in Vietnamese).
- [15] S. T. Sakna, A. Mocan, H. N. Sultani, N. M. E. Fiky, L. A. Wessjohann, M. A. Farag, Metabolites Profiling of *Ziziphus* Leaf Taxa Via UHPLC/PDA/ESI-MS in Relation to their Biological Activities, Food Chemistry, Vol. 293, 2019, pp. 233-246.
- [16] A. Ashraf, A. Sarfraz, F. Anwar, A. Shahid, K. M. Alkharf, Chemical Composition and Biological Activities of Leaves of *Ziziphus mauritiana* L. Native to Pakistan, Pakistan Journal of Botany, Vol. 47, No. 1, 2015, pp. 367-376.
- [17] Y. Yahia, M. A. Benabderrahim, N. Tlili, M. Bagues, K. Nagaz, Bioactive Compounds, Antioxidant and Antimicrobial Activities of Extracts from Different Plant Parts of Two *Ziziphus* Mill. species, *PLoS One*, Vol. 15, No. 5, 2020, pp. 1-16,
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0232599>.
- [18] T. L. Do, The Medicinal Plants and Drugs in Vietnam, Hanoi: Medical Publishing House, 2004 (in Vietnamese).
- [19] R. Rajamurugan, N. Selvaganabathy, S. Kumaravel, C. Ramamurthy, V. Sujatha, C. Thirunavukkarasu, Polyphenol contents and antioxidant activity of *Brassica nigra* (L.) Koch. leaf extract, Natural Product Research, Vol. 26, No. 23, 2012, pp. 2208–2210.
- [20] D. Wan, J. Pei, Z Yan, Determination of Hyperin in Genus *Hypericum* Medicinal Plants, Journal of Chinese Medicinal Materials, Vol. 27, No. 6, 2004, pp. 397-398.
- [21] J. M. Lee, H. M. Kim, S. Lee, S. Han, S. H. Cho, S. Lee, Determination of Hyperin in the Fruits of *Acanthopanax* Species By High Performance Liquid Chromatography, Natural Product Sciences, Vol. 16, No. 1, 2010, pp. 39-42.
- [22] Z. Wei, J. He, H. Lu, Determination of Content of Hyperin and Luteolin in *Vernonia cinerea* (L.) Less, Medicinal Plant, Vol. 12, No. 1, 2021, pp. 59-62.